



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

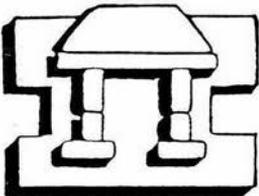
---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

"DETERMINACION DE ELIMINACIONES EN EL GEN DMD Y  
SU EFECTO EN EL MARCO DE LECTURA, EN PACIENTES  
MEXICANOS DE DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE"

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
B I O L O G O  
P R E S E N T A :  
ISRAEL MONTAÑO SANCHEZ

ASESOR: DR. DIEGO J. ARENAS ARANDA



IZTACALA

MEXICO, D. F.

2002.



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.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco:

Al Dr. Diego Arenas Aranda por su amistad, paciencia, comprensión y sobre todo por sus enseñanzas.

Al Dr. Sergio Vaca Pacheco por permitir amablemente el uso del laboratorio de Genética de la Unidad de Morfo-función de la F.E.S. Iztacala para la realización de esta tesis.

Al grupo de Investigación del laboratorio de Genética Molecular del Hospital de pediatría del CMN "Siglo XXI" por sus valiosos consejos y asesoría y donde también realice parte de este trabajo

Al Dr. Arturo Silva Jiménez jefe del servicio de Anestesiología del Hospital Central Norte de Petróleos Mexicanos, haberme permitido el uso de su equipo de computo para la transcripción de gran parte de este escrito y también a muchos de los integrantes del personal medico de este servicio por la particular asesoría.

A todos los que de una forma u otra, unos más otros menos contribuyeron a la conclusión de esta tesis.

Dedico este trabajo a:

Mi Madre por su ejemplo, esperando que le sirva como un pequeño aliciente en esta hora en la que se ha empeñado en el esfuerzo de superar su padecimiento.

Mi Hermana Laura, quien ha pasado por una muy amarga experiencia en el lapso en el que realice este trabajo.

Mi Padre por su amor y cariño.

Mi Hermana Mónica, a mi Hermano Gabriel, a José. A toda mi demás familia.

Porque Tu formaste mis entrañas; Tu me hiciste en el  
vientre de mi madre.  
Te alabaré; porque formidables, maravillosas son tus obras;  
estoy maravillado, y mi alma lo sabe muy bien.

Salmos 139: 13 y 14 R. V. 60.

¿No se venden dos gorriones por una monedita?  
Sin embargo, ni uno de ellos caerá a tierra sin que lo permita  
el Padre.

Mateo 10: 29 N. V. I.

A Ti mi Señor y Dios.

## INDICE

RESUMEN	<b>IZT.</b>	1
INTRODUCCIÓN		2
DISTROFIAS MUSCULARES		2
ASPECTOS CLINICOS		4
GENETICA CLÁSICA		7
CARACTERISTICAS GENERALES DEL GEN		8
PROTEINAS PRODUCIDAS POR EL GEN		8
ANALISIS MUTACIONAL DEL GEN DMD Y APICACIONES CLINICAS		12
JUSTIFICACIÓN		14
METODOLOGÍA		15
EXTRACCION DE ADN GENOMICO		16
AMPLIFICACION PCR DE LOS EXONES 19, 44-52 Y 74		17
ELECTROFOESIS EN GEL DE AGAROSA AL 2%		18
RESULTADOS		20
AMPLIFICACIÓN DE LOS EXONES 44, 48 Y 49		20
AMPLIFICACIÓN DE LOS EXONES 45, 46 Y 52		20
AMPLIFICACIÓN DE LOS EXONES 47, 50 Y 51		20
AMPLIFICACIÓN DE LOS EXONES 19 Y 74		22
DISCUSIÓN		27
REFERENCIAS		30

## RESUMEN

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) y la distrofia muscular de Becker (DMB) son enfermedades hereditarias ligadas a "X" que afectan el músculo y en un porcentaje menor de pacientes el Sistema Nervioso Central. Su frecuencia se estima en 1 de 3500 nacimientos masculinos vivos. El gen tiene un tamaño aproximado de 2.5 Mb y las deleciones de uno o más de sus 70 exónes son los daños más frecuentes en aquel, estando la mayoría de estas agrupadas en dos regiones del gen, el "punto caliente menor" entre los exónes 1 al 20 y el "punto caliente mayor" entre los exónes 44 al 55, las deleciones de alrededor de tres exónes parecen ser las más frecuentes. No existe correlación directa entre tamaño de deleción y fenotipo, pero la gran mayoría de las mutaciones que no rompen -o aquellas que si lo hacen- el marco de lectura traduccional abierto del gen tiene correlación positiva con DMB o DMD respectivamente. Se reporta la determinación de las eliminaciones exónicas por medio del análisis PCR-múltiple de los exónes comprendidos en la región más propensa a deleciones del gen, central del mismo, en muestras de ADN de linfocitos de siete pacientes no relacionados con DMD, cuatro de los cuales (57%) mostraron deleción y de estas dos no rompen el marco de lectura (una de los exónes 45-48, otra de los exónes 51-52) y dos no lo mantienen (una de los exónes 46-47 y la otra del exón 50).

El método aquí descrito representa una buena opción en la búsqueda inicial de mutaciones en el gen DMD que por otro lado es de tamaño inusual.

## INTRODUCCION

### Distrofias Musculares

La Distrofia muscular de Duchene ( DMD) y la Distrofia muscular Becker ( DMB ) están comprendidas dentro de un grupo de enfermedades hereditarias que se caracterizan por desgaste y debilidad progresiva del músculo, en las cuales la histología muscular tiene ciertos rasgos distintivos ( necrosis de fibra muscular, fagocitosis, etc. ) y no hay evidencia clínica o de laboratorio donde se involucren la medula espinal o el sistema nervioso periférico o haya miotonía [1], y que podemos denominar distrofias musculares.

Desde el punto de vista de las características clínicas existen algunas particularidades de las cuales se valen los especialistas para reconocer el conjunto de estas enfermedades y sirven de prueba para estos trastornos; el hecho de que neuronas motoras espinales, nervios musculares y terminaciones nerviosas se aprecien inalteradas y en general también sus características clínicas medibles, mientras las fibras musculares presentan cambios degenerativos severos. En la tabla 1 podemos ver una clasificación útil de estas enfermedades [1].

Pero como apuntaba DiMauro 1979 [2], ninguna característica clínica o de laboratorio son específicas, y una definición y clasificación verdaderamente racional de las distrofias musculares será solamente posibles cuando los errores bioquímicos primarios sean conocidos.

En cuanto a este último aspecto se han dado avances en los últimos años, así por ejemplo: en la distrofia muscular congénita se han establecido mutaciones para el gen que codifica la proteína laminina-alfa2 del complejo Distrofina-glicoproteína

Tabla 1.- Clasificación clínica y genética de las distrofias musculares.

1. Distrofias ligadas a "X"
  - a. Proximal
    - (i) Duchenne
    - (ii) Becker
    - (iii) Mabry
  - b. Con contracturas tempranas y cardiomiopatía
  - c. Miopatía con autofagia
  - d. Miopatía de cuadriceps
2. Distrofias recesivas autosomales
  - a. Proximal
    - (i) Formas congénitas
      - Rápidamente progresiva
      - Lentamente progresiva
    - (ii) Formas de la niñez
    - (iii) Formas en adulto
      - De cintura
      - Escapulohumeral
  - b. Quadriceps
    - Miopatía de cuadriceps
3. Distrofias autosomales dominantes
  - a. Facioescapulohumeral
  - b. Contracturas tempranas y cardiomiopatía
  - c. Escapuloperoneal
  - d. Proximal
    - (i) Distrofia dominante de cintura
    - (ii) Miopatía heredada limitada a mujeres
    - (iii) Miopatía heredada limitada a hombres
  - e. Distal
    - (i) Formas de la niñez
    - (ii) Forma en adultos
  - f. Ocular
    - (i) Forma ocular
    - (ii) Formas oculofaríngeas.

Tomada de: Emery, A. E. H. , 1993. Duchenne Muscular Dystrophy. 2<sup>a</sup> edition. Oxford University Press, Oxford.

( DGC por sus siglas en inglés ), y en distrofia muscular de cintura se han encontrado mutaciones en los sarcoglicanos pertenecientes también al DGC, en muchas de las formas recesivas autosomales de esta enfermedad [3].

La distrofia muscular recesiva autosomal severa de la niñez a través del tiempo en que se ha estudiado queda claro que no es una enfermedad genética simple homogénea, pero se ha asociado a deficiencia de alfa-sarcoglicano [4], y otra enfermedad de tipo parecido la distrofia muscular recesiva autosomal de principio tardío también presenta mutaciones en el gen que codifica al alfa- sarcoglicano [5]. El gen que codifica para los distroglicanos, otros componentes del complejo DGC cuando está mutado es letal [6,7]. Mutaciones en el gen que codifica para el sarcopuente ( otro miembro del DGC ) causa fibrosis congénita de los músculos extraoculares [8]. Y por último cabe mencionar la descripción de las numerosas mutaciones en el gen de DMD que pueden servir en el aspecto diagnóstico de la enfermedad y que también es el objeto de este trabajo.

#### Aspectos clínicos

En el pasado determinar la base bioquímica o el defecto fisiológico de la DMD no pudo realizarse principalmente por la dificultad de distinguir el defecto primario de las numerosas manifestaciones secundarias de la enfermedad [9,10,11,12,13].

Desde el nacimiento ya hay dificultades en cuanto al diagnóstico. Así Walton en 1956 [14] llevó a cabo un estudio de niños afectados con síndrome de hipotonía muscular generalizada, debilidad de movimientos voluntarios, y depresión o ausencia de reflejos de tendón presentándose al nacimiento o en la primera infancia,

60% fueron enfermedades de Werdnig-Hoffman, 20% miopatías de una clase u otra, el resto condiciones de varias clases, falsía cerebral y retraso mental etc. tres de estos casos fueron DMD. En muchos casos la amiotonia no se estableció, se resolvieron en la primera infancia [15]. La historia clínica de los casos de DMD, incluye, ningún rasgo al nacer, primeros síntomas alrededor de los 5 años, agravamiento progresivo a partir de este punto hasta quedar confinados a una silla de ruedas más o menos a los 11 años, incremento del deterioro físico general con el paso de los años hasta que sobreviene la muerte temprana alrededor de los 20 años.

La seguridad para confirmar éstas observaciones la da la determinación de los niveles de creatinina sérica ( CK por sus siglas en inglés ) en sangre. Los signos clínicos en algunos casos pueden retrasarse hasta los 8 o 9 años, se trata de la forma más benigna de esta enfermedad: distrofia muscular Becker, esta es alélica a DMD.

La musculatura involucrada es altamente selectiva, los músculos afectados son bilaterales y simétricos, los miembros inferiores más que los superiores, los proximales más que los distales, ciertos músculos son más afectados. Al afectarse la cadera y las rodillas, nos podemos percatar por el signo de Gowers, que caracteriza a la DMD, el engrosamiento y debilidad muscular se debe principalmente al exceso de tejido conectivo y adiposo que se acumula en lugar del tejido muscular. La apariencia general de estos niños varía [15], en los estadios tardíos el problema principal es el que tiene que ver con la deformidad torácica que impide el flujo pulmonar adecuado, el 90% de los niños mueren antes de los 20 años por estos problemas.

En referencia a la electromiografía ( EMG ), las mediciones con respecto a DMD en

comparación a otras distrofias musculares no pueden ser usualmente distinguidas, ni tampoco con, por ejemplo la polimiositis [16]. Tanto los estudios de microelectroscopia como los de enervación muscular y los de histoquímica no diferencian completamente una diagnosis de DMD con otras enfermedades, este último método no concluye respecto de la abundancia relativa de las diferentes fibras en el proceso de la enfermedad [17]. Los resultados de las biopsias comparativas son más alentadores, pero todos estos métodos combinados proporcionan información valiosa hacia una diagnosis ya bien establecida.

Genética clásica.

La enfermedad de la DMD posee rasgos genéticos clásicos interesantes como: una alta tasa de mutación de alrededor de  $70$  a  $100 \times 10^{-6}$  genes por generación, la cual es por mucho la más grande que cualquier enfermedad ligada al cromosoma "X" [1].

Como podemos apreciar la enfermedad se hereda como rasgo recesivo ligado a "X" esto es que:

- 1) En general, solo están afectados los varones.
- 2) La transmisión se realiza a través de heterocigotas, si el producto es varón tendrá 50% de posibilidades de estar afectado o ser sano; si es mujer la posibilidad de ser portadora o sana será de 50%.
- 3) Los hijos de un varón afectado serán todos sanos y sus hijas todas portadoras.
- 4) No hay transmisión de varón a varón.
- 5) En algunas enfermedades el varón no se reproduce por la historia natural propia del padecimiento pero no es estéril [18].

Y también se puede ver en diferentes observaciones cromosómicas como síndrome de Turner en mujeres "XO" o cromosomas "X" estructuralmente anormales [19,20,21]. Como apuntamos el gen es muy propenso a mutaciones, siempre es completamente penetrante sin formas subclínicas, la incidencia se estima en  $200$  a  $300 \times 10^{-6}$ .

Características generales del gen.

El tamaño génico del factor responsable de la DMD es de aproximadamente 2450 Kb lo que representa un gen de tamaño gigantesco que a su vez hace que sea un blanco más probable para los agentes mutagénicos [22,23,24], y cabe la posibilidad de que en el funcionamiento genético intrínseco ( replicación al menos ) esté involucrado un transposón [25].

Hay dos sitios en el gen donde se concentran las mutaciones-delecciones ( puntos calientes del gen ) el proximal y el central. Este gen esta compuesto de 70 exones de 0.2 Kb e intrones de 35 Kb en promedio, el ARNm transcrito es de 14 Kb.

Existen en él mutaciones puntuales más difíciles de detectar ( 30% del total aproximadamente ) que las mutaciones-delecciones [54].

Proteínas producidas por el gen.

La proteína distrofina representa el vínculo con todas las otras proteínas del DGC [26], la secuencia de aminoácidos sugirió que la proteína producida puede tener un papel estructural en el músculo [27], tiene un peso molecular de 427 KDa, 3685 aminoácidos y en forma de vara con cuatro dominios: N-terminal, dominio vara central, dominio rico en cisteína y C-terminal [28].

El gen distrofina produce un rango de transcritos diferentes que codifican varias isoformas de esta proteína de longitud variante y que contienen segmentos variantes de la secuencia básica de distrofina, y este rango de diferentes ARNs mensajeros codificados son generados por tres procesos:

- i. el uso de diferentes promotores, únicos y con frecuencia tejido específico (figura 1) [29].
- ii. empalme alternativo.
- iii. el uso de diferentes señales de adición de poli-A.

Dependiendo de la técnica usada, puede ser muy difícil discriminar entre todas las isoformas de distrofina; muchos anticuerpos detectarán varias isoformas en inmunohistoquímica y muchos pares primers amplificarán varias isoformas en RT-PCR ( Reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa-reversa siglas en inglés ). En la tabla 2 [29] podemos ver descritas las diferentes isoformas y la nomenclatura de las diferentes proteínas distrofina ( **Dp** ), las cuales se basan en su longitud en kiloDaltones ( **Dp427**, **Dp260**, etc. ), el tejido de expresión ( **Dp427m** de músculo, **Dp427p** de células de Purkinje, etc. ) y el patrón de empalme diferencial que genera estas ( **Dp71a**, **Dp71b**, etc. ). Muchos de los diferentes transcritos del gen distrofina están evolutivamente conservados en mamíferos, y esta conservación viene de antes de la divergencia entre protostomados y deuterostomados [29].

IZT.



U.N.A.M. CAMPUS

**Tabla 2.-NOMENCLATURA DE LAS ISOFORMAS DE LA PROTEINA DISTROFINA.**

Nombre	Sinónimo	Tamaño de la proteína	Amino ácidos	mRNA	Expresión
Dp427i*	distrofina de linfocitos	427 kDa¶	3562	13764 pb**	linfoblastoide
Dp427c*	distrofina cortical	427 kDa	3677	14069 pb	cerebro
Dp427m *	distrofina muscular	427 kDa	3685	13993 pb	
Dp427p*	distrofina de Purkinje	427 kDa	3681	14 kb**	
	distrofina fetal				
Dp260	distrofina retinal	260 kDa			retina
	Dp260-1		2344	9773 pb	retina
	Dp260-2		2341	9916 pb	retina
Dp140		140 kDa	1225	7410 pb	sistema nervioso central y riñón
	Dp140b!		1243	7378 pb	riñón
	Dp140ab!		1230	7339 pb	cerebelo y riñón
	Dp140c!		1115	7050 pb	cerebelo
	Dp140bc!		1133	7048 pb	cerebelo y riñón
Dp116	apo-distrofina 2	116 kDa	956	5623 pb	células de Schwann
Dp71	apo-distrofina 1	71 kDa (70.4)	617	4623 pb	ubicua
	Dp71b	72.2 kDa	635	4591 pb	ubicua
	Dp71a!	68.9 kDa	604	4584 pb	ubicua
	Dp71ab	70.8 kDa	622	4552 pb	ubicua
Dp40	apo-distrofina 3	40 kDa	340	2.2 kb	ubicua

\* Tipo de tejido de expresión de las isoformas de distrofina.

¡ Tipo de empalme diferencial que generan las isoformas.

¶ Kilodaltons.

\*\* Longitud en pares de bases.

Tomada de: den Dunnen J.T. Distrophin isoforms.[programa de computadora]. Leiden(NI): Leiden Muscular Dystrophy pages; 2002.

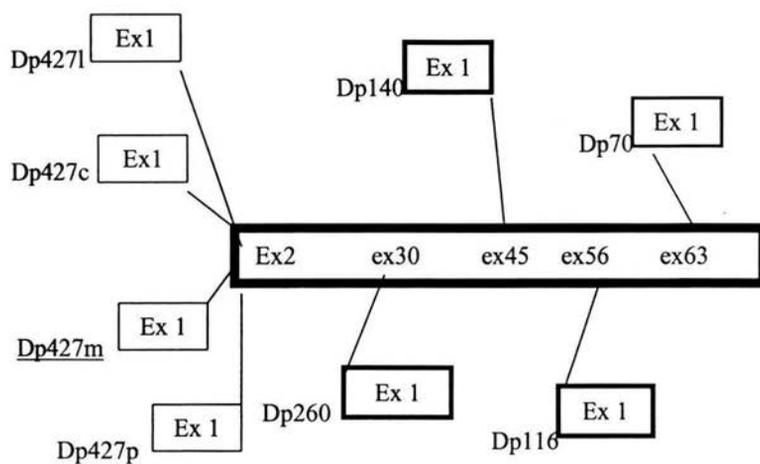


Figura 1.-Promotores del gen ditrofina, donde se aprecia el sitio en los diferentes exones a lo largo del mismo de los promotores de las diferentes isoformas de la proteína distrofina. Tomada de: den Dunnen J.T. Dystrophin isoforms. [programa de computadora]. Leiden(NI): Leiden Muscular Dydtrophy pages; 2002.

## Análisis mutacional del gen DMD y aplicaciones clínicas.

Podemos empezar describiendo lo que el análisis molecular ha logrado en el campo de esta enfermedad, por ejemplo, la probabilidad de padecer DMD excede el 99% si hay una ausencia completa de distrofina, mientras que la probabilidad de presentarse DMB excede el 95% si la distrofina esta presente pero de forma anormal, presenta un tamaño diferente y/o abundancia reducida [30].

El trayecto que ha seguido el proceso de localización, aislamiento e identificación del gen de la DMD/DMB es como el de una patología molecular de cualquier enfermedad, donde el defecto bioquímico básico es desconocido. Una síntesis descriptiva de la secuencia que siguió este proceso desde las primeras observaciones de las anomalías cromosómicas en "X" hasta la descripción del gen de la distrofina y la caracterización de esta proteína, la encontramos en Arenas 1996 [31]. El punto caliente central del gen mencionado anteriormente esta localizado aproximadamente 1200 kb del extremo 5' del gen, agrupado alrededor de los exones 45-55 donde muchas deleciones pueden ser detectadas con la prueba P20 ( pruebas 7-8 de ADNc ).

El punto caliente proximal del gen esta localizado aproximadamente 500 kb del extremo 5' del gen, agrupado alrededor de los primeros 20 exones donde muchas deleciones pueden ser detectadas con pruebas PERT y XJ ( pruebas 1-3 de ADNc ) [32,33,34,35]. Alrededor del 85% de deleciones se detectan con dos pruebas de ADNc ( 1-2a y 8 ).

La aplicación de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en la detección de

deleciones en el gen distrofina por Chamberlain et al. (1988) [36], basado en la amplificación simultanea de varios exones propensos a deleciones en el gen DMD, ahora detecta casi todas las deleciones del gen [37].

Con el propósito de diagnosticar a un nivel molecular la DMD podemos decir, que no hay correlación entre la extensión de la deleción y la severidad de la enfermedad. Esta aparente incongruencia se ha explicado con la hipótesis de Monaco [38] en donde se propuso que si la deleción rompía el marco de lectura, el paciente tendría DMD, si el marco se mantiene el paciente tendría DMB donde no es clara la correlación entre la abundancia de distrofina y el curso clínico [39].

## JUSTIFICACIÓN

La metodología de la amplificación de exones localizados en la región más propensa a deleciones, en el gen DMD es una metodología rápida, menos costosa, requiere menos infraestructura y proporciona resultados equivalentes a los conseguidos por otras metodologías moleculares. Por esto es una opción muy viable para el diagnóstico molecular de la enfermedad en nuestro país.

## OBJETIVO GENERAL

Implementar el diagnóstico molecular de la distrofia muscular de Duchenne/Becker mediante la amplificación de exones localizados en el punto caliente mayor propenso a deleciones del gen.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Amplificar mediante pruebas múltiplex los exones 44, 48 y 49; 45, 46 y 52; 47, 50 y 51 y bplex de los exones 19 y 74 del gen DMD.
- 2.- Establecer si las deleciones encontradas en el gen DMD de estos pacientes están en “marco” o habrá “desplazamiento de marco” de lectura traduccional.
- 3.- Obtener un banco de DNA genómico de individuos afectados con DMD/DMB.

## METODOLOGIA

De muestras de ADN genómico de siete pacientes no relacionados con DMD y DMB obtenidas de un banco genómico del Centro Medico Nacional “Siglo XXI” del IMSS se procedió a realizar el análisis de mutaciones-deleciones con pruebas de PCR-múltiplex y biplex. Las pruebas múltiplex consistieron en arreglos triplex en tres series de tres de los primers de los exónes: a)44, 48 y 49; b)45, 46 y 52 y c)47, 50 y 51. Las pruebas biplex consistieron en un único arreglo de dos primers de los exónes: 19 y 74.

Las secuencias de los primer que fueron utilizados son las siguientes:

DMD-44F, 5'-CGATTTGACAGATCTGTTGAG; DMD-44R, 5'-GATACCATTTGT  
ATTTAGCATGTTCC; DMD-45F, 5'-GAACTCCAGGATGGCATTGG; DMD-45R,  
5'-CTGTCTGACAGCTGTTTGCAG; DMD-46F, 5'-GCTAGAAGAACAAAAGAAT  
ATCTTG; DMD-46R, 5'-CTTGACTTGCTCAAGCTTTTC; DMD-47F, 5'-TGGTGG  
AAGAGTTGCCCTG; DMD-47R, 5'-CTTTTATCCACTGGAGATTTGTCTG;  
DMD-48F, 5'-GTTTCCAGAGCTTTACCTGAG; DMD-48R, 5'-CTGAACGTCAA  
TGGTCCTTCTTG; DMD-49F, 5'-GAAAAGTAAATAGCAGTTCAAGC; DMD-  
49R, 5'-CTTCACTGGCTGAGTGGCTG; DMD-50F, 5'-GGAAGTTAGAAGATCTG  
AGCTC; DMD-50R, 5'-GGCTCCAATAGTGGTCAGTC; DMD-51F, 5'-CTCCTACT  
CAGACTGTTACTCTG; DMD-51R, 5'-CTTCTGCTTGATGATCATCTCG; DMD-  
52F, 5'-GCAACAATGCAGGATTTGGAAC; DMD-52R, 5'-CGATCCGTAATGATT  
GTTCTAGC. Las anteriores fueron las secuencias de los arreglos triplex, y las que  
siguen son las secuencias de los arreglos biplex:

DMD-19F, 5'-GCCATAGAGCGAGAAAAA; DMD-19R, 5'-CATTACCATCTGTT

CCA; DMD-74F, 5'-AGATGATGAACATTTGTAA; DMD-74R, 5'-CTGTTTTCTT CCTCAAGATC, el diseño de estos "primers" esta previamente reportado [42]. Los productos exónicos obtenidos con estos oligonucleotidos son de los tamaños siguientes: 19-88 pb, 44-148 pb, 45-176 pb, 46- 148 pb, 47-150 pb, 48-186 pb, 49-102 pb, 50-109 pb, 51-233 pb, 52-118 pb, 74-159 pb [43].

Todas estas pruebas se realizaron con las muestras de los siete pacientes.

**Extracción de ADN genómico.-** La extracción del ADN se hizo por métodos estándar [40] como se describe a continuación:

se tomó de 5-10 ml de sangre de un individuo y se mezcló con 500 µl. de EDTA al 0.5% (pH=7.6 ). Se centrifugó el tubo a 3 krpm durante 10 min., se tomó con pipeta Pasteur la capa de leucocitos ( capa blanca ) de la interfase, sin importar que hubiera eritrocitos y se pasó a un tubo limpio y esterilizado, agregando al tubo 1.5 ml de solución de lisis de eritrocitos ( 10 mM de Tris pH=7.6, 5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 10 mM de NaCl ), se mezcló vigorosamente, hasta que se resuspendiera la pastilla. Se centrifugó a 3 krpm, 10 min.

Se eliminó el sobrenadante, de preferencia usando vacío, teniendo cuidado de no eliminar la pastilla blanca, repitiendo el agregado de solución de lisis, el centrifugado, y eliminación de sobrenadante al menos 2 veces más, hasta que la pastilla estuviera blanca. Se resuspendió la pastilla en 886 µl de NaCl 5 mM, se agitó vigorosamente.

Se agregó a cada tubo 46 µl de SDS al 10%, agitando vigorosamente. Se adicionó 308 µl de NaCl saturando a cada tubo, se agitó vigorosamente, estos 3 agitados se realizaron así. Se Centrifugo 15 min, a 15 krpm, a temperatura ambiente. Se Transfirió el

sobrenadante en un tubo nuevo.

Se realizaron al menos 2 extracciones fenólicas ( fenol-cloroformo-isoamilico: 25:24:1), trabajando con la fase acuosa ( superior ). Se precipitó el ADN con 1 volumen de isopropanol o 2 volúmenes de etanol ( no fue necesario agregar acetato de amonio ), centrifugando 5 min. a 15 krpm, eliminando el sobrenadante y lavando 2 veces la pastilla con etanol al 70%. Se resuspendió la pastilla de ADN en 200-500 µl de agua desionizada ( agua inyectable ). Se almacenó el ADN a -20 °C.

La calidad del ADN se comprobó por resolución de electroforesis en gel de agarosa al 2%. Los once primers que amplifican los exones antes señalados detectaron entre el 90-92% de todas las deleciones de las DMD/ DMB [36,37]. Para poder apreciar con más claridad la separación de las diferentes bandas de los productos PCR en los gels de agarosa, a los cuales se sometieron dichos productos, se implementó el orden de los diseños de las diferentes pruebas de los primers reportados en otra parte [41,42], este diseño consiste en ordenar dentro de las pruebas triplex los primers, uno de mayor número de pb, el otro de número intermedio de pb, y otro de número menor de pb, respecto de los exones que amplifican.

**Amplificación PCR de los exones 19, 44-52 y 74.-** La mezcla de reacción se preparo con buffer de amplificación ( Cetus 10x ) diluido a 1x, Mg de amplificación (Cetus ) 1.5 mM, dNTP's de los cuatro nucleótidos ( Pharmacia ) 200 µM, primers-oligonucleotidos de los exones 19, 44-52 y 74 ( Gibco-BRL ) 12.5 pmoles, Taq polimerasa recombinante 2.5 U ( Cetus ), DNA genómico 100-200 ng y en lugar de este a los dispositivos testigos se les agregó 1 µl de agua destilada, todo en un volumen

total de 14  $\mu$ l en tubos Eppendorff adecuados. En el termociclador marca GeneampPCR system 9700 se introdujeron los tubos con las mezclas de reacción y las condiciones de amplificación siguientes: una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min., seguida por tres pasos, primero desnaturalización a 94°C por 1 min., segundo alineación a 55°C por 1 min., tercero extensión a 65°C por 2 min. estos tres pasos se repitieron 30 ciclos, una extensión final a 65°C por 7 min. Después se tomaron alícuotas de 5  $\mu$ l mezclándolas 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 corrió la electroforesis en geles de agarosa al 2%.

**Electroforesis en gel de agarosa al 2%.-** Se disolvieron 0.5 g. de agarosa ( Pronadisa ) en 25 ml de buffer 1x de TBE ( se preparó buffer 5x de TBE y se diluyó a 1x: 100 ml de TBE se diluyen en 400 ml de agua destilada), se calentó hasta diluirse y luego se agregó 3-5  $\mu$ l de bromuro de etidio ( Sigma ), se colocó la solución en un carro de cámara de electroforesis adecuado y se le colocó un peine para formar pozos. Gelificado se quitó el peine y los pozos se colocaron hacia donde se conectó el polo negativo, se cubrió el gel con solución 1x de TBE. En un trozo de papel parafin se colocaron muestras de ADN genómico o de productos de amplificación ( alícuotas de 5  $\mu$ l ) y se mezclaron con la mitad de su volumen de colorante de corrida azul de bromofenol (Sigma ) y se trasladaron a los pozos, así mismo 1  $\mu$ l de marcador de 50 o 123 pb ( Gibco-BRL ) mezclado con colorante se colocó en una poza junto a estas, se cerró la cámara y se corrió la electroforesis a 110 volt., 40-50 ampers. y de 40-60 min.

Terminada la corrida el gel se colocó y observó en un transiluminador y se le tomó una fotografía mediante el sistema de imagen digital ISO-1000 de Alpha Innotech Corporation.

De los resultados así obtenidos se verificó si concordaron con la hipótesis de “marco de lectura traduccional” esto es, si las deleciones encontradas en las muestras de ADN son del tipo de “desplazamiento de marco” o si son del tipo “en marco” [38].

En la deleción en marco los extremos 3' y 5' de los exónes que flanquean la deleción se corresponden, y en la deleción de desplazo de marco esto no sucede.

## RESULTADOS

De siete pacientes considerados para análisis de eliminaciones exónicas del gen DMD, se procedió a aislar el ADN a partir de leucocitos de sangre periférica (ver figura 2), y luego se realizó dicho análisis de mutaciones en el gen DMD: cuatro de los siete pacientes(57%) mostró deleciones de uno o más exónes del gen.

Amplificación de los exónes 44, 48 y 49.- En esta prueba PCR múltiplex seis de los siete pacientes no presentaron deleciones en estos exónes ( figura 3 ).

La única excepción fue el paciente 4 quien tuvo una deleción del exón 48 ( figura 3c ).

Amplificación de los exónes 45, 46 y 52.- En la figura 4 se muestra el resultado de la amplificación de esta serie de exónes; los pacientes 5 y 7 tienen un exon deleteado cada uno, 46 y 52 respectivamente ( figura 4b ) y el paciente 4 tiene dos exónes perdidos 45 y 46 ( figura 4a ). Los restantes exónes de los demás pacientes mostraron las bandas correspondientes de amplificados.

Amplificación de los exónes 47, 50 y 51.- El resultado de la amplificación triplex de estos exónes fue como sigue:

cuatro exónes estuvieron perdidos en otros tantos pacientes ( figura 5 ): paciente 4 exón 47, paciente 5 exón 47, paciente 7 exón 51 y paciente 8 exón 50, y no se observo ninguna otra deleción.



Figura 2.- Bandas de ADN extraído de leucocitos de los pacientes 2-8 incluidos en este trabajo, y corrido sobre un gel de agarosa al 2% mostrando su calidad.

Amplificación de los exones 19 y 74.- Con la prueba dúplex de amplificación de exones la única llevada a cabo en este trabajo se demostró que ninguno de estos pacientes tiene deleciones para los exones 19 y 74 ( figura 6 ).

Así el paciente 4 tiene una deleción que se extiende del exón 45 hasta el 48, el paciente 5 una deleción que comprende los exones 46 y 47, el paciente 7 una mutación que incluye los exones 51 y 52, y el paciente 8 que ya se mencionó antes tiene deleteado un exón (figura 7).

También se determino el marco de lectura traduccional (MLT) para las mutaciones encontradas en esta serie de pacientes: de las cuatro mutaciones determinadas en los cuatro pacientes dos están en marco (pacientes 4 y 7), y dos fuera de marco (pacientes 5 y 8).

En la deleción del paciente 4 el extremo 3' del exón 44 termina en un codón completo (tiene los tres nucleótidos) y el extremo 5' del exón 49 –con el cual empalma alternativamente- es de tipo 3 de marco de lectura traduccional [43], y por tanto no hay desplazo en el mismo.

En el paciente 7 el extremo 3' del exón 50 termina con un nucleótido de codón, y el extremo 5' del exón 53 (empalme) es de tipo 1 de MLT, entonces no se desplaza el marco de lectura.

En los pacientes 5 y 8 los extremos 3' y 5' de los exones 45 y 48 y de los exones 49 y 51 respectivamente no se corresponden y por tanto se rompe el marco de lectura traduccional (tabla 3).

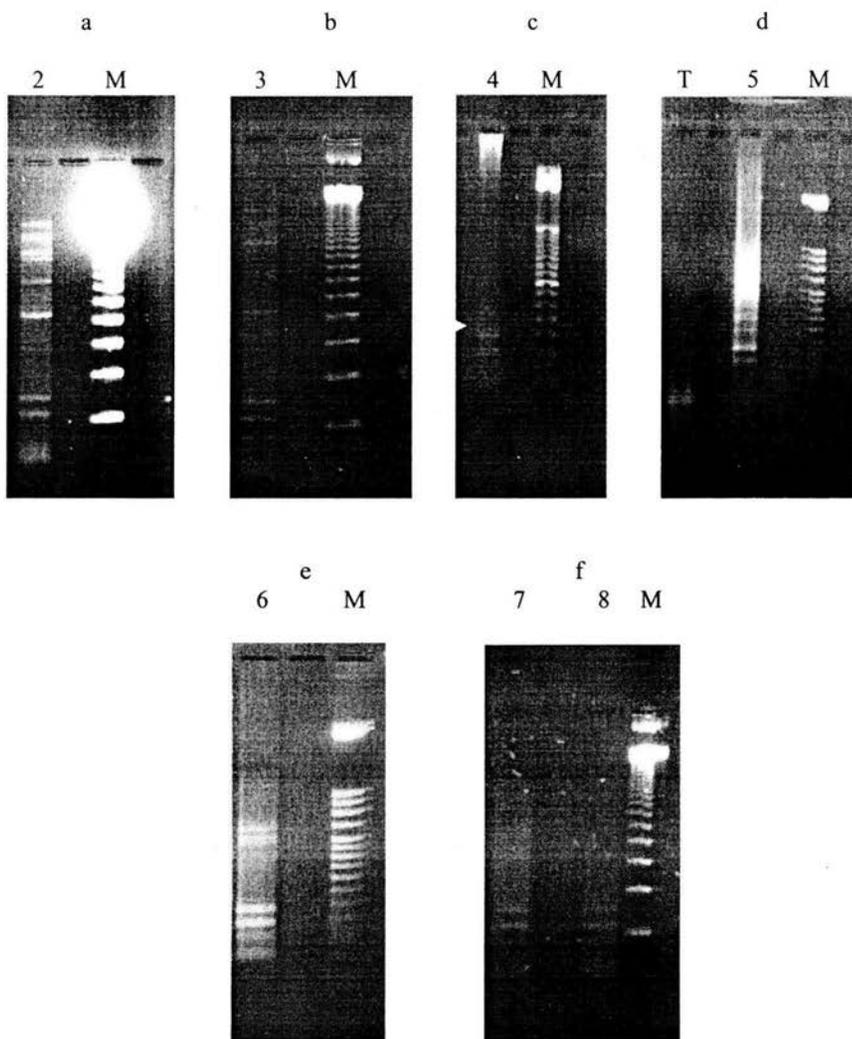


Figura 3.- Bandas de los productos de amplificación por PCR de los exónes 44, 48 y 49 del gen DMD del ADN extraído de leucocitos de los pacientes 2, 3, 7 y 8 ( a, b y f ) marcador de 123 pb, y de los pacientes 4, 5 y 6 ( c, d y e ) marcador de 50 pb, en geles de agarosa al 2%. La punta de flecha blanca indica la falta el exón 48 en el paciente 4 ( c ). T= Testigo. M= Marcador.

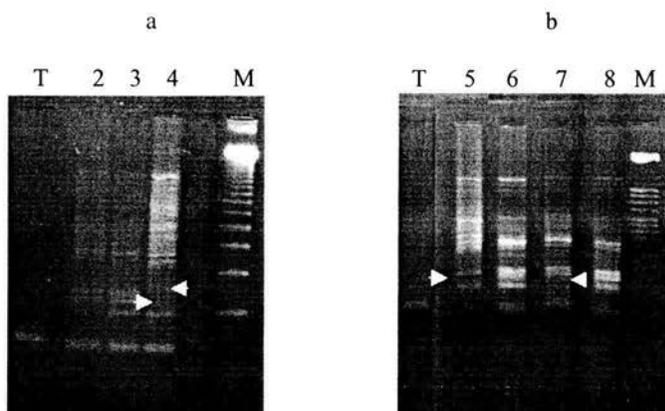


Figura 4.- Bandas de los productos de amplificación por PCR de los exónes 45, 46 y 52 del gen DMD del ADN extraído de leucocitos de los pacientes 2, 3 y 4 ( a ) marcador de 123 pb y de los pacientes 5, 6, 7 y 8 ( b ) marcador de 50 pb, en geles de agarosa al 2%. Las puntas de flecha blanca indican: falta de los exónes 45 y 46 en el paciente 4 ( a ), el exón 46 en el paciente 5 ( b ) y el exón 52 en el paciente 7 ( b ). T= Testigo. M= Marcador.

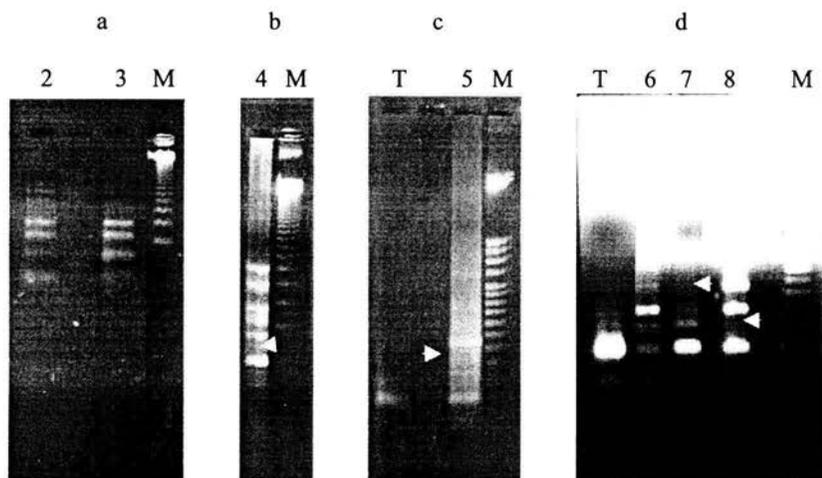


Figura 5.- Bandas de los productos de amplificación por PCR de los exónes 47, 50 y 51 del gen DMD del ADN extraído de leucocitos de los pacientes 2, 3 y 4 ( a y b ) marcador de 123 pb y de los pacientes 5, 6, 7 y 8 ( c y d ) marcador de 50 pb, en geles de agarosa al 2%. Las puntas de flecha blanca indican: falta de exón 47 en el paciente 4 ( b ), falta del exón 47 en el paciente 5 ( c ) y falta de los exónes 51 y 50 en los pacientes 7 y 8 respectivamente ( d ). T= Testigo. M= marcador.

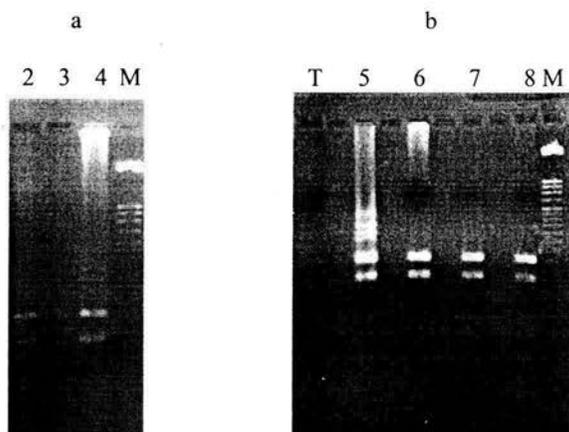


Figura 6.- Bandas de los productos de amplificación por PCR de los exónes 19 y 74 del gen DMD del ADN extraído de leucocitos de los pacientes 2, 3, y 4 ( a ) marcador de 50 pb y de los pacientes 5, 6, 7 y 8 ( b ) marcador de 50 pb, en geles de agarosa al 2%. T= Testigo. M= Marcador.

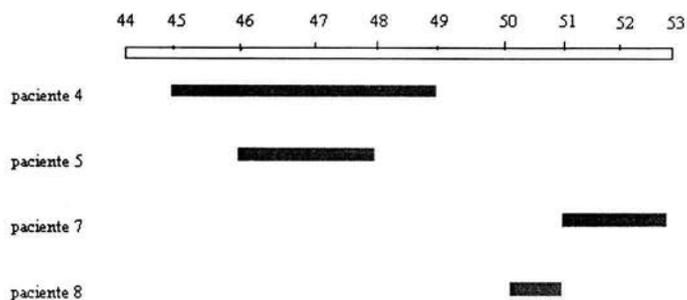


Figura 7. Esquema de cDNA de la región de “punto caliente” mayor muestra la extensión de la delección (barras oscuras) de cada uno de los pacientes que presentaron eliminaciones del gen DMD.

TABLA 3. Relacion entre pacientes, pérdida de exónes y marco de lectura traduccional.

PACIENTE	ELIMINACION EXONICA	MARCO DE LECTURA*
4	45-48	+
5	46-47	-
7	51-52	+
8	50	-

\*+ =Marco de lectura traduccional en fase.

- =Marco de lectura traduccional fuera de fase.

## DISCUSION

Las mutaciones encontradas en este trabajo son diferentes en todos los pacientes (cuatro diferentes mutaciones en los cuatro pacientes con deleciones). El porcentaje de deleciones obtenidas en este trabajo fue del 57%, similar al reportado en otros trabajos [35-37,42,44].

En un estudio de la población del norte de Europa donde se analizaron más de 1000 pacientes con DMD o DMB y que maneja la frecuencia en términos de porcentaje se encontró que las deleciones en los exónes 45-48 son de las más frecuentes reportadas con 33%, los exónes 46-47 tienen 25% de frecuencia, los exónes 51-52 tienen menos del 6% y para el exón 50 la frecuencia es del 7%, estos porcentajes son para cada clase de deleción tomada como grupos de: cinco exónes deleteados, de cuatro, de tres, de dos, y de un exón deleteado [45]. Hay un reporte francés más reciente donde se observó una frecuencia para el grupo de exónes 45-48 de 63% y ésta se manifiesta principalmente en pacientes de DMB [46].

Se puede considerar que hay una buena probabilidad de encontrar deleciones de las clases manifestadas en este trabajo, en cualquier muestra como la presente, sin embargo las deleciones de los pacientes 7 y 8, reportadas aquí podría esperarse no haberlas encontrado, debido a su baja frecuencia de aparición en otras poblaciones diferentes a la mexicana y una probable explicación a esto es la acción del "draft" genético que distribuye de manera diferente las deleciones en las poblaciones humanas [45,46].

Las alteraciones encontradas en los pacientes afectados por las mutaciones en el gen

DMD van de fenotipos severos de DMD hasta manifestaciones casi asintomáticas con calambres y ligera debilidad muscular, los principales grupos de síntomas caen dentro de DMD o DMB, y el establecimiento de la diferencia entre estas formas alélicas se puede dar por la hipótesis de Monaco 1988 [38].

Con todo lo anterior y para propósitos de este reporte el haber encontrado las deleciones de los pacientes: 4 (exónes 45-48), 5 (exónes 46-47), 7 (exónes 51-52) y 8 (exón 50) es significativo puesto que solo se contó con un dato clínico, el del diagnóstico de DMD para todos los siete pacientes con los que se trabajó.

El curso que seguirán los pacientes 4 y 7 es el de DMB y para el paciente 5 es de DMD. La deleción del exón 50 en el paciente 8, esta asociada a cierta variación fenotípica [47,48], y se propone el mecanismo de salto de exón con involucramiento de las secuencias intrónicas, quizás cualquiera de los intrones 49 o 50 para explicarla, esto sucede no sólo en esta región del gen, incluso el número de exónes saltados puede ser más de uno [49].

La estructura y función de este gen es muy compleja debido a que tiene puntos calientes de recombinación, inserción de un elemento transposón, duplicaciones, activación de sitio de empalme crípticos de regiones intrónicas, mutaciones puntuales y empalme alternativo para la generación de isoformas proteicas de distrofina [50,51,52,53,54,55].

Las deleciones grandes son las más frecuentes en el gen DMD y el método aquí descrito representó una buena opción para encontrarlas. Con lo que respecta a los individuos sin deleciones es necesario la inclusión de una prueba múltiple que

permita evaluar el punto caliente menor ( exónes 2-10 ) o diversas metodologías que permitan identificar mutaciones puntuales.

Estas mutaciones se distribuyen uniformemente a lo largo del gen, sin embargo hay mayor número de ellas en la región 3' del gen DMD [54]. Se cree que estas mutaciones pueden impedir la transcripción de ARNs que codifican para isoformas de la distrofina asociadas a diferentes estructuras del sistema nervioso central y se cree que su ausencia pudiera estar asociada a algún grado de retraso mental. Se ha descrito que la distrofina en estos tejidos forma agrupaciones complejas de señalización con proteínas del complejo distrofina-glicoproteína y con proteínas asociadas a distrofina y así puede tener participación en la regulación de la plasticidad sináptica y en el desarrollo de estos tejidos como describe Mehler 2000 [56].

## IZT.

La identificación de las mutaciones y en particular de las eliminaciones del gen DMD ha ayudado al esclarecimiento de las funciones del gen y su expresión en los diferentes tejidos y eventualmente para entender su relación con otros genes.

Para concluir nos referiremos a lo adecuado que es la técnica PCR-múltiple para la búsqueda preliminar de mutaciones y este trabajo lo demuestra y añadiendo a lo anterior el establecimiento del tipo de frontera de exón que resulta del evento mutacional podemos avanzar en el pronóstico de la enfermedad de estos pacientes. En adición la evidencia en el sentido de ubicar la distrofina y sus isoformas en el SNC han ampliado el panorama en la investigación de este extraordinario gen.

## REFERENCIAS

- [1] Emery A. E. H. , 1993. Duchenne Muscular Dystrophy. 2<sup>nd</sup> edition. Oxford University Press, Oxford.
- [2] Dimauro S. : Genetics Diseases of Skeletal Muscle in Jackson, L. G., and Schimke R. N. ( ed. ): Clinical Genetics. John Wiley & Sons, 1979, p 373. N. Y.
- [3] Porter J. D. (2000) Introduction to Muscular Dystrophy. *Micros Res Technic* 48, 127-130
- [4] Matsumura K., Tome F. M., Collon H., Azibi K., Chouch M., Kaplan J. C. et al. (1992) Deficiency of the 50K dystrophin-associated glycoprotein in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *Nature* 359, 320-322.
- [5] Piccolo F., Roberds S. L., Jeanpierre M., Leturcq F., Azibi K., Beldjord C. et al. (1995) Primary adhalinopathy: a common cause of autosomal recessive muscular dystrophy of variable severity. *Nat Genet* 10, 243-245.
- [6] Montanaro F., Lindenbaum M. and Carbonetto S. (1999)  $\alpha$ -dystroglycan is a laminin receptor involved in extracellular matrix assembly on myotubes and muscle cell viability. *J Cell Biol* 145, 1325-1340.
- [7] Williamson R. A., Henry M., Daniels K. J., Hrstka R. F., Lee J. C., Sunada Y. et al. (1997) Dystroglycan is essential of early Embryonic development: disruption of Reichert's membrane in *Dagl*-null-mice. *Hum Mol Gen* 6, 831-841.
- [8] Crosbie R. H., Heighway J., Venzkelee J. C. and Campbell K. P. (1997) Sarcospan, the

- 25-KDa transmembrane component of the dystrophin complex. *J Biol Chem* 272, 31221-31224.
- [9] Emery A. E. H. 1987. *Duchenne Muscular Dystrophy*. Oxford University Press.
  - [10] Moser H. (1984) Duchenne muscular dystrophy: Pathogenetic aspect and genetic prevention. *Hum Genet* 66, 17-40.
  - [11] Rowland L. P. (1980) Biochemistry of muscle membranes in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 3, 3-20.
  - [12] Worton R. G. (1987) Molecular Analysis of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *BioEssays* 7, 318-320.
  - [13] Worton R. G. and Burghes A. H. M. (1987) Molecular genetics of Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Int Rev Neurobiol* 29, 1-75.
  - [14] Walton J. N. (1956) Amyotonia congenita, a follow-up study. *Lancet* i, 1023-1027.
  - [15] Dubowitz V. 1978. *Muscle disorders in childhood*. Saunders, London.
  - [16] Buchthal F., and Rosenfalck P. 1963. Electrophysiological aspects of myopathy with particular referents to progressive muscular dystrophy. In *Muscular dystrophy in man and animals* ed. G. H. Borne and M. N. Gdartz, pp. 193- 262.
  - [17] Johnson M. A., Polgar J., Weightman D., and Appleton D. (1973) Data on the distribution of fiber types in thirty-six human muscles an autopsy study. *J Neurol Sci* 18, 111-129.
  - [18] Canún S.: Trastornos ligados al cromosoma "X" en Guisar-Vázquez J., Avila J. J., (ed): *Genética clínica segunda ed*. Editorial El Manual Moderno 1994, p. 273 México D. F.
  - [19] Walton J. N. (1957) The inheritance of muscular dystrophy. *Acta Genet (Basel)* 7,

318-320.

- [20] Chelly J., Marlhens F., Le Marec B., Jeanpierre M., Lambert M., Hamard G. et al. (1986) De novo DNA microdeletion in a girl with Turner syndrome and Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet* 74, 193-196.
- [21] Berg B. O. and Conte F. (1974) Duchenne muscular dystrophy in a female with a structurally abnormal X-chromosome. *Neurology* 24, 356 ( Abstract ).
- [22] Monaco A. P. and Kunkel E. P. (1988) Cloning of the Duchenne/Becker muscular dystrophy locus. In: Harris H., Hirschorn K. eds. *Advances in Human Genetic*, vol. 17. New York: Plenum, pp. 61-98.
- [23] Koenig M., Hoffman E. P., Bertelson C. P., Monaco A. P., Feener C. and Kunkel L. M. (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.
- [24] Burmeister M., Monaco A. P., Guillard E. F., van Omen G. J. B., Affara N. A., Ferguson-Smith M. A., et al. (1988) A 10-megabase physical Map of human Xp21, including the Duchenne muscular dystrophy gene. *Genomics* 2, 189-202.
- [25] Passos-Bueno M. R., Rapaport D., Love D., Flint T., Bortoline E. R., Zats M. et al. (1990) Screening of deletions in the dystrophin gene with the cDNA probe Cf22a, Cf56a and Cf 115. *J. Med Genet.* 27, 145-150.
- [26] Watkins S. C., Cullen M. J., Hoffman E. P. and Billington L. (2000) Plasma Membrane Cytoskeleton of Muscle: A Fine Structural Analysis. *Microsc. Res. Technic.* 48, 131-141.

- [27] Bies R. D., Phelps S. F., Cortez M. D., Roberts R., Caskey C. T., and Chamberlain J. S. (1992) Human and murine dystrophin mRNA transcripts are differentially expressed during skeletal muscle, heart and brain development. *Nucleic Acids Res* 20, 1725-31.
- [28] Koenig M., Monaco A. P., and Kunkel L. M. (1988) The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 53, 219-228.
- [29] den Dunnen J. T. Dystrophin isoforms. [Programa de computadora]. Leiden (NL): Leiden Muscular Dystrophy Pages; 2002. En Internet <http://www.dmd.nl/isoforms.html>
- [30] Beggs A. H. and Kunkel L. M. (1990) Improved diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy. *J Clin Invest* 85, 613-619.
- [31] Arenas D. J. 1996. Análisis Molecular del gen de la Distrofia Muscular de Duchenne. Tesis Doctoral. UNAM. México D. F.
- [32] Lindlöf M., Kiuru A., Kääriäinen H. Kalimo H. Lang H. Pihko H. et al. (1989) Gene deletions in X-linked muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 44, 496-503.
- [33] Gilgenkrantz H., Chelly J., Lambert M., Rècan D., Barbot J. C., van Ommen G. J. B. et al. (1989) Analysis of molecular deletion with cDNA probes in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Genomics* 5, 574-80.
- [34] Cooke A., Lanyon W. G., Wilcox D. E., Dornan E. S., Katakai A., Gillard E. F. et al. (1990) Analysis of Scottish Duchenne and Becker muscular dystrophy families with dystrophin cDNA probes. *J Med Genet* 27, 292-7.
- [35] Covone A. E., Lerone M., and Romeo G. (1991) Genotype-phenotype correlation and germiline mosaicism in DMD/BMD patients with deletions of the dystrophin gene. *Hum Genet* 87, 353-60.

- [36] Chamberlain J. S., Gibbs R. A., Ranier J. E., Nguyen P. N. and Caskey C. T. (1988)  
Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA  
amplification. *Nucleic Acids Res* 16, 11141-11156.
- [37] Beggs A. H., Koenig M., Boyse F. M. and Kunkel L. M. (1990) Detection of 98% of  
DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet* 86, 45-48.
- [38] Monaco A. P., Bertelson C. J., Diechti-Gallati S., Moser H. and Kunkel L. M. (1988)  
An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions  
of the DMD locus. *Genomics* 2, 90-95.
- [39] Bushby K. M. D., Gardner-Medwin D., Nicholson L. V., Johnson M. A., Haggerty I. D.,  
Cleghorn N. J. et al. (1993) The clinical, genetic and dystrophin characteristic of Becker  
muscular dystrophy 2. Correlation of phenotype with genetic and protein abnormalities.  
*J Neurol* 240, 105-112.
- [40] Kempter B. (1992) Quick preparation of high molecular weight DNA by freezing. *TIG* 8,  
7-8.
- [41] Arenas D., Coral R., Cisneros B., Peñaloza L., Salamanca F., Kofman S. et al. (1996)  
Carrier detection in Duchenne/Becker muscular dystrophy, using dinucleotide repeats  
polymorfysmph. A study in Mexican families. *Arch. Med. Resch.* 27, 151-156.
- [42] Coral R., Arenas D., Cisneros B., Peñaloza L., Salamanca F., Kofman S. et al. (1997)  
Patter of deletions of dystrophin gene in Mexican Duchenne/Becker muscular dystrophy  
patients: the uses a new designers primers for the analysis of the mayor deletion "hot  
spot" region. *Am. J. Med. Genet.* 70, 240-246.

- [43] Roberts R. G., Coffey A. J., Bobrow M., and Bentley R. D. (1993) Exon Estructure of the Human Dystrophin gene. *Genomics* 16, 536-538.
- [44] Katayama S., Takeshita N., Yano T., Ubagai T., Qiu X., J., Katagiri Y. et al. (1993) Deletion Detection for Diagnosis of Duchenne Muscular Dystrophy in the Japanese population-comparison Between the polimerase chain reaction and the sothern blot analysis-. *Jap J Hum Genet* 38, 177-184.
- [45] Danieli G. A., Mioni F., Müller C. R., Vitiello L., Mostacciuolo M. L. and Grimm T. (1993) Patterns of deletions of the dystrophin gene in different European populations. *Hum Genet* 91, 342-346.
- [46] Tuffery S., Chambert S., Bareil C., Sarda P., Coubes Ch., Echenne B. et al. (1998) Mutation analysis of the dystrophin gene in Southern French DMD or DMB families: from Souther blot to protein truncation test. *Hum Genet* 102, 334-342.
- [47] Baumbach L. L., Chamberlain J. S., Ward P.A., Farwell N. J. and Caskey C. T. (1989) Molecular and clinical correlations of deletions Leading to Duchennens and Becker muscular dystrophy. *Neurology* 39, 465-474.
- [48] Koenig M., Beggs A. H., Moyer M., Scherpf S., Heindrich K., Bettecken T. et al. (1989) The molecular basis for Duchennens versus Becker Muscular Dystrophy: Correlation of Severity with type of Deletion. *Am J Med Genet* 45, 498-506.
- [49] Sherratt T. G., Vulliamy T., Dubowitz V., Sewry C. A. and Strong P. N. (1993) Exon Skipping and Translation in Patients with Frameshift Deletions in the Dystrophin gene. *Am J Hum Genet* 53, 1007-1015.

- [50] Oudet C., Hanauer A., Clemens P., Caskey T. and Mandel J. L. (1992) Two hot spot of recombination in the DMD gene correlate with the deletion prone regions. *Hum Mol Gen* 1, 599-603.
- [51] Pizzuti A., Pieretti M., Fenwick R. G., Gibbs R. A. and Caskey C. T. (1992) A Transposon-like Element in the Deletion-Prone Region of the Dystrophin gene. *Genomics* 13, 594-600.
- [52] Hu X., Ray P. N., Murphy E. G., Thompson M. W. and Worton R. G. (1990) Duplicational Mutation at the Duchennens Muscular Dystrophy Locus: Its Frequency, Distribution, Origin, and PhenotypeGenotype Correlation. *Am J Hum Genet* 46, 682-695.
- [53] Ikezawa M., Nishino I., Goto Y., Miike T. and Nonaka I. (1998) Newly Recognized Exon Induced by a Splicing Abnormality from an Intronic Mutation of the Dystrophin Gene Resulting in Duchenne Muscular Dystrophy. *HUM MUTAT Mutation in Brief* 213, 1-4.
- [54] Kekou K., Mavrou A., Florentin L., Youroukos S., Zafiriou D. I., Skouteli H. N. et al. (1999) Screening for minor changes in the distal part of the human dystrophin gene in Greek DMD/DMB patients. *Eur J Hum Genet* 7, 179-187.
- [55] Feener C. A., Koenig M. and Kunkel L. M. (1989) Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature* 338, 509-511.
- [56] Mehler M. F. (2000) Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. *Brain Res Rev* 32, 277-307.