

00387



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

ESPECTRO DE LAS MUTACIONES EN EL GEN DMD Y
CORRELACIÓN FENOTIPO-GENOTIPO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A

M. EN C. MIGUEL ANGEL ALCÁNTARA ORTIGOZA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LORENA SOFÍA OROZCO OROZCO

MÉXICO, D.F.



FEBRERO, 2005

m340630



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Miguel Angel Alcántara

Ortigoza

FECHA: 31 de enero del 2005

FIRMA:

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 31 de octubre del 2003, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado del Doctorado en Ciencias del alumno(a) Miguel Angel Alcántara Ortigoza, con número de cuenta 85327038 y número de expediente 3961003, con la tesis titulada: "Espectro de las mutaciones en el Gen DMD y correlación Fenotipo-Genotipo", bajo la dirección del (la) Dra. Lorena Sofía Orozco Orozco.

Presidente:	Dr. Fabio Abdel Salamanca Gómez
Vocal:	Dra. Martha Patricia Ostrosky Shejet
Vocal:	Dra. Susana Helena Kofman Epstein
Vocal:	Dr. Salvador Armendarés Sagrera
Secretario:	Dra. Lorena Sofía Orozco Orozco
Suplente:	Dra. Sara Frías Vázquez
Suplente:	Dr. Alfonso Miguel Torre Blanco

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 12 de mayo de 2004

Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

La realización de esta tesis contó con el apoyo del Programa de Becas Nacionales de la Dirección General de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México. Asimismo, el presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Investigación en Genética Humana perteneciente al Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud; bajo la dirección de la **Dra. LORENA SOFÍA OROZCO OROZCO**, jefe de dicho laboratorio y los asesores **Dra. SARA FRÍAS VÁZQUEZ**, subdirectora de Medicina Experimental, del mismo Instituto y el **Dr. FABIO ABDEL SALAMANCA GÓMEZ**, jefe de la División de Investigación en Genética Médica, del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

In memoriam

Sra. Guadalupe Sandoval Vda. de Alcántara

Mtra. Q.F.B. Angelita Godínez

*Mtro. Dr. Pedro Armando
Fernández Vargas*



Dignum laude virum musa betat mori

ESPERO CURARME DE TI en unos días. Debo dejar de fumarte, de beberte, de pensarte. Es posible. Siguiendo las prescripciones la moral en turno. Me receto tiempo, abstinencia, soledad.

¿Te parece bien que te quiera nada más una semana? No es mucho, ni es poco, es bastante. En una semana se puede reunir todas las palabras de amor que se han pronunciado sobre la tierra y se les puede prender fuego. Te voy a calentar con esa hoguera del amor quemado. Y también el silencio. Porque las mejores palabras del amor están entre dos gentes que no se dicen nada.

Hay que quemar también ese otro lenguaje subversivo del que ama. (Tú sabes como te digo que te quiero cuando digo: "que calor hace", "dame agua", "¿sabes manejar?", "se hizo de noche"... Entre las gentes, a un lado de tus gentes y las mías, te he dicho "ya es tarde", y tú sabías que decía "te quiero".)

Una semana más para reunir todo el amor del tiempo. Para dártelo. Para que hagas con él lo que tú quieras: guardarlo, acariciarlo, tirarlo a la basura. No sirve, es cierto. Sólo quiero una semana para entender las cosas. Porque esto es muy parecido a estar saliendo de un manicomio para entrar a un panteón.

Jaime Sabines

Recuento de Poemas 1950 / 1993

A Ariadna, la maestra, la esposa, la mujer emprendedora. Gracias por permitirme ser parte de tus proyectos.

A mis padres Miguel Angel y Ernestina, hermanos Miguel Sebastián, Mariana, Marisol, Fanny y a mi tía Graciela por toda su tolerancia, cariño y cuidados. A mi admirable y talentoso hermano Miguel Alonso, digno ejemplo de superación, tesón y nobleza. A Miguelín por ser la alegría renovada de todos nosotros.

A los Sres. Roberto González y Estela del Angel por la generosidad que les caracteriza, cualidad omnipresente en cada uno de los proyectos recientemente emprendidos.

A las familias González Velázquez, González Téllez y González Martín del Campo, por las múltiples muestras de solidaridad.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lorena Orozco por haberme aceptado como su alumno en el campo fascinante de la Biología Molecular y la Genética Humana. Gracias por compartir su experiencia y conocimientos, así como por sus muestras de tolerancia, apoyo y confianza para la realización del proyecto.

A los Dres. Sara Frías y Fabio Salamanca por todas sus enseñanzas y su imprescindible ayuda para la realización del presente trabajo.

A mis sinodales Dr. Salvador Armendares, Dra. Patricia Ostrosky y Dr. Alfonso Torre Blanco, que hecho aparte de sentirme honrado ante un Jurado de tal envergadura, de ellos he recibido continuamente el impulso necesario para concluir esta meta.

A la Dra. Susana Kofman, por haber fungido como factor determinante en mi vocación. A usted, también el agradecimiento perenne de mi familia.

A mi maestro, Dr. Gilardo Espinosa de Luna, por su valiosa amistad, asesoría, confianza, enseñanzas y apoyo otorgado siempre.

A la M. en C. Gabriela Gutiérrez L. por su herencia dentro del proyecto.

A mi maestro, y aún mejor amigo, Manuel Moreno, por tus enseñanzas y tu lealtad en los momentos difíciles. Estaré siempre en deuda contigo.

Especial mención merecen mis amigos la Sra. Araceli Romero, Elizabeth Hernández, Ofelia Niño de Rivera, David Cruz Robles y Miguel Angel Reyes López, a los cuales tuve la enorme fortuna de conocerlos en este laboratorio y cuya amistad contribuyó de forma notable para salir airoso en lo académico, laboral, emocional y tantísimas cosas que sería pretencioso enlistar a cada una de ellas. Gracias de todo corazón por comulgar con todas mis alegrías y tristezas. Asimismo a mis amigos y compañeros de aquella época dorada de los estudios del posgrado, los doctores Angélica González Oliver y Gabriel López Velázquez, por brindarme su amistad desinteresada salpicada de fidelidad, confianza, felicidad, apoyo, tolerancia, y enseñanzas. A todos ustedes: *verae amicitiae sempiternae sunt*.

Al los Dres. Alessandra Carnevale, Victoria del Castillo Ruíz, Carlos Piña, Camilo Villaroel, Laura Flores, Mariví Cervera, Arturo Pichardo, Georgina Arteaga, Eimy Yokoyama, Rocío Arce, Roberto Avendaño, Ricardo García Cavazos, Esther Liberman, Ofelia Niño de Rivera, Sonia Canún, Hortensia Valdés, Horacio Reyes Vivas, Carlos Galaviz, Edna Aizpúru y Dora Mayén, así como a todo el Laboratorio de Citogenética y de Cultivo de Tejidos de este Instituto, por brindarme sus enseñanzas, confianza y sobre todo, por la amplia difusión otorgada al presente trabajo.

A mis amigos y compañeros de trabajo del Laboratorio de Biología Molecular, especialmente al Q.F.B. Ricardo Lee Hernández, la M. en C. Silvia Jiménez, el Dr. David Ortíz Dávila de Montellano, la M. en C. Cesárea Bermúdez cuales tuvieron a bien tenerme en cuenta como amigo, el apoyarme a diario y

hacerme saber que siempre podré tener en ellos alguien de absoluta confianza. También deseo agradecer a la M. en C. Yolanda Saldaña, el M. en C. Rafael Velázquez, el Biol. Julián Ramírez, Leticia Ramírez, Coty, la Q.F.B. Guadalupe Salas, el M. en C. Miguel Macías y la M. en C. Margarita Chávez.

A los Dres. Dora Gilda Mayén, Marissell Gómez, Edna Aizpuru, Patricia Grether, Gildardo Zafra y Ricardo García Cavazos por habernos honrado con su confianza para el trabajo conjunto. Gracias por contribuir a la cristalización de una de mis aspiraciones más anheladas.

A los Dres. Sonia Canún, Gildardo Zafra, Carmen Navarrete, Alicia Cervantes y Sara Frías por permitirme tener el honor de colaborar con ustedes dentro del Consejo Mexicano de Genética A.C.

A mis alumnos de tesis, cuyo trabajo contribuyó al desarrollo del proyecto: Carlos Todd Quiñones, Beatriz Acevedo y Esmeralda Lira Romero. Gracias por su paciencia y empeño.

A mis inolvidables maestras de Biología durante mi bachillerato, las Biol. Josefina Avilés y Olga Noguera Farfán; por haber inculcado en mí los primeros cimientos de mi actual disciplina y particularmente por su valiosa amistad a lo largo de varios lustros.

A mis maestros Dr. Ramón F. Ramos Carrasquedo, Dr. Arturo Panduro, Dr. Gustavo Cabrera, Dr. Joaquín López Bãrcenas, Dra. Cristina Márquez, Dr. Juan C. Bãez, Dr. Joaquín Hernández, Dr. Marco Antonio Durán, Dr. Daniel Rodríguez Álvarez, Dr. Pablo Abrego y la M en C. Gabriela Guzmán, que siempre inculcaron en mí la necesidad de la investigación científica y su trascendencia en los problemas de salud nacional.

A mis exalumnos de la Opción de Técnico en Histopatología, generación 2001, por su entrega, por su compromiso académico, eterna amistad y por haberme contagiado fugazmente de esa jovial alegría; muy en particular a Chillón, Bruno, Rosa, Lucero, Melissa, ambas Dianas, "Flies", Belém, Dulce, Tonatiuh y Genaro.

A Fundación UNAM por su valioso apoyo en los albores de mis estudios de postgrado.

Al Programa Maimónides de Facultad de Medicina, UNAM por haberme honrado como un beneficiario de un proyecto de gran trascendencia. Definitivamente sin su ayuda desconozco si estaría escribiendo esto.

Al Instituto Nacional de Pediatría, S.S. que siempre me brindó todas las concesiones para poder llevar al cabo mis estudios de posgrado y a la vez permitirme integrar a tan prestigiosa Institución.

Al Centro de Rehabilitación Infantil TELETÓN Tlalnepantla.

A las enseñanzas de mis ex-alumnos del curso de pregrado de Genética Médica de la Facultad de Medicina, UNAM, pues gracias a ellos me mantendré en el camino del aprendizaje de la genética.

A todas las familias que confiaron en nosotros y aceptaron participar en este proyecto, buscando una alternativa de ayuda para sus padecimientos. A todos ellos, gracias y creemos sinceramente no haberlos defraudado.

A nuestra Máxima Casa de Estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, institución formadora de conciencias. A ella nuestro agradecimiento, no sólo en lo particular sino de cada uno de los integrantes de mi núcleo familiar. A ti, nuestra alma mater, gracias por tu generosidad sin paralelo en el acceso, creación y difusión del conocimiento universal.

ÍNDICE

	PÁGINA
LISTA DE ABREVIATURAS	1
LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE TABLAS	4
RESUMEN	5
SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN	9
JUSTIFICACIÓN	39
OBJETIVOS	40
MATERIAL Y MÉTODOS	41
I. Estrategia General	41
II. Población Objetivo y Estudio Clínico	44
III. Criterios de Inclusión y Exclusión	45
IV. Estudio Molecular	46
IV.a. Extracción de DNA	46
IV.b. Síntesis de oligonucleótidos iniciadores F y R	47
IV.c. Reacción de PCR-M	47
IV.d. Electroforesis de los productos de la PCR-M en geles de agarosa	49
IV.e. Reacción de PCR-MC	49
IV.f. Electroforesis de los productos de la PCR-MC en geles de poliacrilamida	50
IV.g. Determinación de dosis génica	51
IV.h. Análisis de RFLPs / VNTRs	52
IV.i. Diagnóstico prenatal molecular de DMD/DMB	53

IV.j. Diagnóstico molecular para la exclusión de paternidad	54
V. Correlación Fenotipo-Genotipo	55
RESULTADOS	57
I. Caracterización de las deleciones en pacientes DMD/DMB	
mediante PCR-M	57
II. Detección de Portadoras	64
IIa. Dosis génica en familias con deleción:	
Análisis con PCR-MC	64
IIb. Análisis de ligamiento (detección indirecta de portadoras)	69
III. Asesoramiento Genético y Diagnóstico Prenatal	75
DISCUSIÓN	83
CONCLUSIONES	101
Anexo 1	102
Anexo 2	105
Anexo 3	111
BIBLIOGRAFÍA	117

ABREVIATURAS

a.a.	aminoácido
AG	asesoramiento genético
AHF	antecedentes heredofamiliares
C	dominio C-terminal de la distrofina
cDNA	DNA complementario
C.L.:	relación acrilamida:bis-acrilamida de la cual depende la dimensión del poro de los geles de poliacrilamida o también llamada "cross-link".
cM	centimorgan
CML	corrimiento del marco de lectura
cols.	colaboradores
CPK	creatinínfosfocinasa
CYS	dominio rico en cisteínas de la distrofina
Δ	delección
D.O.	densidad óptica
DAG	glicoproteína asociada a distrofina
DAP	proteína asociada a distrofina
DGAC	complejo glicoproteico asociado a distrofina
DM	distrofias musculares
DMB	distrofia muscular tipo Becker
DMD	distrofia muscular tipo Duchenne
DMI	distrofinopatía con fenotipo intermedio
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	mezcla de los cuatro 2-desoxirribonucleótidos, 5-trifosfato de adenina, guanosina, timina y citosina
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
F	forward
FISH	hibridación <i>in situ</i> fluorescente
H1-H4	dominios bisagra de la distrofina
ICHs	intercambio de cromátides hermanas
kb	kilobases
kDa	kilodaltones
LA	líquido amniótico
LDH	lactatodeshidrogenasa
Mb	megabases
PCR-M	reacción en cadena de la polimerasa múltiple
PCR-MC	reacción en cadena de la polimerasa múltiple cuantitativa
<i>mdx</i>	modelo murino de distrofinopatía
mRNA	RNA mensajero
Pm	promotor muscular del gen de distrofina
N	dominio N-terminal de la distrofina
ND	no determinado
NM	no mencionado
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa

pERT	del inglés "phenol-enhancement recovery technique"
Pm	promotor muscular
PO	portadora obligada
R	reverse
RFLPs	fragmentos de restricción de longitud polimórfica
rpm	revoluciones por minuto
RNA	ácido ribonucleico
RT-PCR	reverso-transcripción acoplada a PCR
SDG	semanas de gestación
SDS	dodecilsulfato de sodio
SG	sarcoglicano
SNPs	polimorfismos de un solo nucleótido
SSCP	Polimorfismos Conformacionales de Cadena Sencilla
STRs	secuencias cortas repetidas en tandem (DNA microsatélite)
T	polimorfismo RFLP pERT87.8/ <i>TaqI</i>
TBE	amortiguador de Tris-borato-EDTA
TE	amortiguador de Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
<i>T_m</i>	temperatura teórica calculada para alineación de un oligonucleótido iniciador.
UI	unidades internacionales
UTR	región no traducible del mRNA
V	volts
VNTRs	secuencias repetidas en tandem de número variable (DNA minisatélite)
X	polimorfismo RFLP pERT87.15/ <i>XmnI</i>

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Paciente con distrofia muscular de Duchenne y signo de Gowers.	12
Figura 2. Histopatología de la biopsia muscular de un paciente con DMD.	14
Figura 3. Ubicación del gen DMD en el cromosoma X del humano.	19
Figura 4. Principales promotores en el gen DMD.	20
Figura 5. Esquema de la organización por dominios de la isoforma muscular de 427 kDa de distrofina.	22
Figura 6. Organización del complejo distrofina / DGAC en tejido muscular estriado.	23
Figura 7. Patrón por inmunofluorescencia de la distrofina y los cuatro sarcoglicanos en seis formas autosómico recesivas de LGMD.	25
Figura 8. Estudio de inmunofluorescencia e inmunoblot de distrofina en biopsias musculares de DMD/DMB.	33
Figura 9. Análisis del gen DMD por PCR múltiple ampliada (9-plex y 9-plex).	35
Figura 10. Algoritmo Metodológico.	43
Figura 11. Integridad de DNA genómico evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa.	58
Figura 12. Ensayo de PCR-M de 22 exones del gen DMD.	59
Figura 13. Frecuencia y distribución de las deleciones en pacientes DMD/DMB.	60
Figura 14. Análisis de PCR-M de 17 exones en tres pacientes DMD con grandes deleciones.	61
Figura 15. Árbol genealógico de una familia con variabilidad intrafamiliar.	63
Figura 16. Dosis génica en mujeres emparentadas a un caso familiar de DMB por una deleción de los exones 3-6.	65
Figura 17. Dosis génica en mujeres emparentadas a un caso familiar de DMB por una deleción de los exones 45-47.	66
Figura 18. Dosis génica en mujeres emparentadas a un caso único de DMD afectado de una deleción que involucra la región 5' y central del gen.	67

Figura 19.	Origen de las deleciones en pacientes mexicanos con DMD.	68
Figura 20.	Análisis de los polimorfismos MP1P, pERT87.8/ <i>TaqI</i> y pERT87.15/ <i>XmnI</i> .	70
Figura 21.	Frecuencias alélicas de los tres polimorfismos estudiados en la población estudiada.	71
Figura 22.	Exclusión de alelo de riesgo en una familia con DMD con caso único sin deleción.	72
Figura 23.	Asignación y exclusión del estado de portadora en un caso familiar de DMB sin mutación caracterizada.	73
Figura 24.	Esquema de dos eventos de recombinación.	74
Figura 25.	Documentación de no paternidad en un caso familiar de DMB.	76
Figura 26.	Eficiencia diagnóstica de la PCR-MC y el AL.	77
Figura 27.	Abordaje conjunto del AL y PCR-MC en una familia con caso único atribuible a una deleción de la región 5'.	78
Figura 28.	Diagnóstico prenatal molecular en tres productos masculinos	81
Figura 29.	Diagnóstico prenatal en caso familiar de DMD con producto afectado de una deleción de la región 5'.	82
Figura 30.	Algoritmo metodológico propuesto para el estudio molecular de las familias con DMD/DMB.	100

LISTA DE TABLAS

	PÁGINA	
Tabla 1.	Frecuencias de deleciones reportadas en diferentes grupos étnicos.	28
Tabla 2.	Mutaciones de tipo puntual y microinserciones/microdeleciones reportadas en el gen DMD y sus efectos en la proteína.	30
Tabla 3.	Secuencias de oligonucleótidos	48
Tabla 4.	Resultados del diagnóstico prenatal molecular de DMD/DMB	81
Tabla 5.	Frecuencias alélicas de los polimorfismos pERT87.8/ <i>TaqI</i> y pERT87.15/ <i>XmnI</i> en diferentes poblaciones	91

RESUMEN

Las distrofias musculares tipos Duchenne (DMD) y Becker (DMB) son desórdenes degenerativos del músculo estriado que se heredan en forma recesiva ligada al cromosoma X. Se caracterizan por debilidad muscular progresiva, pseudohipertrofia de los gemelos y elevación en los niveles séricos de la creatininfosfocinasa (CPK). La DMD se presenta con una incidencia de 1 en 3,500 varones nacidos vivos y ocasiona la muerte alrededor de la 2ª década de la vida; la DMB afecta a 1 en 30,000-40,000 y generalmente permite una sobrevivencia mayor. Ambas enfermedades son ocasionadas por mutaciones en el gen que codifica para la proteína distrofina (427 kDa), la cual forma parte del citoesqueleto subsarcolémico de la fibra muscular estriada y cardíaca. El gen consta de 79 exones, abarca 2.4 Mb de la banda Xp21.2 y transcribe un mRNA de 13.5 kb. Las mutaciones que afectan este gen son deleciones parciales (50-70%), duplicaciones parciales (6-8%) y mutaciones puntuales. Las mutaciones tipo deleción y duplicación se generan en dos puntos calientes del gen localizados en la región 5' (exones 1-20) y central (exones 44-55). Existe un consenso que apoya que las mutaciones que conducen a fenotipos DMD ocasionan ausencia total de la distrofina, en tanto que en los fenotipos DMB existe una proteína con función residual.

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se logra identificar el 98% de las deleciones responsables de la enfermedad. Estudios como el Southern blot, el PCR múltiple cuantitativo (PCR-MC) y el análisis del mRNA de distrofina por RT-PCR, permiten la identificación directa de deleciones y de duplicaciones en portadoras. La detección de portadoras de manera indirecta mediante análisis de RFLPs, VNTRs o STRs es de utilidad cuando se desconoce el tipo de mutación presente en el gen.

Actualmente en el INP acuden 176 familias con DMD/DMB a la consulta externa de Genética, de las cuales 132 fueron incluidas en el estudio. Con base en los antecedentes familiares fue posible brindar un asesoramiento genético de certeza al 31.06% (n=41) de las madres, sin embargo éste fue incierto en las hermanas de los pacientes y en todas las mujeres de las familias restantes. En la presente tesis nos propusimos: 1) caracterizar las deleciones que afectan al gen de la distrofina en pacientes con datos clínicos, de laboratorio y gabinete compatibles de distrofinopatía; 2) determinar la frecuencia de las deleciones y su localización; 3) detectar a las portadoras mediante análisis de RFLPs y PCR-MC; 4) conocer la frecuencia de recombinación intragénica derivada de los hallazgos conjuntos de los análisis de RFLPs y PCR-MC; 5) establecer un algoritmo diagnóstico y 7) conocer la eficiencia diagnóstica al utilizar metodología molecular para el asesoramiento genético certero de las DMD/DMB.

Para tal fin se creó un banco de DNA de las familias incluidas en el estudio. Se buscó la presencia de deleciones en los casos índice mediante PCR múltiple de 22 segmentos. A todas las familias y sus integrantes se les realizó análisis de ligamiento por PCR/RFLPs utilizando dos marcadores intragénicos de la región 5' del gen DMD (pERT87.8/*TaqI* y pERT87.15/*XmnI*), así como un marcador tipo VNTR (MP1P) de la región 3' no traducible. Se definieron las frecuencias alélicas para cada uno de los polimorfismos, así como

el índice de informatividad individual y global en las madres de los casos índice. De igual manera, en madres y en familiares femeninos disponibles para el estudio donde se logró identificar una delección, se les realizó la evaluación de dosis génica mediante PCR-MC para excluir o asignar el estado de portadora.

El 53.8% (n=71) de los casos índice presentó delección de uno o más exones localizados en los puntos calientes del gen, y de éstas el 73.2% correspondieron a la región central del gen, cifras que han sido reportadas para otras poblaciones. La correlación genotipo-fenotipo en los casos índice no mostró concordancia con la hipótesis de Mónaco, sin embargo para corroborar esto se requiere de otro tipo de estrategias no desarrolladas en el presente trabajo. El análisis de polimorfismos o RFLPs evidenció que el 81% de las madres fue informativa para al menos un polimorfismo, sin embargo este análisis sólo contribuyó para el asesoramiento genético en un 16.6% de las familias (asignación/exclusión del estado de portadoras en hermanas en casos familiares, exclusión de alelo de riesgo en hermanas de casos esporádicos y detección de un solo evento mutacional *de novo*). En nuestra población se detectó un índice de recombinación intragénica entre los marcadores de la región 5' y 3' del 2.7%. La evaluación de dosis génica por PCR-MC para detección de portadoras permitió el diagnóstico del 100% de madres y hermanas de los casos índice con delección. Con nuestros hallazgos no encontramos ninguna familia que sugiriera la presencia de mosaicismo gonadal. La tercera parte de los casos índice con delección heredaron la mutación de una madre portadora (33.8%) y el resto (66.2%) la adquirió como mutación *de novo*. Este hallazgo sugiere una alta tasa de mutación (tipo delección) en este gen en familias mexicanas.

Nuestros resultados indican que el PCR-MC es un método directo útil para el diagnóstico de portadoras en familias con DMD/DMB, mientras que el análisis de ligamiento utilizando dos RFLPs y un VNTR es un método limitado para brindar asesoramiento genético certero en este padecimiento; sin embargo éste último permitió observar fenómenos de recombinación intragénica y no paternidad en dos familias. Asimismo, con el establecimiento del DP molecular de las DMD/DMB, es imperativo establecer un consenso médico, ético y legal que brinde el apoyo necesario a las familias.

Finalmente, con el presente estudio se logró incrementar en forma significativa la eficiencia de detección de portadoras y el asesoramiento genético; este último se otorgó con certeza en el 70.4% de las familias. Lo anterior, condujo a la implementación del diagnóstico molecular prenatal en 8 mujeres gestantes y la detección de un producto masculino afectado de DMD.

SUMMARY

Duchenne and Becker muscular dystrophies (DMD and BMD, respectively), are the most common and lethal striated muscle degenerative disorders in human beings. These diseases are characterized by progressive muscle weakness predominantly affecting the hip girdle, pseudohypertrophy of calf muscles and elevated serum creatinine phosphokinase (SCPK). DMD has an incidence of 1:3500 live born males, causing death by the second decade of life, while BMD, an allelic milder phenotype, has a lower prevalence (1:30,000 - 40,000) and allows longer survival. Both DMD and BMD are inherited as X-linked recessive traits and there is not a definitive treatment for them.

These so-called dystrophinopathies are originated by mutations in the DMD gene which codes for a protein named dystrophin (427 kDa), a major component of the subsarcolemmal cytoskeleton found predominantly in smooth, skeletal and cardiac muscle. The DMD gene has 79 exons spanning 2.4 Mb in the Xp21.2, the corresponding mRNA is a transcript of 13.5 kb and gives rise to at least seven tissue-specific isoforms. Most common mutations affecting the DMD gene are partial intragenic deletions (50-70%) and duplications (6-8%); point mutations and others may rarely be present. Partial intragenic deletions and duplications often occur at one of two hot spots, which are located in the 5' region (exons 1-20) and in the central region (exons 44-55). Otherwise, there are several evidences supporting that mutations leading a total absence of dystrophin are responsible for the DMD phenotype, whereas mutations leading residual activity of protein are found in BMD phenotype.

DMD/BMD diagnoses are currently implemented by molecular analyses of the DMD gene. Nowadays, up to 98% of large deletions detected by Southern blot analysis are identified by multiplexed polymerase chain reaction (M-PCR). Carrier status determination in families with an identifiable deletion or duplication must rely on the calculation of gene dosage from either Southern blot analysis, quantitative PCR (Q-PCR) or reverse transcription PCR (RT-PCR). All these studies can accurately identify the heterozygous status for a deletion or duplication in female relatives. Carrier status in females of DMD/BMD families with unknown mutations, could be determined by indirect diagnoses through linkage analyses with intragenic markers. Namely, restriction fragment length polymorphisms (RFLPs), variable number tandem repeats (VNTRs) and short tandem repeats (STRs), the main types of intragenic markers, are equally useful.

Currently at the Instituto Nacional de Pediatría, S.S. (INP) attends 176 DMD/BMD families at the Human Genetics Research Department. In this work, we have included 132 families of these families. However, based on pedigree analysis, we defined the obligate carrier status only in 41 mothers (31.06%), but not in other female relatives. Thus, the aims of the present work were: 1) characterize DMD gene deletions in patients fulfilling clinical and laboratory criteria for dystrophinopathy; 2) determine either the frequency of gene deletions in patients with dystrophinopathy and its location along the DMD gene; 3) determine the carrier status in female relatives using gene dosage (Q-PCR) and linkage analyses; 4) find the overall

intragenic recombination frequency out of the results derived conjointly from RFLP and Q-PCR analyses; 5) establish a diagnostic algorithm in our families based on molecular strategies; 6) evaluate the efficiency of the molecular methods in the accurate genetic counseling.

In order to reach these objectives, we created a bank of DNA samples collected from all index cases, their mothers, siblings and some second- and third-degree relatives. Intragenic deletions in index cases were determined analyzing 22 exons through M-PCR assay. Besides, we performed PCR-based linkage analyses on every member of each family; those analyses were carried out by analysis through two RFLP intragenic markers from the 5' region, called pERT87.8/*TaqI* and pERT87.15/*XmnI*; and one intragenic biallelic VNTR marker from the 3' UTR, called MP1P. Allelic frequencies for each marker were calculated; furthermore, the individual and global heterozygosity (a measure of informativeness) displayed by each family's mother were determined. Likewise, all female relatives of index cases in whom a deletion was identified, were tested for gene dosage through MQ-PCR to define carrier status.

Of the 132 studied index cases, 71 (53.8%) showed several patterns of deletion ranging from one exon to loss of whole gene. In according with previous data reported in the literature, DMD gene deletions were found mainly at major hot spot (73.2%). In contrast, phenotype-genotype correlation disagreed with the Monaco's hypothesis. On the other hand, polymorphism analyses revealed that 81% of the mothers were informative for at least one marker; however, such analyses contributed to the genetic counseling of only 16.6% of the studied families (e.g. assignation/exclusion of carrier status for familial cases' sisters, exclusion of at-risk allele in sporadic cases' sisters, and detection of only one *de novo* mutation event). Employing genotype results for intragenic markers in the 5' and 3' regions and even haplotype analysis, we detected only a 2.7% of an intragenic recombination. Besides, Q-PCR method allows us confirm or exclude the carrier heterozygous status of all at-risk female index cases' relatives. None of the families exhibits features of gonadal mosaicism. Also, we confirmed that 33.8% of the index cases where deletion have been identified, inherited this mutation from a carrier mother, while the remain (66.2%) acquired the deletion as a *de novo* event; then most of these deletions were inherited from non-carrier mothers, suggesting that Mexican population exhibits a high frequency of DMD *de novo* deletions.

Our data shown that the Q-PCR is a useful direct method for female carrier detection in DMD/BMD families, whereas the linkage analyses using two RFLPs and one VNTR turned out to be a strategy less efficient. Even though, this last approach allowed us to identify intragenic recombination events and two non-paternity cases.

Finally, within the present study we established a diagnostic algorithm and we were able to improve the efficiency of carrier detection. By this way, 70.4% of DMD/BMD families received an accurate genetic counseling. Subsequently, eighth pregnant women at-risk of being carriers were subjected to molecular prenatal diagnosis; only one DMD male fetus was detected.

INTRODUCCIÓN

Las distrofias musculares (DM) son un grupo de desórdenes primarios del músculo estriado que cursan con debilidad muscular progresiva (1). Este grupo de enfermedades muestra degeneración muscular en pruebas electrofisiológicas (patrón miopático), bioquímicas (elevación de creatinínfosfocinasa o CPK, y otras enzimas de escape) e histopatológicas (cambios distróficos de la fibra muscular) (2,3). Algunos de estos padecimientos cursan con anomalías en otros órganos de la economía como corazón (4) y cerebro (5). La severidad clínica varía ampliamente entre las diversas formas, e incluso dentro del mismo tipo de distrofia muscular se ha descrito variación intrafamiliar (6). La severidad va desde formas letales (distrofia muscular congénita, distrofia muscular de Duchenne o DMD), hasta aquellas que cursan con debilidad de unos cuantos grupos musculares (7). La forma de herencia de estas enfermedades puede ser recesiva ligada al cromosoma X o autosómica recesiva o dominante (8). En ocasiones el diagnóstico diferencial entre los tipos de distrofia muestra dificultades (9). Dado que no existe tratamiento definitivo para las DM, es fundamental su correcta clasificación para establecer el pronóstico, el adecuado asesoramiento genético, el diagnóstico prenatal e inclusive el diagnóstico a nivel de preimplantación (1,10). Definitivamente el avance en el conocimiento de la genética y la biología molecular en las DM ha sido crucial para lograr estos objetivos.

I. CLASIFICACIÓN DE LAS DISTROFIAS MUSCULARES

La clasificación de las DM, se ha realizado con base en las características clínicas como la edad de inicio, la severidad de los síntomas y signos, la progresión, los grupos musculares afectados y el patrón de herencia (7,9). Hasta antes de la década de los sesentas, sólo se consideraban cinco grandes grupos de DM: distrofia muscular de Duchenne /Becker (DMD/DMB), la DM facioescápulohumeral, la DM congénita, la distrofia miotónica y las DM de cinturas o "limb-girdle" (LGMD) (1). La DMD y la distrofia miotónica (MIM #160900), son entidades monogénicas con patrón de herencia mendeliano y cuadro clínico bien definido, cuyos loci responsables fueron identificados en la década de los

ochenta y principios de los noventa (3,11). En las DM de tipo congénito y facioescápulohumeral, se ha reportado heterogeneidad de tipo alélico y no alélico (12,13). Sin embargo, el grupo que ha ofrecido mayor dificultad para su correcta clasificación y detección del defecto genético, corresponde al grupo altamente heterogéneo de las LGMD (8,14).

A pesar de que la actual clasificación basada en hallazgos clínicos y moleculares de las DM contempla una numerosa lista de LGMD y otras DM autosómicas, éstas continúan siendo mucho menos frecuentes que las DM ligadas al cromosoma X (7,15). La DM de origen autosómico más frecuente continúa siendo la DM miotónica (1).

Actualmente la evaluación clínica, genealógica y de laboratorio, acompañada del estudio histoquímico, inmunofluorescencia ó inmunohistoquímica e inmunoblot, permiten llevar a cabo el diagnóstico correcto en la mayoría de las DM (16-19). El conocimiento del gen y su proteína, así como la disponibilidad de anticuerpos específicos, ha permitido establecer una clasificación clínico-molecular de las DM (1,15,17) en: distrofinopatías, distrofias de cinturas tipos 1 y 2, distrofias de cinturas por sarcoglicopatías, distrofias congénitas (clásica: MIM #156225; tipo Fukuyama: MIM #253800), DM facioescápulohumerales (MIM #158900) tipos 1 y 2 y la DM tipo Emery-Dreifuss (MIM #310300).

II. DISTROFIAS MUSCULARES LIGADAS AL CROMOSOMA X

DISTROFINOPATÍAS: ESPECTRO CLÍNICO

Dentro de las DM ligadas al cromosoma X se encuentran la DMD (MIM #310200), la DMB (MIM #300376), la cardiomiopatía dilatada familiar ligada a Xp21 (MIM #302045), los fenotipos intermedios de la DMD, y otros padecimientos musculares que cursan con CPK persistentemente elevadas, calambres y/o mialgias crónicas, pero sin debilidad, ni atrofia musculares (7-9, 20-21). Se estima que las dos primeras constituyen alrededor del 95% de los todos los casos de DM que afectan a las cinturas pélvica-escapular y que cursan con cambios distróficos en la biopsia muscular (9). Estas cifras quizá reflejen el alto grado de

mutabilidad prevalente en el gen DMD (22,23). Asimismo el locus DMD es también responsable de la forma familiar recesiva ligada al cromosoma X de cardiomiopatía dilatada que cursa con afectación mínima del músculo esquelético (24). Las entidades ligadas a Xp21, actualmente se agrupan en el término de distrofinopatías, y se han descrito 5 fenotipos atribuibles a este locus (8):

Distrofinopatía I	DMD
Distrofinopatía II	DMB
Distrofinopatía III	Tipo DM de cinturas, fenotipos intermedios o no clásicos como la miopatía de cuádriceps femoral, miopatía distal, etc.
Distrofinopatía IV	Mialgia y calambres musculares, sin debilidad y atrofia.
Distrofinopatía V	Cardiomiopatía dilatada sin debilidad muscular.

Ila. DMD

La DMD fue descrita inicialmente por Meryon en 1852 y con mayor detalle por Duchenne en 1868, como una distrofia muscular pseudohipertrófica. Esta enfermedad se manifiesta alrededor de los 2 años de edad con trastornos en la deambulación (marcha de pato), caídas frecuentes, mialgias, calambres musculares, incapacidad para correr, saltar y posteriormente para subir escaleras. Los grupos musculares afectados pertenecen primeramente a la cintura pelvifemoral y posteriormente a la escápulohumeral, con lordosis compensatoria, escoliosis y contracturas en talón de Aquiles. También se hacen evidentes la pseudohipertrofia de los gemelos y el signo de Gowers (**Fig. 1**). Alrededor de los 11 y 12 años el paciente pierde la deambulación y el 90% de los casos fallece durante la segunda década de la vida como consecuencia de insuficiencia respiratoria crónica y bronconeumonía (1,3). Se ha reportado que hasta en un 80% de los casos presentan grados variables de cardiomiopatía documentada por evaluación electrocardiográfica y ecográfica u otros estudios dinámicos (25,26), sin embargo sólo en un 10% (pacientes que llegan a la 3ª década de la vida) condiciona la muerte (3,4). Los pacientes con DMD tienen riesgo elevado de desarrollar eventos de hipertermia maligna ante eventos anestésicos (1,27). En el 20-30% de los pacientes el coeficiente intelectual se encuentra por debajo de la población normal (5,9,28). El estudio electromiográfico revela patrón miopático. La CPK

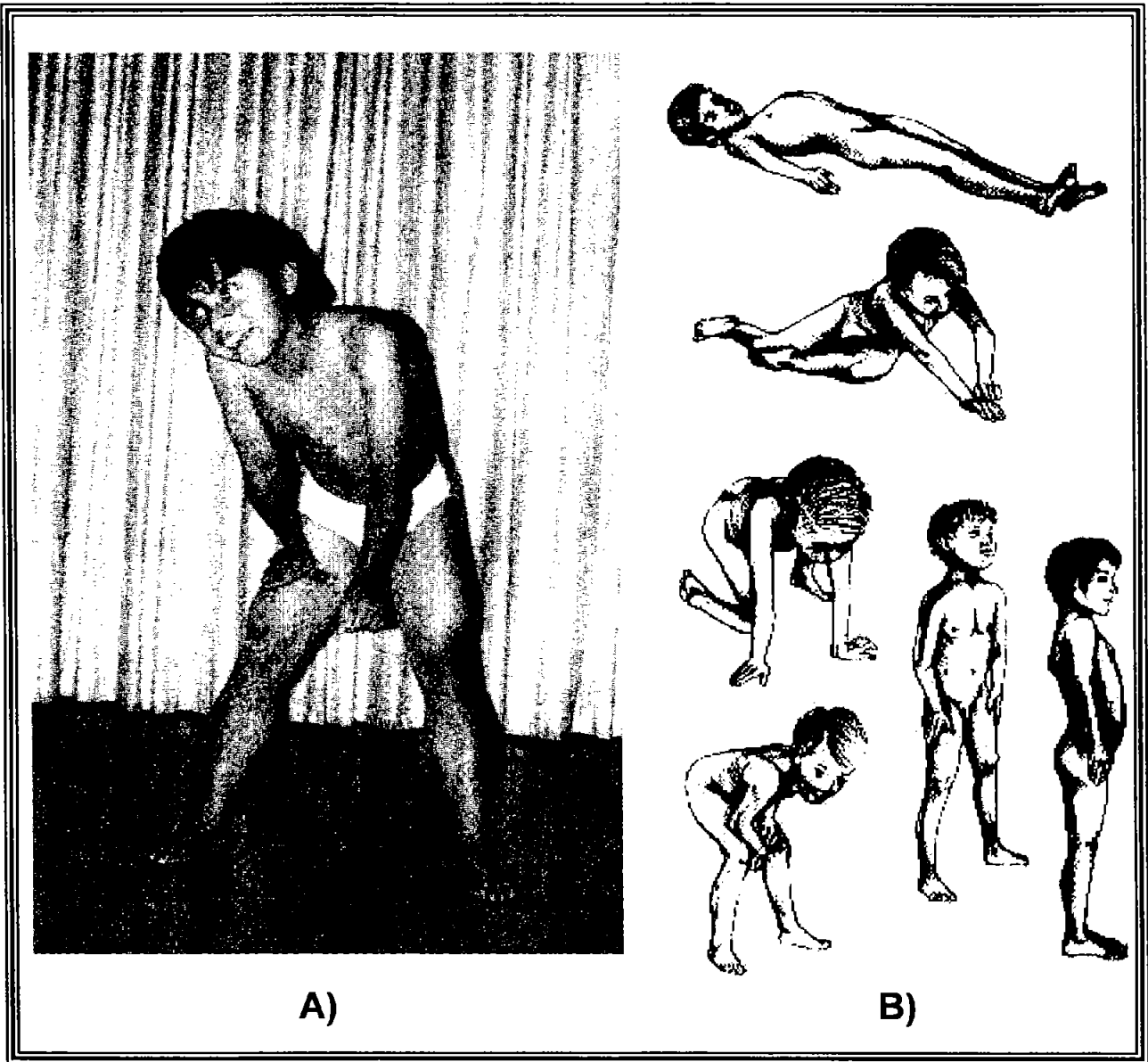


Figura1. A) Paciente con distrofia muscular tipo Duchenne. Se aprecia la franca pseudohipertrofia de gemelos y otros grupos musculares femorales. B) Signo de Gowers que evidencia la debilidad de las masas musculares de cintura pélvica y dorsal común en niños principalmente afectados por fenotipos DMD. La posición en decúbito dorsal en un niño afectado por DMD, pone de manifiesto la dificultad para adoptar la posición supina. Clásicamente inicia con la posición de ambas manos en el piso para obtener el punto de apoyo inicial, seguido de la elevación de ambas rodillas (segundo punto de apoyo); así el peso del tronco es superado y el individuo puede ponerse en pie.

se encuentra elevada de 50 a 100 veces sobre el valor normal al inicio de la enfermedad, pero disminuye progresivamente hacia las etapas finales de la enfermedad como consecuencia de la disminución en la masa corporal del tejido muscular (2). La biopsia muscular presenta cambios distróficos (**Fig. 2**) aún cuando ésta se realiza en fetos o neonatos sin sintomatología (8,18,29). En etapas más avanzadas o terminales se aprecia un reemplazo total del tejido muscular por elementos conectivos y tejido adiposo, estado indistinguible de otros procesos miodegenerativos tardíos (1).

IIb. DMB

Aunque Becker y Kiener en 1955 consideraron a la DMB como una entidad distinta a la DMD, Zellweger y Hanson en 1967, lograron definir que se trataba de una variedad benigna de la forma Duchenne (3). Con el descubrimiento de marcadores genéticos y la clonación del gen se logró afirmar que ambas enfermedades son entidades alélicas (30-32). La frecuencia de esta enfermedad se ha calculado en 3-5 afectados por 100,000, ocurriendo diez veces menos que la DMD (1,3). Otros reportes en poblaciones europeas han calculado una frecuencia mayor (7.2 por 100,000) (33).

En la DMB la progresión de la enfermedad es más lenta, aunque la afección de los grupos musculares es la misma que en la DMD (1). El inicio y progresión de los síntomas es muy variable; éstos pueden ocurrir entre los 5 y 15 años, aunque se han reportado pacientes que inician el padecimiento entre la 3ª y 4ª década de la vida (7). Por definición los pacientes con DMB pierden la capacidad para deambular después de los 16 años (9,15). Aunque algunos de estos casos pueden llevar un patrón de vida normal hasta los 30 o 40 años e inclusive tener capacidad reproductiva, existe una reducción en la esperanza de vida, la cual rara vez va más allá de los 50 años a causa de la cardiomiopatía dilatada característica de los pacientes adultos con DMB (34).

Algunos reportes han manifestado que hasta un 30-40% de los pacientes masculinos clasificados como LGMD sin historia familiar, realmente son distrofinopatías, documentadas por el análisis de la distrofina mediante inmunohistoquímica (8,14,35).

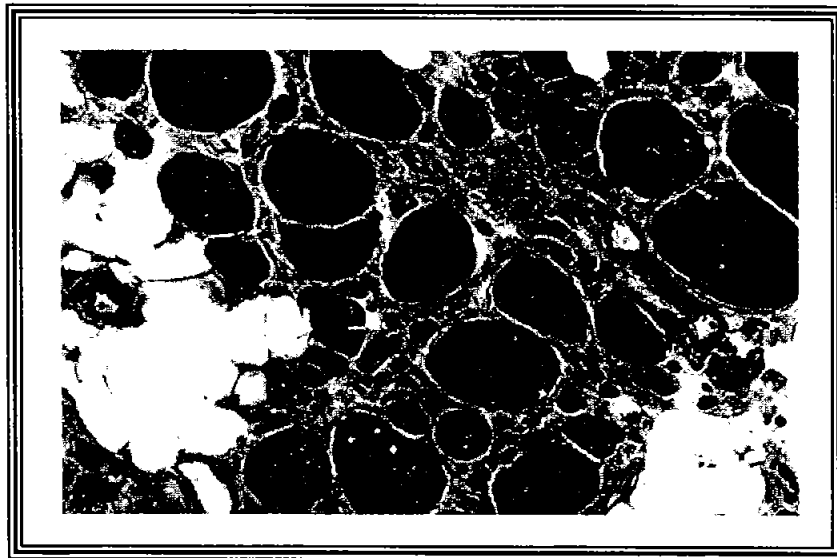


Figura 2. Histopatología de la biopsia muscular de un paciente con DMD. Nótese la sustitución del tejido muscular por elementos conectivos (fibrosis endomisial) y tejido adiposo; así como la degeneración/regeneración e irregularidad del diámetro de las fibras musculares.

IIC. FENOTIPOS INTERMEDIOS (DMI)

En 1983, Brooke describió un grupo de pacientes con DMD que tenían un curso menos agresivo sin llegar a conformar un cuadro de DMB. Estos pacientes iniciaron el cuadro clínico alrededor de los tres años conservando la capacidad para deambular en forma independiente hasta los 12 y 16 años, sin embargo los pacientes fallecían entre los 20 y 30 años (36). En este tipo de pacientes los hallazgos en la proteína son inconsistentes, pero existe una tendencia a conservar una proteína con función residual (8,36).

IId. CARDIOMIOPATÍA FAMILIAR DILATADA

La cardiomiopatía familiar dilatada recesiva ligada al X es una entidad letal, que se manifiesta generalmente después de la adolescencia (4). Los análisis de ligamiento condujeron a la asignación del gen DMD como responsable (24), sin embargo ésta cursa sin datos clínicos de afección muscular esquelética, aunque en ocasiones con niveles de CPK ligera y persistentemente elevados (1,8,37). Característicamente muestra positividad de la distrofina en biopsia muscular esquelética, pero ausencia completa de la proteína en miocardio (14,24).

DM TIPO EMERY-DREIFUSS

Este tipo de DM fue descrita por primera vez por Dreifuss y Hogan en 1961, como una distrofia muscular benigna, con patrón de herencia recesivo ligado al cromosoma X e incluso llegó a considerarse como una variante benigna de la DMD (1,3). Sin embargo el estudio minucioso de la enfermedad claramente demostró que se trataba de una entidad distinta caracterizada por contracturas importantes e invariablemente por compromiso cardiovascular. En la actualidad esta entidad difícilmente se confunde con otras DM. Dentro de los datos clínicos que permiten el diagnóstico diferencial con la DMB están la afección cardíaca consistente en bloqueos de conducción asociados a un alto riesgo de muerte súbita, contracturas de aparición temprana post-cervicales, en tendón de Aquiles y codos, debilidad lentamente progresiva que inicia en cintura escapular y brazos y progresa

a la cintura pelvifemoral en forma tardía; generalmente no existe pseudohipertrofia de gemelos y la CPK está moderadamente elevada (1). En forma adicional, el gen responsable se localiza en Xq28 y codifica a la emerina expresada en todos los tejidos y cuya localización precisa se ha asignado a la cara interna de la envoltura nuclear de los miocitos y de otras estirpes celulares, donde quizá cumple funciones de translocación núcleo-citoplasma (38,39). También se le ha localizado en relativa abundancia en los discos intercalares, lo cual correlaciona con la severa afección cardíaca de estos pacientes. Por otro lado, se ha sugerido la existencia de una variedad autosómico dominante de este tipo de distrofia (40).

III. GENÉTICA DE LAS DMD/DMB

Aunque aún no está claro, parece que la severidad de la enfermedad, y por ende su clasificación, dependen del tipo de mutación que se encuentre en el gen (41,42). El gen mutado, presente en los individuos masculinos afectados se puede originar como resultado de una mutación *de novo* (aproximadamente 30%) o puede ser heredado de una madre portadora (2/3 partes de los casos). Esta proporción se estableció desde 1968 sin aún conocer el gen y de acuerdo a cálculos basados en genética de poblaciones (43,44). Sin embargo, en algunos estudios (45) incluyendo un reporte derivado de esta tesis (**anexo 2**) (46), se sugiere que la cifra de mutaciones *de novo* debe ser reconsiderada. Asimismo en algunas poblaciones, se ha reportado un alto número de casos aislados, lo cual sugiere un alto número de mutaciones *de novo* (47,48).

Condiciones como el mosaicismo somático (49,50) y germinal (51-58) han sido descritas para las DMD/DMB. Las cifras reportadas para el mosaicismo germinal en familias con casos únicos van del 8-14%, aunque es una cifra que aún no se ha definido por completo (1,55,58). Aparentemente estos datos también varían de acuerdo a la mutación presente en el gen DMD. Passos-Bueno y colaboradores (54) sugieren que las familias con casos únicos con delección en la región 5' tienen un 30% más de riesgo de ser originados por mosaicismo germinal que aquellos con delección central. Estas cifras pueden reflejar la susceptibilidad del gen a las delecciones en etapas embrionarias (delecciones en extremo 5' condicionantes de mosaicismo germinal) y en la ovogénesis

(deleciones centrales *de novo*) (54). Estas cifras no han sido confirmadas por otros autores.

Por otra parte, las DMD/DMB pueden expresarse en sujetos femeninos (<8%) (59-61) bajo condiciones que eliminen al alelo normal, por ej. monosomías de cromosomas sexuales (síndrome de Turner) (3,59,60), translocaciones cromosoma X;autosoma (62,63), inactivación preferencial del X normal (>50% mionúcleos) (64-66), disomías uniparentales (67), etc. Un ejemplo que demuestra el efecto de una inactivación no aleatoria, es la presencia de DMD en una de dos gemelas monocigóticas portadoras donde se demostró que la gemela afectada presentó una inactivación preferencial del cromosoma X normal (68). Se ha sugerido que hasta un 10% de las mujeres sin anomalías citogenéticas y diagnosticadas como LGMD, en realidad padecen una distrofinopatía subyacente (1,8,35).

La presencia de un alelo DMD mutado en mujeres citogenéticamente normales (portadoras) puede asociarse en ocasiones, a un cuadro subclínico de DMD/DMB (66,69-72). Algunos estudios han demostrado que la expresión de la sintomatología correlaciona con el nivel de distrofina detectado por inmunohistoquímica o por inmunoblot (73), mientras que en otros no existe correlación alguna (71,72). Esto último puede obedecer principalmente al X predominantemente inactivado o a procesos compensatorios que ocurren durante el desarrollo post-natal del tejido muscular de las mujeres, donde la presencia de las fibras no distróficas predomina sobre las distróficas (74). Asimismo, no se ha reportado correlación absoluta entre el nivel de distrofina muscular por inmunohistoquímica o por inmunoblot y la CPK sérica presente en portadoras (18,71,74).

Recientemente se ha observado que las mujeres portadoras de una distrofinopatía podrían no estar totalmente exentas de una eventual complicación médica, pues se ha documentado que hasta un 60% de estas pacientes pueden llegar a desarrollar cardiomiopatía dilatada de diferente gravedad. Esta complicación se ha visto que ocurre durante la 5ª o 6ª década de la vida por lo que se sugiere un seguimiento cardiológico una vez identificado el estado de portadora (75,76).

IV. EL GEN DMD Y SU PRODUCTO: LA DISTROFINA

En la década de los ochentas se definió que las DMD/DMB son ocasionadas por mutaciones en el gen DMD (77-79), cuyo producto es la proteína denominada distrofina (80,81). El gen de la distrofina se encuentra en el cromosoma X, en la banda Xp21.2 (82) (**Fig. 3**). La localización del gen DMD se logró por estudios citogenéticos (83-85) y por análisis de ligamiento genético (30-32,86). El diagnóstico clínico de las DMD/DMB actualmente puede ser complementada hoy en día por el análisis molecular del gen (1,7,8). El gen DMD abarca aproximadamente 2.4 megabases (Mb) de la banda Xp21.2 (87-89). El control de la transcripción del gen DMD es complejo (1,90-96). Existen descritos hasta el momento, 7 promotores responsables de la expresión celular constitutiva y tejido-específica de la distrofina (97). En la **figura 4** se muestra la localización de los 5 principales promotores que controlan la expresión de las diferentes isoformas de la distrofina, al menos 3 de ellos controlan las isoformas muscular, neuronal y cerebelosa de las distrofinas de 427 kilodaltones (kDa) (90-94). Los exones adyacentes a P4 y P5 conducen el *splicing* de los exones 63 y 56 respectivamente, generando en correspondencia, proteínas de 71 y 116 kDa. El exón 79 codifica los últimos aminoácidos y contiene una región 3' no traducible de tamaño considerable. Recientemente se han descrito dos promotores adicionales, localizados en los intrones 29 y 44, los cuales dirigen la transcripción de un mRNA traducido a las isoformas 260 (retina) (98) y 140 (cerebro-riñón) de distrofina (96), respectivamente, las cuales carecen del extremo N-terminal de unión a actina y de porciones variables del dominio "rod".

El gen consta de 79 exones y se transcribe en un mRNA de 14 kilobases (kb) (77,99,100). Se ha demostrado que la transcripción y *splicing* cotranscripcional del mRNA, requiere de 16 horas para completarse (101). Este gen se expresa predominantemente en músculo esquelético y cardíaco (90), aunque también se han demostrado transcritos y distrofinas específicas en tejido neuronal (91-93) y en células de Purkinje de cerebelo (94), los cuales se generan a partir de promotores exclusivos de estos tejidos.

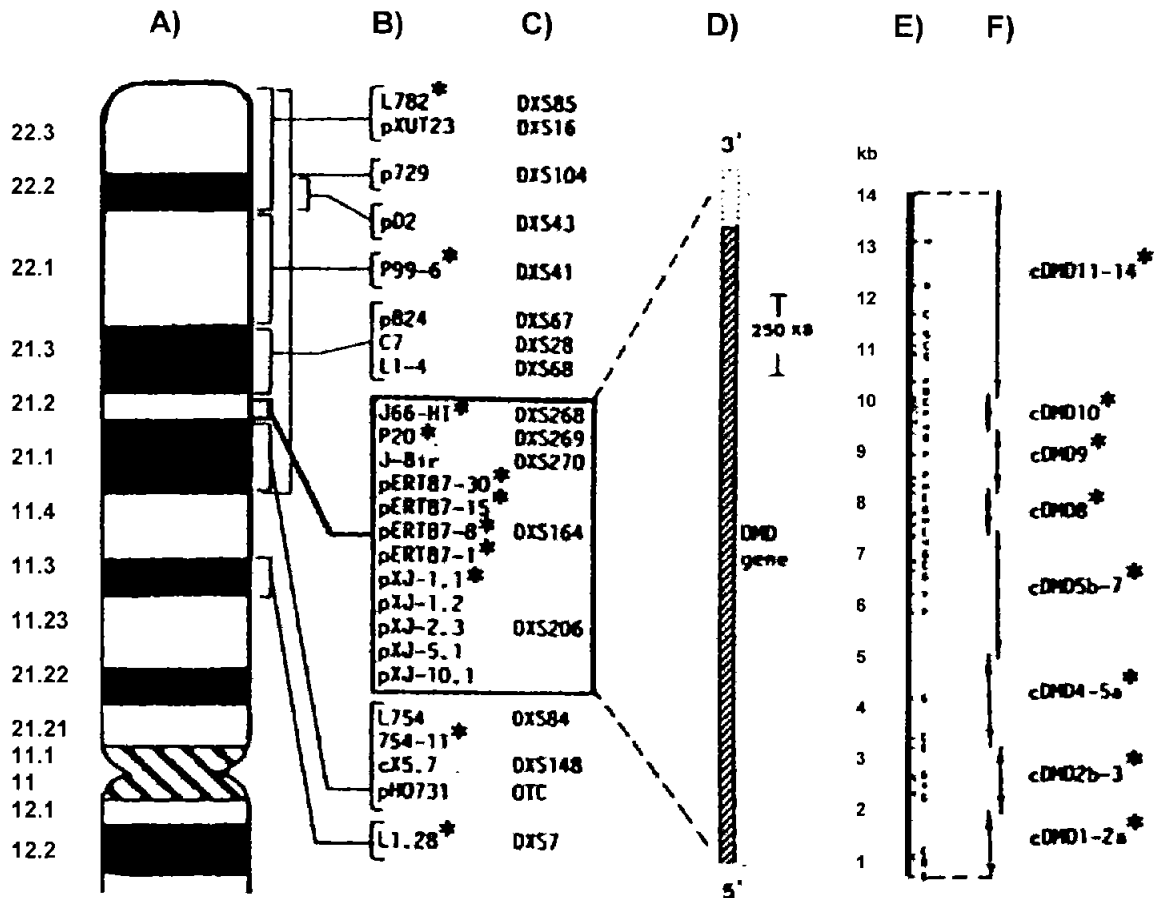


Figura 3. Ubicación del gen DMD en el cromosoma X de humanos. A) Mapa citogenético del brazo corto del cromosoma X. B) Posición de las primeras sondas estrechamente ligadas al locus DMD y C) Posición de los primeros marcadores genéticos asignados a Xp21.2. Destacan los marcadores DXS206 (sondas pXJ) y DXS164 (sondas pERT87), como los primeros en los que se demostró el estrecho ligamiento con DMD/B. D) Las 2.4 Mb del gen DMD. E) Representación del cDNA de 14 kb. F) Las principales sondas empleadas en el estudio de Southern blot en deleciones/duplicaciones presentes en DMD/B que analizan la totalidad de la secuencia codificante y su ubicación con respecto a las diferentes regiones del cDNA.

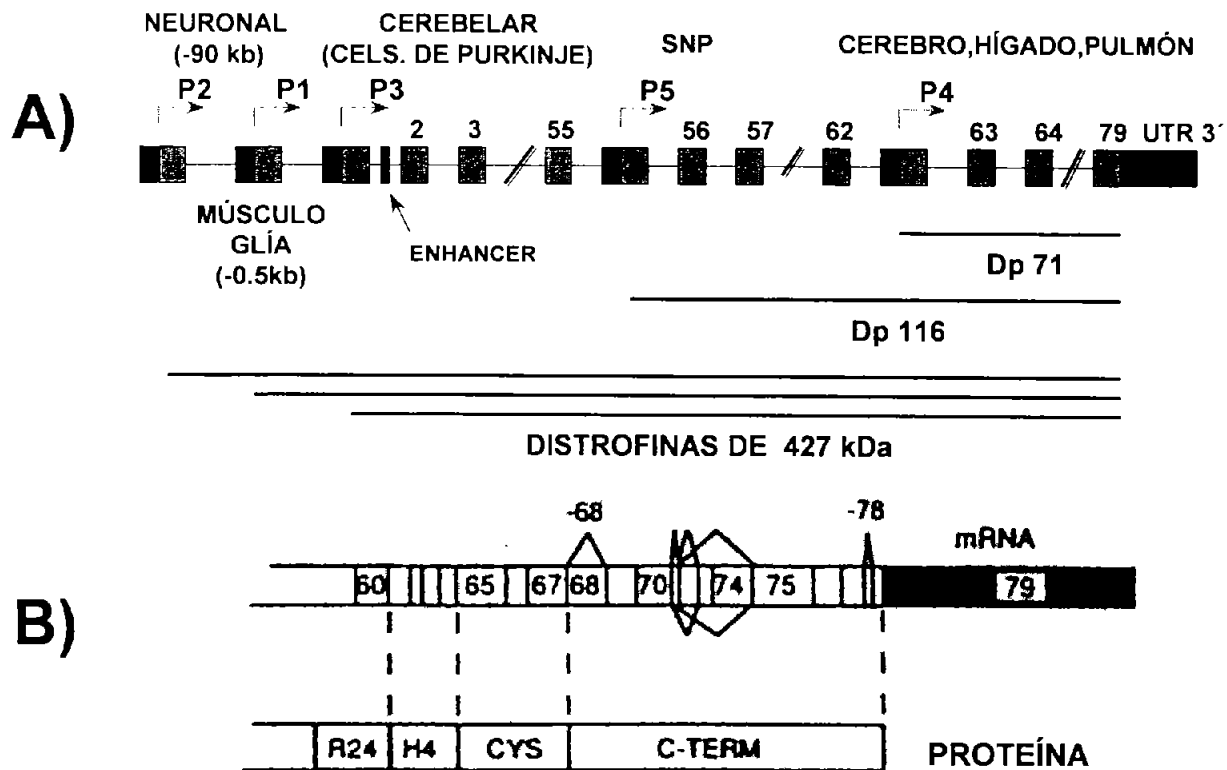


Figura 4. Principales promotores (P1-P5) en el gen DMD, que controlan la expresión de las diferentes isoformas de la distrofina y los sitios de *splicing* alternativo. Cada uno de los promotores P1-P5 está localizado en un exón, y dentro del mismo existe un sitio ATG de inicio de traducción en el transcrito. A) Localización de los promotores P1-P5: Las regiones oscuras de cada promotor incluyen las regiones 5' UTR, mientras que la región sombreada corresponde a la secuencia codificante. P1, P2 y P3 producen un transcrito maduro que carece de exón 2 (eliminado por *splicing*) y son los responsables de las tres principales isoformas de alto peso molecular (+/- 427 kDa) que varían en pocos aminoácidos. B) *Splicing* alternativo: Se esquematiza la eliminación del exón 68 o del 78, que ocasionan el corrimiento del marco de lectura y las proteínas resultantes carecen del extremo C-terminal; y el *splicing* alternativo en forma individual o colectiva de los exones 71-74 que no altera el marco de lectura, pero generan una proteína con un extremo C-terminal modificado.

La distrofina de 427 kDa pertenece al grupo de proteínas de unión a actina, de la superfamilia de las espectrinas. Esta proteína conforma el 5% de la proteína total del citoesqueleto subsarcolémico y el 0.001% de la proteína total de la fibra muscular estriada (102). La distrofina contiene 4 regiones "bisagra" (H1-H4) ricas en prolina, a las cuales se les atribuye la flexibilidad de la molécula, así como otros 4 dominios:

El dominio N-terminal presenta tres sitios de unión (a.a. 14-240) para filamentos de actina en la línea Z y M del sarcómero; el dominio "rod" (a.a. 278-3080) consiste en una serie de 24 secuencias repetitivas de 109 aminoácidos, que dan la conformación de triple alfa hélice y además se ha sugerido que podría fungir como sitio alternativo para la unión a actina (103,104); el dominio rico en cisteínas (a.a. 3080-3360) está involucrado en la unión con el β -dístroglicano del complejo glicoproteico asociado a distrofina (DGAC) y por último el dominio C-terminal, el cual está altamente conservado en aves y mamíferos (105) y además es único en la distrofina y en la utrofina, ésta última codificada en el cromosoma 6 (106). Los 4 dominios suman un polipéptido altamente hidrofílico de 3,658 aminoácidos, con extremos globulares y una longitud de 175 nm (**Fig. 5**) (102).

En el músculo esquelético, la distrofina se localiza en las estructuras denominadas costámeros, que consisten en conexiones transversas entre las miofibrillas y el sarcolema, principalmente a nivel de la línea Z. La posición estratégica de los costámeros junto a las líneas Z, conduce a un "plegamiento" ordenado de la membrana, paralelo a la contracción de la sarcómera. Este mecanismo protege al músculo del efecto de la contracción (107). Por otra parte la distrofina se ancla al citoesqueleto de actina F y al sarcolema mediante el DGAC, que a su vez se ancla con la matriz extracelular (**Fig. 6**), por lo que sirve de puente entre éstos, favoreciendo así la mecánica de la contracción (104,108).

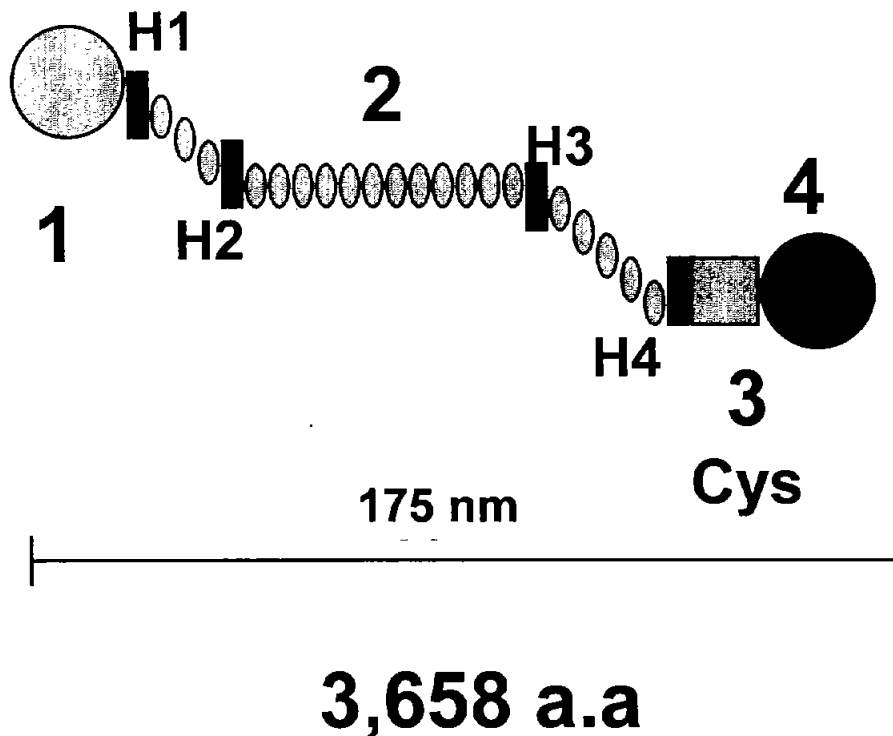


Figura 5. Esquema de la organización por dominios de la isoforma muscular de 427 kDa de distrofina. 1) Extremo amino terminal, 2) dominio "rod" con los 24 repetidos triple alfa hélice, 3) dominio rico en cisteínas y 4) Extremo carboxilo terminal único en utrofina y distrofinas completas. H: regiones bisagra ricas en prolinas, responsables de la flexibilidad de la molécula. Actualmente se considera que los dominios rico en cisteínas y de unión a actina (extremo N-terminal y posiblemente algunas regiones del dominio "rod") son indispensables para prevenir el fenotipo Duchenne.

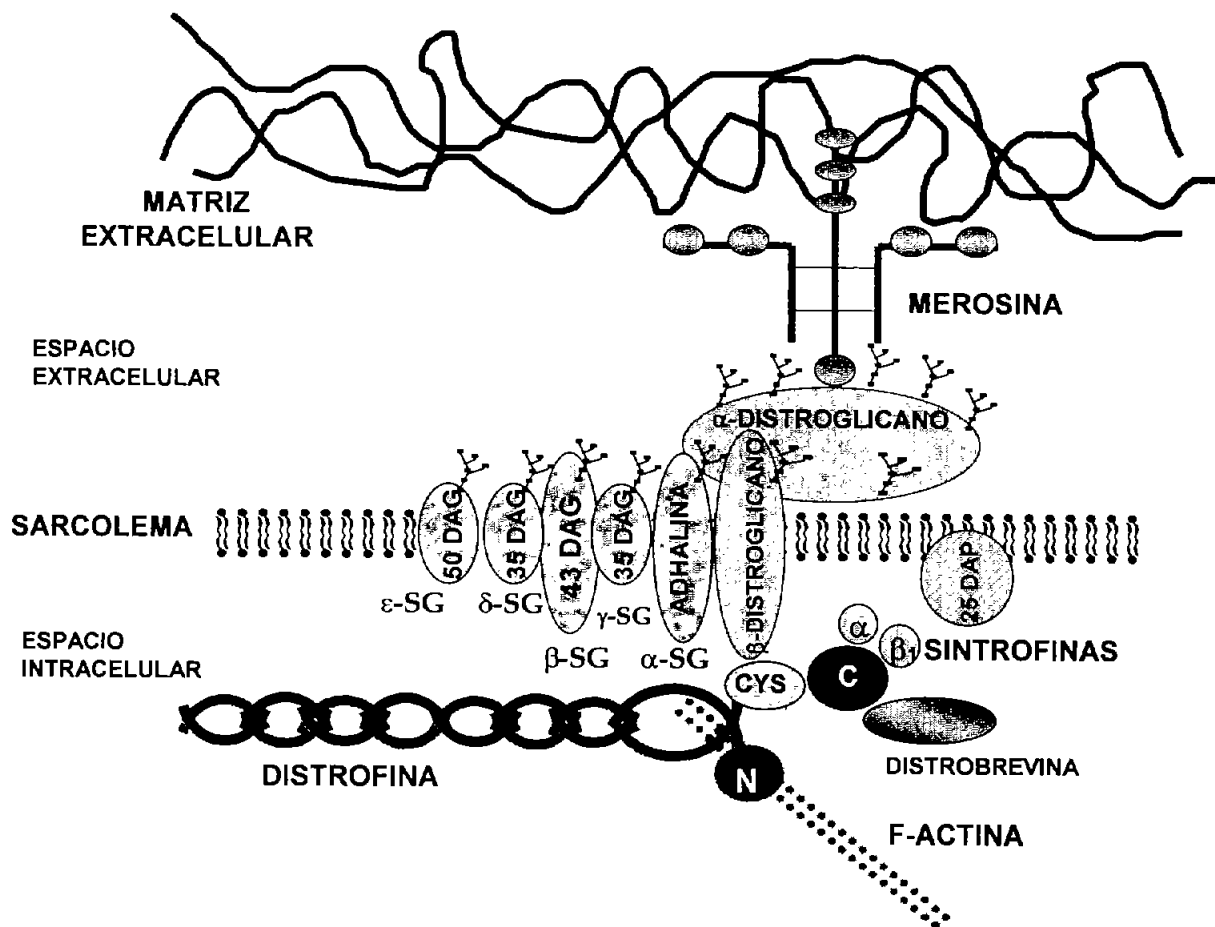


Figura 6. Organización del complejo distrofina/DGAC (complejo glicoproteico asociado a distrofina) en tejido muscular estriado. Se muestra la merosina en la matriz extracelular y su unión específica con el α -distroglicano, el cual a su vez interacciona con el complejo glicoproteico insertado en el sarcolema (adhalina o α -SG DAG, β -distroglicano, β -SG, δ -SG, γ -SG, ϵ -SG y la 25 DAP). Las evidencias apoyan que el β -distroglicano interacciona con el dominio rico en cisteínas de la distrofina, que en su extremo N-terminal lo hace con el citoesqueleto de F-actina. Con ello se cierra el anclaje entre el citoesqueleto, el sarcolema y la matriz extracelular. Además en el extremo C-terminal de la distrofina se unen tres tipos de proteínas denominadas sintrofinas α y β_1 y distrobrevina cuyo papel aún se desconoce, aunque podrían estar estabilizando la unión de la óxido-nítrico sintetasa y la proteína Grb2 (no representadas).

V. COMPLEJO GLICOPROTEÍCO ASOCIADO A DISTROFINA

El DGAC está constituido por al menos 7 polipéptidos denominados α -sarcoglicano o adhalina (50 kDa), β -sarcoglicano (43 kDa), ϵ -sarcoglicano (50 kDa), δ -sarcoglicano (35 kDa), γ -sarcoglicano (35 kDa), sarcospan o 25DAP, β - y α - distroglicano; este último heterodímero se une a la laminina (108,109). En una asociación menos estrecha se encuentran las α -, β 1- y β 2-sintrofina, la distrobrevina (103), proteínas de la familia de las caveolinas y la óxido-nitroso sintetasa (110) (**Fig. 6**). Con base en la topología de cada uno de estos componentes, el DGAC se ha dividido en tres sub-complejos: el complejo de distroglicanos, el complejo de sarcoglicanos (SG) y el complejo citosólico, que comprende a sintrofina, distrobrevina, caveolinas y la óxido-nitroso sintetasa (nNOS) (104,111). Existen diferencias en la organización y composición del DGAC y distrofina en el sarcolema de placa neuromuscular y la unión miotendinosa, cuyo significado aún se desconoce (1). En la actualidad, por inmunohistoquímica es posible realizar una evaluación integral de cada uno de estos componentes implicados en la génesis de algunos tipos de LGMD (3,112-114) (**Fig. 7**). Cabe mencionar, que los pacientes con DMD presentan una desorganización del DGAC, así como una disminución evidente de los complejos sarcoglicano y distroglicano (112).

Debido a la estrecha relación que existe entre los componentes del DGAC con la distrofina y la merosina, la alteración de estas últimas o de alguno de los componentes del DGAC conducen a cambios distróficos de la fibra muscular y a una redistribución secundaria de los componentes del DGAC (112,114,115). En la actualidad, gracias a las estrategias de clonación posicional con familias seleccionadas y la identificación del producto proteico, ha quedado claro que la existencia de mutaciones en los genes de alguno de los componentes de sarcoglicano y algunos componentes citosólicos asociados al DGAC (p. ej. disferlina, caveolina-3, calpaína) conducen a fenotipos de distrofia muscular, inclusive con un curso clínico incapacitante, letal y difícilmente distinguible de las DM ligadas a Xp21.2 (1,113,115,116).

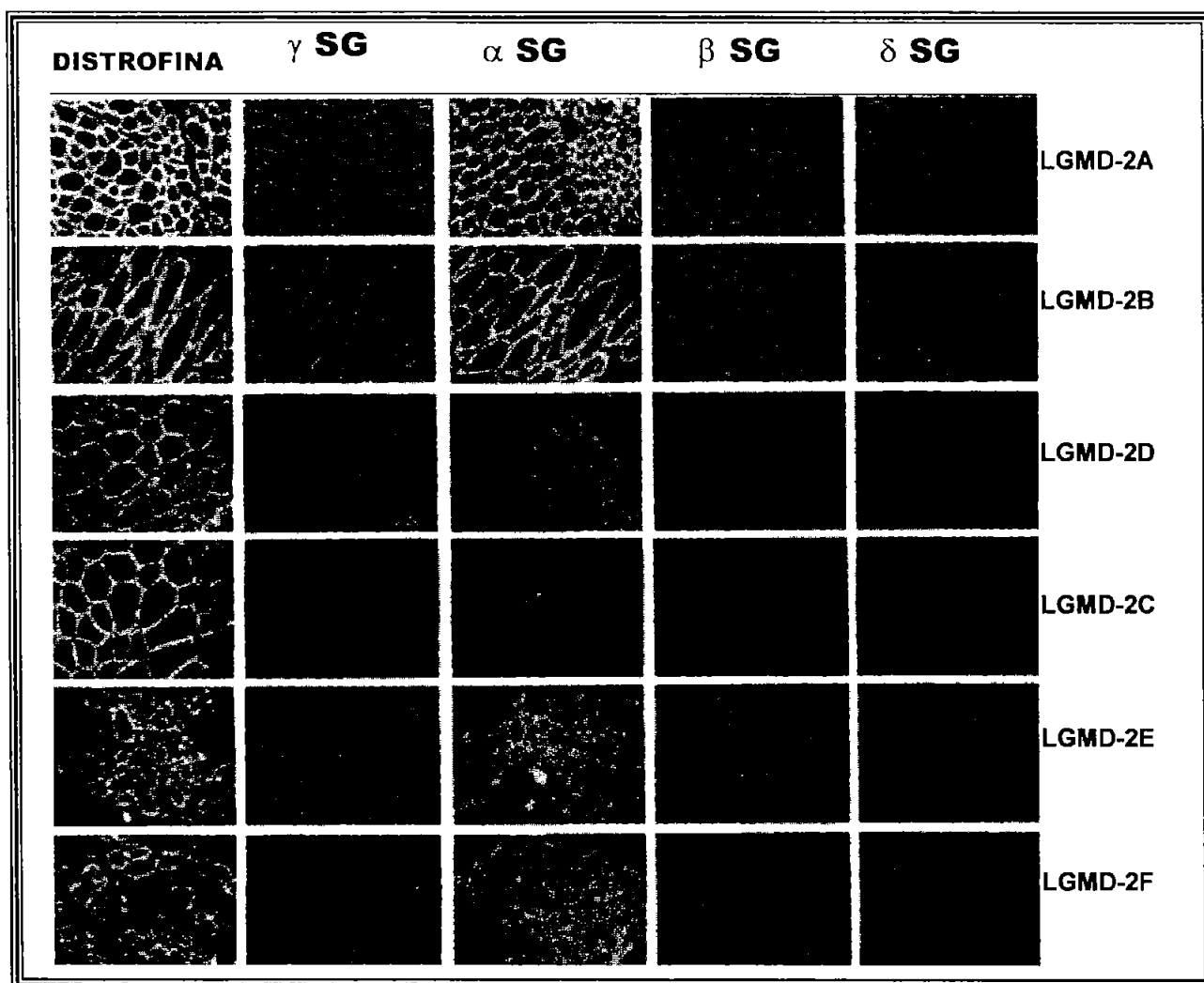


Figura 7. Patrón por inmunofluorescencia de la distrofina y cuatro SG en seis formas autosómico recesivas de LGMD: LGMD-2A (15q15, deficiencia de calpaína-3), LGMD-2B (2p13, deficiencia de disferlina), LGMD-2C (13q12, deficiencia de γ -SG), LGMD-2D (17q21, deficiencia de α -SG), LGMD-2E (4q12, deficiencia de β -SG), y LGMD-2F (5q33, deficiencia de δ -SG). En todas ellas se encuentra preservada la distrofina y con datos de variabilidad en el diámetro de las fibras musculares. En los subtipos 2A y 2B, los cuatro sarcoglicanos se encuentran presentes y sin alteraciones en su distribución.

VI. PATOGÉNESIS DE LA DMD/DMB Y LAS DM DE CINTURAS

Actualmente hay suficientes evidencias experimentales para demostrar que la ausencia total o parcial o la deficiencia funcional de la distrofina, así como de alguno de los componentes del DGAC, ocasiona ruptura del sarcolema durante la contracción y relajación muscular (108,117). Así pues, la degeneración muscular es sin duda el resultado más relevante de esta anomalía. La sustitución de este tejido por componentes conectivos y adiposos (fibrosis endomisial) forma parte de la fisiopatología de la enfermedad (82,118).

La correlación entre el dominio dañado de la distrofina y el fenotipo DMD o DMB ha sido un tema controversial (8,9,119-123). El único consenso predictivo que relaciona el tipo de alteración en la distrofina con el fenotipo es dependiente del marco de lectura (124). En los pacientes con DMD, las mutaciones presentes en el gen generan un cambio en el marco de lectura, mientras que en pacientes con DMB éste no se altera. Así, la eliminación de exones que corren el marco de lectura, condicionan un fenotipo grave tipo Duchenne, mientras que aquellos que no ocasionan corrimiento, se correlacionan frecuentemente con fenotipo leve o Becker (1,8). Este consenso apoya la hipótesis de Mónaco (124), la cual propone que las deleciones que no provocan corrimiento del marco de lectura producen una proteína con función residual asociada a fenotipos Becker, que idealmente se corrobora analizando el marco de lectura de los fragmentos de unión resultantes de los exones conservados en el transcrito maduro (125-128). Para la correlación entre lo observado en el estudio de la proteína y el fenotipo observado, el análisis del transcrito es altamente informativo, ya que en él se pueden valorar aspectos de *splicing* alternativo aberrante en un gen DMD que en muchos casos explica la discrepancia en los hallazgos de la proteína y el marco de lectura (127). Asimismo, se considera que la deleción completa del gen o por translocaciones X:autosoma, condicionan siempre fenotipos DMD (1).

Se ha propuesto que algunas excepciones a la hipótesis de Mónaco, como pacientes con DMD y presencia de distrofina (129) o pacientes con DMB con expresión de distrofina por debajo del 10% (130) o severamente dañada con un 45% menos de su secuencia (131,132), pueden deberse a la funcionalidad residual de dominios de la proteína (N-terminal y dominio rico en cisteína), que participan en funciones claves tales como dirigir correctamente la localización de la distrofina hacia el subsarcolema y su correcto ensamble de los componentes del DGAC, que le permiten mantener una unión estable con éste y finalmente conservar la vida media de la propia distrofina (108,131).

En las DM de cinturas aún no se tienen datos suficientes para integrar la correlación fenotipo-genotipo: por ejemplo, la sarcoglicopatía más frecuente (deficiencia de α -SG) alcanza a estar presente apenas en el 5-10% de los pacientes con DM distrofina positivos (133) y se sospecha fuertemente la presencia de genes modificadores, debido a que en ciertas DM de cinturas autosómico recesivas, se ha observado que el estado homocigoto para una misma mutación sin sentido, ocasiona fenotipo grave en algunos individuos y leve en otros (134,135), en tanto que un estado homocigoto para una mutación con sentido erróneo se ha asociado con fenotipos menos severos (136,137). Asimismo, se ha reportado un caso con distrofia congénita con un cuadro clínico moderado y positividad de merosina en la biopsia muscular. Sin embargo pudo documentarse que uno de los alelos afectados presentaba una delección que mantenía el marco de lectura, produciendo una proteína con función residual, tal como ocurre para los fenotipos Becker (138).

VII. GÉNESIS Y TIPO DE MUTACIONES EN EL GEN DMD.

La tasa de mutación del gen DMD es alrededor de 10 veces mayor en comparación con otros genes ($3.5-10.5 \times 10^{-5}$ mutaciones por locus por generación) (22). Las delecciones intragénicas de tamaño variable son las responsables de aproximadamente el 60% de los casos con DMD/DMB (139) (**Tabla 1**). Las duplicaciones parciales intragénicas están presentes en el 6-8% (139,140) de los pacientes y en la última década, también se han caracterizado un número importante de mutaciones puntuales con diversos efectos sobre la expresión del gen (141).

Tabla 1. Frecuencias de deleciones reportadas en diferentes grupos étnicos (*).

Autor(es) / país	Exones analizados	Pacientes con deleción	% deleciones en exones 45-51 (punto caliente central)	Método
Immoto y cols. 1993, Japón	Todo el cDNA	53/88 60%	47.2%	Southern blot
Tsukamoto y cols. 1991, Japón	cDNA de exones 4,8,12,17,19,44,45,48 y 51.	12/28 48%	75.1%	PCR y Southern blot
Sugino y cols. 1989, Japón	Todo el cDNA	18/42 43%	MPRC	Southern blot
Yang y cols. 1994, China	Exones 1,3,6,8,13,17,43,47,50,52 y 60	15/41 37%	NM	PCR múltiple
Soong y cols. 1991, China	Todo el cDNA	13/29 45%	50%	Southern blot
Ballo y cols. 1994, Sudáfrica	Exones 3,4,6,8,13,19,42,44,45,48,50-53, 60. Sondas para cDNA de exones 1-19 y de 44-60	52/128 40%	65%	PCR múltiple y Southern blot
Hodgson y cols. 1989, Reino Unido	Todo el cDNA	163/287 57%	NM	Southern blot
Covone y cols. 1992, Italia	Pr neuronal y muscular, exones 1,3,4,6,8, 12,13,16,17,19-22,29,32,34,41-52 y 60	96/152 63%	NM	PCR múltiple
Den Dunnen y cols., 1989, Noruega	Todo el cDNA	115/119 59%	MPRC	Southern blot
Kadasi y cols. 1991, Checoslovaquia	Sondas cf56a, cf56b, 1-2a,2b-3,4-5a,5b-7 y 8	14/32 44%	NM	Southern blot
Niemmann-Seyde y cols. 1992, Alemania	Pm(1),3,4,6,8,12,13,17,19,43-52 y 60	35/56 62.5%	57.5%	PCR múltiple
Baranov y cols. 1993, Rusia	Pm(1),6,8,12,17,19,42-45,47,48,50,52	49/119 41%	73.5%	PCR múltiple y Southern blot
Gillard y cols. 1989, Canadá	Todo el cDNA	109/181 60%	NM	Southern blot
Chamberlain y cols. 1992, EUA (estudio multicéntrico)	Exones 4,8,17,19,44,45,48,51	346/745 (46%)	NM	PCR múltiple
Baumbach y cols. 1989, USA	Todo el cDNA	90/160 56%	69%	Southern blot
Darras y cols. 1988, USA	Todo el cDNA	21/32 (66%)	MPRC	Southern blot
Vainzof y cols. 1991, Brazil	Sondas cf 56 ^a y cf 56b	19/47 (40%)	NM	Southern blot
Coral-Vázquez y cols. 1993, México (178)	Exones Pm(1),4,8,12,13,17,19,43,44,45,48,50, 51,52	21/40 52.5%	86.3%	PCR múltiple
Banerjee y cols. 1997, India (139)	Pm(1),3,4,6,8,12,13,17,19-22,34,42-44,46-53,55, 60	103/160 64%	69.7%	PCR múltiple
Alcántara y cols. 1997, México (46)	Pm(1),6,8,12,13,16,17,19,43,45,47,48-55	37/76 48.7%	78.4%	PCR múltiple

NM: No mencionado

MPRC: La mayor parte de las deleciones fueron en región central.

(*): Tomado y modificado de Banerjee M, Verma IC. Are there ethnic differences in deletions in the dystrophin gene?. Am. J. Med. Genet. 1997; 68:152-7 (139).

Las deleciones en el gen DMD son muy heterogéneas, pueden eliminar desde un exón hasta el gen completo (77,139) e incluso ocasionar síndromes de genes contiguos (142,143). Múltiples estudios han demostrado dos sitios del gen altamente susceptibles (puntos calientes) para sufrir deleciones parciales. Uno de ellos abarca los primeros 20 exones, en tanto que el otro se encuentra entre el intrón 44 y los exones 53/55 (144). Menos del 3% de las deleciones se originan hacia el extremo 3' (1,77,145).

Los mecanismos de deleción pueden explicarse con base en fenómenos de ruptura atribuibles a mecanismos de recombinación o algún rearrreglo especial del gen en la cromatina (146,147). Estos eventos pueden tener lugar durante la meiosis o durante la mitosis en etapas tempranas de la embriogénesis (148). La presencia de dos sitios calientes entre los exones 1 y 20 y del 43 al 55, sugiere la presencia de una característica especial que predispone a estas zonas a fenómenos de ruptura y pérdida; por ejemplo, el intrón 44 (+/-170 kb), posee secuencias ricas en A-T y secuencias polimórficas de repetidos CA (posiblemente involucradas en la recombinación) (42,144,149), e incluso un elemento tipo transposon (150); este último se encontró en los sitios de ruptura de varios casos de DMD. La presencia de deleciones/duplicaciones parciales intragénicas en la región 5' del gen se ha asociado a casos debidos a mosaicismos germinales, en tanto que los eventos mutacionales en el extremo 3' y el punto caliente central del gen se asocian a mutaciones *de novo* generadas con mayor frecuencia en línea germinal materna (54,148). Las duplicaciones obedecen a los mismos mecanismos que dan por resultado deleciones, aunque aún está en discusión si éstas se generan en línea germinal paterna a través de intercambios de cromátides hermanas (42,58,146,151,152).

Menos de la tercera parte de los pacientes con DMD/DMB son debidos a mutaciones puntuales que conducen al corrimiento del marco de lectura, creación de codones de terminación, eliminación de sitios de *splicing*, inactivación o disminución de la función promotora y mutaciones de sentido erróneo (141). Al momento se tienen descritas más de 150 mutaciones con diversos efectos en la proteína; la mayoría de ellas conducen a la creación de codones sin sentido y la afección de los sitios de *splicing* y del "branch point", así como creación de sitios críticos de *splicing* (1,141,153-156) (**Tabla 2**). Existen

Tabla 2. Mutaciones de tipo puntual y pequeñas inserciones/deleciones reportadas en el gen DMD y sus efectos sobre la proteína (*).

Paciente	Cambio de nucleótido	Exón afectado	Efecto del cambio
MUTACIONES QUE CREAN CODON DE PARO			
1	C932T	8	Glu → term
2	C2510T	19	Arg → term
3	G2522T	19	Glu → term
4	G2999T	21	Glu → term
5	G3677T	26	Glu → term
6	C5759T	39	Gln → term
7	C7163T	48	Glu → term
8	GG7609/10 → AT	51	Leu → term
9	C91252T (CpG)	60	Arg → term
10	C10316T (CpG)	70	Arg → term
DELECCIONES CON CORRIMIENTO DEL MARCO DE LECTURA			
11	ΔC2568	19	CML
12	AG5960/1 → T	48	CML
13	ΔT10662	74	CML
INSERCIONES QUE OCASIONAN CORRIMIENTO DEL MARCO DE LECTURA			
14	T1554 ins T	12	CML
ALTERACIONES QUE OCASIONAN ANULACIÓN DE LOS SITIOS DE <i>splicing</i>			
15	52 pb deletadas en exón 19	Exón 19 se elimina en <i>splicing</i>	CML
16	5 pb deletadas en sitio donador de <i>splicing</i>	Exón 44 se elimina en <i>splicing</i>	CML
17	Cambio en sitio aceptor AG → AC	Exón 57 se elimina en <i>splicing</i>	CML
18	Cambio en sitio donador de <i>splicing</i> GT → GA	Exón 68 se elimina en <i>splicing</i>	CML

CML: Corrimiento en el marco de lectura.

(*) Tomada y modificada de Scriver y cols. (1) y Prior TW y cols. (141).

suficientes datos para afirmar que la mayoría de las mutaciones puntuales se originan en la espermatogénesis (42,148,154). Cabe mencionar que no existe un sitio caliente para las mutaciones puntuales (141), aunque recientemente se ha propuesto que existen algunas regiones con características particulares en la secuencia primaria que condicionan mutaciones puntuales generadas en forma no aleatoria (141,154,155).

Otras mutaciones raras reportadas incluyen a un caso de DMD causado por la inserción de un elemento retrotransponible L1 en el exón 44 del gen DMD (157), y dos casos familiares debidos a inversiones, una pericéntrica (158) y otra paracéntrica (159); que involucraban la banda Xp21.2.

GÉNESIS Y TIPO DE MUTACIONES EN LAS DM DE CINTURAS.

La posición de los genes responsables de las LGMD son: LGMD-1A: 5q22.3-q31.3, LGMD-1B: 6, LGMD-1-C: 3p25, LGMD-2A: 15q15, LGMD-2B: 2p13, LGMD-2C: 13q12, LGMD-2D: 17q21, LGMD-2E: 4q12, LGMD-2F: 5q33-q34, LGMD-2G: 17q11-q12. Los tipos 2-C al 2F, se conocen también como sarcoglicopatías, debidas a mutaciones en los genes de gamma, alfa, beta y delta sarcoglicanos (SG), respectivamente (1,14-17,111-115).

Se han descrito un número variable de mutaciones responsables. Se sabe que la mayoría consisten en mutaciones puntuales, pequeñas inserciones y deleciones. Algunas de éstas conducen a eliminación de sitios de *splicing* o disrupción de la función de elementos promotores (112,114). Especialmente en las LGMD con patrón de herencia autosómico recesivo, ocasionadas por mutaciones que crean un codón de terminación, cursan con un cuadro clínico más severo, principalmente si esos tipos de mutaciones están en estado homocigoto (14-17,112,114). Debido a lo anterior estudios de la proteína y del gen, pueden tener utilidad diagnóstica y predictiva y así establecer la correlación fenotipo-genotipo.

Estudios en poblaciones altamente endogámicas han revelado mutaciones ancestrales que se encuentran en desequilibrio de ligamiento y además con alta prevalencia en estas poblaciones. Por ejemplo, la LGMD-2C anteriormente englobada

dentro de las SCARMD, cuyo gen responsable es el γ -SG, es un padecimiento relativamente común en una población gitana. Se ha determinado que en esta población, existe una elevada prevalencia de alelos mutantes así la mutación 525delT cosegrega con el alelo 122 pb de un STR (D13S232); en tanto la mutación Cys283Tyr, se encuentra en desequilibrio con el alelo STR D13S232 de 112 pb (160).

Al igual que para las DMD/DMB, el abordaje diagnóstico de estas entidades se realiza por estudio molecular e inmunohistoquímico (7,15-17,112).

EVALUACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA DISTROFINA Y COMPONENTES DE DGAC EN BIOPSIAS MUSCULARES. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.

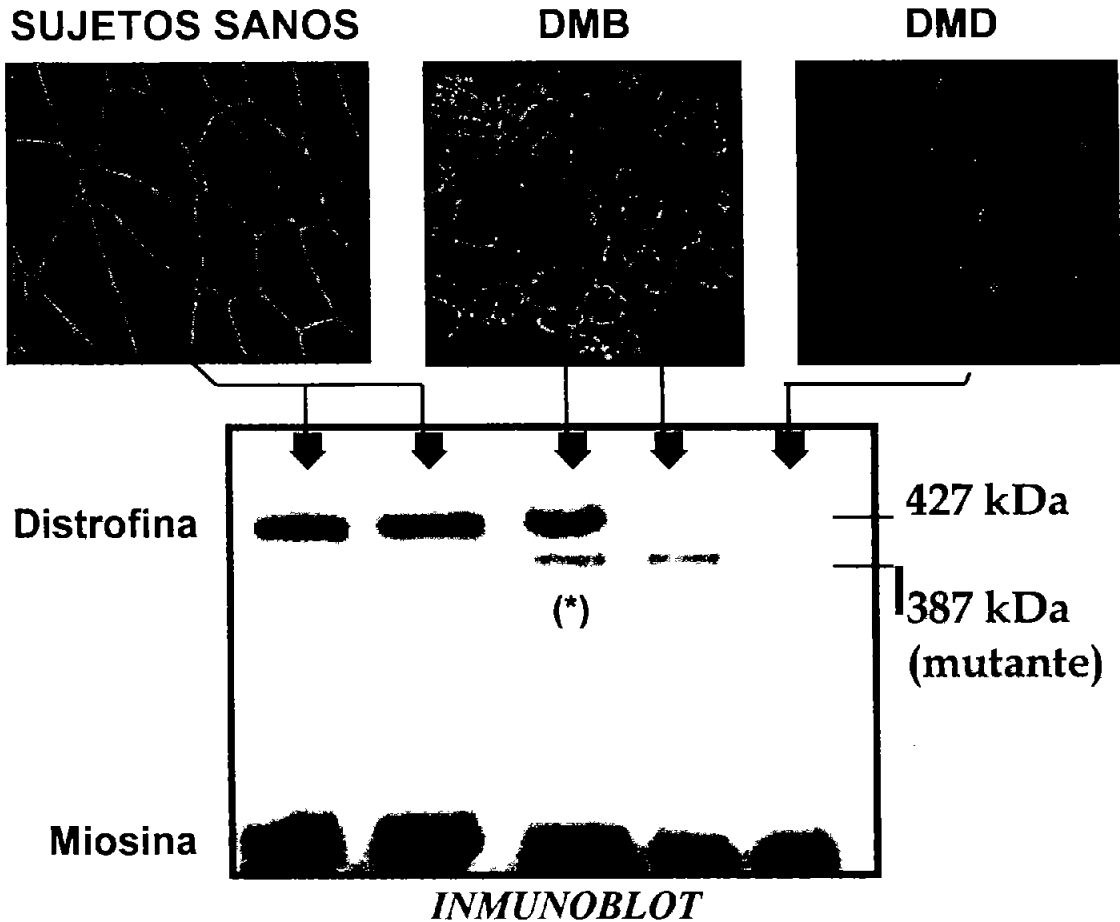
Desde la caracterización de la distrofina como el producto del gen DMD, se confirmó que los pacientes con fenotipos Duchenne mostraban ausencia de la distrofina, en tanto que los fenotipos Becker presentaban una proteína de menor tamaño o muy reducida en cantidad (18,19,130,161,162) (**Fig. 8**).

La evaluación de la distrofina por inmunohistoquímica y por inmunoblot, se considera fundamental para la correcta clasificación de una DM (1,3,7,15,18,121). El diagnóstico de distrofinopatía se descarta cuando la distrofina se preserva cualitativa y cuantitativamente normal. En ocasiones la cantidad de distrofina puede resultar disminuida en DM de cinturas AR severas (16-18,111,112), sin embargo la distrofina conserva su peso normal y se confirma la ausencia de alguno de los componentes del DGAC (14,16,112,115). Por otra parte la ausencia total o la presencia de una distrofina mutada, condiciona una disminución e incluso redistribución citosólica de todos los componentes del DGAC y el resto de las proteínas subsarcolémicas asociadas (14,112,163).

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE DMD/DMB.

El Southern blot fue la técnica utilizada en los 80s e inicio de los 90s, para el diagnóstico de las DMD/DMB. Este análisis requiere 7-12 sondas que abarcan la longitud total del cDNA (77,79,140) (**Fig. 3**) para detectar duplicaciones parciales y deleciones en

INMUNOFLUORESCENCIA



(*) PORTADORAS SÍNTOMATICAS

Figura 8: Estudio de inmunofluorescencia en biopsias musculares que valoran la presencia o la ausencia de la distrofina (anticuerpos anti-dominio "rod") en sujetos con las dos distrofinopatías más comunes. Nótese que el individuo control sano, muestra fibras de tamaño regular, ausencia de fibrosis endomisial y una clara señal en la periferia de cada una de las fibras musculares. Los mionúcleos se contrastaron con el colorante DAPI. En el inmunoblot, se evidenció una proteína normal de 427 kDa. En tanto, la biopsia muscular del paciente con DMD muestra ausencia total de distrofina, lo cual correlaciona con los hallazgos del inmunoblot y con el fenotipo más agresivo de las distrofinopatías. El paciente con DMB, muestra fibras de tamaño irregular, con fibrosis endomisial, pero algunas fibras musculares muestran señal "en parches" y el estudio de inmunoblot revela una cantidad disminuida de distrofina mutante de menor tamaño (387 kDa), pero de la cual se supone una función residual que condiciona el fenotipo Becker. En ocasiones, las mujeres portadoras de fenotipos DMB, durante la infancia pueden presentar en la inmunofluorescencia un patrón en parches similar al encontrado en varones con DMB. Asimismo el inmunoblot, puede mostrar ambas isoformas (normal y mutante). A mayor edad, estas manifestaciones van desapareciendo debido al reemplazo de las fibras distróficas por fibras normales que no inactivaron el alelo normal.

pacientes y portadoras (78,164,165). En 1985 se clonaron fragmentos aledaños a la región Xp21 incluyendo un fragmento de DNA que contenía una pequeña parte del gen DMD conocido como pERT87 (1,42,166). Utilizando este fragmento como sonda en el Southern blot se lograron detectar deleciones en el 10% de los casos con DMD (166). El Southern Blot ha sido sustituido en gran parte por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), mediante la cual se puede amplificar más de un exón por reacción (PCR múltiple; PCR-M). La razón de éste desplazamiento se basa en el menor costo, trabajo, tiempo, cantidad y calidad de DNA utilizado en el análisis por PCR-M (1,8,82,167,168).

La técnica de PCR-M aplicada al diagnóstico molecular de DMD/DMB, fue diseñada por Chamberlain y cols. en 1989 (167) y complementada más tarde por Beggs y cols. en 1990 (168). Con esta técnica se pueden evidenciar hasta el 98% de las deleciones intragénicas y completas del gen detectadas por Southern blot (8,168). Una de las agrupaciones en PCR-M de exones más utilizadas es aquella que analiza 13 exones y el promotor muscular en 2 reacciones por separado (9-plex y 5-plex) (167,168) o la de 2 reacciones de 9 exones cada una (1) (**Fig. 9**). Los exones incluidos en el estudio por PCR-M, abarcan regiones del extremo 5' y la región central del gen. Los exones amplificados, incluyen toda la secuencia codificante del exón, los sitios de *splicing* y algunas bases de los bordes intrónicos (168). Debido a su tamaño (diferencias entre 50 y 100pb), los exones amplificados, son fácilmente visualizados en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (169).

El análisis del mRNA del gen DMD por RT-PCR (actividad de reverso transcriptasa acoplada a PCR), tiene la ventaja de analizar completamente la secuencia codificante de 14 kb sin necesidad de tomar biopsia muscular, ya que se analizan transcritos "ectópicos" (mRNA de linfocitos periféricos) (171). Mediante esta técnica se analizan regiones no estudiadas por un PCR-M, y también es útil en la detección de portadoras (172). La desventaja son los falsos positivos reportados en algunos casos debido al *splicing* alternativo realizado en tejidos no musculares (173). Asimismo, para la identificación de mutaciones puntuales se ha realizado RT-PCR acoplada a análisis de heterodúplex, de restricción o de proteína truncada (156,164,170,174).

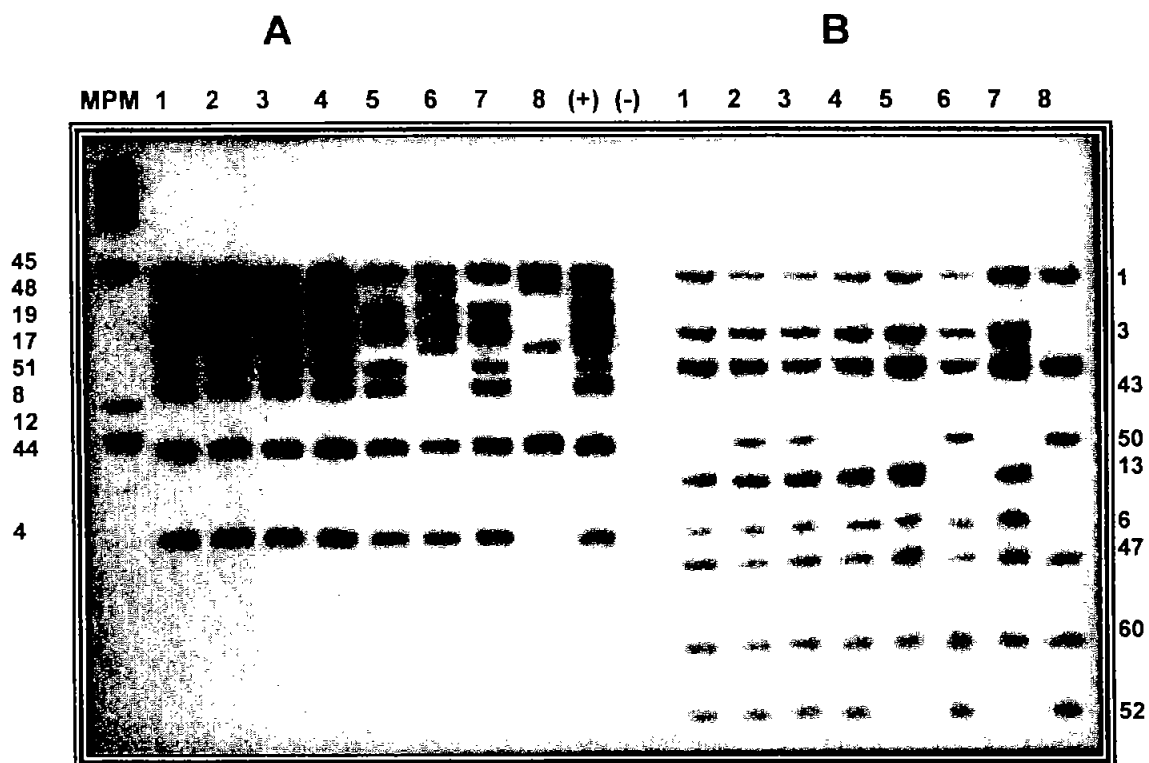


Figura 9. Análisis del gen DMD por PCR múltiple ampliada (9-plex y 9-plex) de acuerdo a una modificación de la técnica original de Beggs y cols. (168) realizada por Worton RG y cols. (1): A) amplificación de exones 45, 48, 19, 17, 51, 8, 12, 44, 4; B) exones Pm1, 3, 43, 50, 13, 6, 47, 60, 52. El carril (+) corresponde a un control masculino sano. En A) se observa delección en los carriles 5 (exones 48-51), 6 (exones 8-12), 7 (exones 48-51), y 8 (exones 4-19). De igual manera, el panel B), se aprecian delecciones en el carril 1 (exón 50), 4 (exón 50), 5 (exón 50-52), 6 (exón 13), 7 (exón 50-52), carril 8 (exones 3-13). Así el paciente del carril 7 presenta una delección que abarca al menos del exón 48 al 52, pues no se analizó el exón 53 y el paciente del carril 8 presenta una gran delección que involucra al menos desde el exón 3 hasta el exón 19, desconociéndose el estado de los exones 2 y 20.

DETECCIÓN DE PORTADORAS Y DIAGNÓSTICO PRENATAL EN DMD/DMB

La correcta identificación de una DM en una familia debida a una distrofinopatía y la caracterización de la mutación responsable en el gen DMD, es de gran utilidad para brindar un consejo genético adecuado a través de la detección de portadoras y el diagnóstico prenatal en aquellas familias donde existan portadoras o riesgo de mosaicismo germinal (1,42,53,-56,78,175). Con base en el análisis bayesiano, genética de poblaciones y mediciones de CPK sérica en madres de casos afectados, se ha descrito que las mutaciones *de novo* conforman una tercera parte de los casos (42-44,176,177). En la actualidad, esta cifra parece no ser aplicable a todas las poblaciones (45,46), ya que en un estudio previo realizado en 75 familias mexicanas con DMD/DMB por PCR múltiple cuantitativo se demostró un predominio (2/3 partes) de las mutaciones tipo delección originadas *de novo* (46). Asimismo en la mayoría de los estudios, incluyendo dos casuísticas nacionales, existe un franco predominio de casos aislados (45-47,54,140,164,178).

En la actualidad aún no se dispone de un tratamiento curativo y los esfuerzos a nivel mundial se enfocan al aspecto preventivo mediante la detección de portadoras y el diagnóstico prenatal e incluso a nivel de preimplantación (10,43,175,179). La detección de portadoras mediante los métodos tradicionales de diagnóstico tales como la medición de CPK sérica o evaluación inmunohistoquímica en biopsia de músculo, generan resultados inconsistentes (72,74,176) y se consideran muy poco confiables (71). Asimismo, mediante análisis de distrofina por inmunohistoquímica, se ha reportado que la biopsia endomiocárdica es concluyente para el diagnóstico de certeza de portadoras, sin embargo presenta graves riesgos (75,179). Se calcula que sólo un 50-60% de las portadoras conocidas presentan elevaciones diagnósticas de CPK, por lo que los falsos negativos son desventajas importantes del empleo de esta técnica (43,176). Igualmente la evaluación de distrofina por inmunohistoquímica resulta normal en la mayoría de las mujeres en etapa reproductiva. Sólo las mujeres sintomáticas de DMD o antes de la 1ª década de la vida presentan datos característicos en la inmunohistoquímica de la biopsia muscular (74).

Actualmente el análisis basado en DNA es el que brinda los resultados más consistentes (1,3,8,175). El abordaje para la detección de portadoras cuando se desconoce la mutación responsable, se basa en el análisis de ligamiento (tipo indirecto) utilizando marcadores intragénicos del tipo RFLPs, VNTRs y STRs, permitiendo un seguimiento del alelo mutado o en riesgo en la descendencia y en ocasiones fungiendo como un análisis de tipo directo evidenciando eventos de delección o duplicación en casos índice y/o portadoras (180-184). Existen tres limitantes importantes en la aplicación del análisis de ligamiento, la primera consiste en contar con una estructura familiar adecuada (familia extensa o casos familiares), la presencia del carácter de heterocigocidad en al menos un marcador en la madre del propósito y la alta prevalencia de fenómenos de recombinación intragénica que conduce a falsos positivos o negativos en el 5-12% de los casos (1,182), especialmente cuando se utiliza un número limitado de marcadores y con distancias genéticas menores a 1cM (184). Este porcentaje de error puede solventarse en gran medida (sin llegar al 100%) utilizando marcadores altamente polimórficos (STRs) ubicados a distancias superiores a 1 cM, es decir localizados en la región 5', central y 3' del gen DMD (185).

Para detección de portadoras de grandes rearrreglos deleciones/duplicaciones han sido de utilidad los estudios como el Southern blot cuantitativo (186), la PCR múltiple cuantitativa (187-191), el análisis de transcrito por RT-PCR (172) y el estudio de FISH (192-194). Este tipo de análisis dirigido a la caracterización de dichas mutaciones, se considera un método directo, de entre los cuales se encuentran el Southern Blot cuantitativo, el PCR-M cuantitativo, el RT-PCR, análisis de heterodúplex, restricción de exones amplificados, etc.) (1,3).

Posterior a la optimización del PCR-M en DMD, el propio Chamberlain y cols., propusieron que si la reacción de PCR-M permanecía en la fase exponencial de la amplificación, una vez conocida la delección/duplicación del caso propósito (169), la técnica podría hacerse cuantitativa (PCR-MC) y ser útil para la asignación de dosis génica en portadoras. A partir de entonces se han diseñado varias metodologías, que permiten evaluar la eficiencia del amplificado utilizando la radioactividad (195), la fluorescencia

(103,107 TM), o hasta el simple bromuro de etidio (188-191), siendo los primeros menos utilizados ya que la tendencia actual es eliminar la medición directa o indirecta de la radioactividad acoplada al amplificado (190) y porque los métodos que utilizan iniciadores ("primers") marcados con fluorocromo, aunque tienen una sensibilidad del 100%, requieren equipos de medición y reactivos sumamente costosos (189).

En la búsqueda de optimización y simplificación de las técnicas de PCR-MC para determinar dosis génica, Abbs y cols. en 1992 (187), crearon una reacción de PCR-MC no radioactiva, no fluorescente, sencilla, confiable, sumamente barata, directa y cuantitativa a relativamente bajo número de ciclos (23 ciclos); esta técnica se considera muy útil en la determinación de dosis génica (196,197).

Se ha sugerido con la finalidad de evitar el error de asignación o exclusión de portadoras por mosaicismo germinal en casos únicos con mutación conocida se debe descartar el estado de portador en las hermanas, y realizar diagnóstico prenatal en la madre aunque ésta haya sido diagnosticada como no portadora (53,56). En familias con casos únicos con DMD/DMB, el riesgo de recurrencia en subsecuentes embarazos es del 7-18%, adicional al riesgo de portadora calculado para la madre de un caso único (60%), si dicho producto ha heredado el mismo haplotipo que el hermano afectado sin mutación caracterizada (1,54). Asimismo, Pegoraro y cols. en 1994 reportaron que el 90% de los alelos mutados en casos únicos provenía del abuelo materno, sugiriendo la posibilidad de que las madres pudieran ser portadoras de una mutación puntual originada durante la espermatogénesis (198), por lo que en aquellas familias con casos únicos donde la mutación no corresponde al tipo deleción, el riesgo de que la madre sea portadora se ve incrementado (148,177,198,199).

Existen estudios donde la combinación de estrategias directas basadas en PCR-MC e indirectas como los RFLPs o STRs, dan por resultado un 100% de eficiencia en el otorgamiento de asesoramiento genético en familias con DMD/DMB (182,184,185). Respecto al diagnóstico prenatal, este puede realizarse desde el primer trimestre de la gestación, utilizando amniocitos obtenidos a las 16 semanas de gestación (SDG) o a través de células trofoblásticas obtenidas a las 8-10 SDG (1,78,180-182).

JUSTIFICACIÓN

Las DMD/DMB son los padecimientos musculares hereditarios más frecuentes a nivel mundial y tienen un carácter invalidante y letal en el individuo. Hasta la fecha no existe un tratamiento definitivo para este tipo de padecimientos y en nuestro país la detección de portadoras se basa en métodos tradicionales indirectos, tales como: determinación de CPK (200), electromiografía y recientemente por RFLPs y STRs (201). La importancia de la biología molecular en este campo estriba en su alta sensibilidad y especificidad para conocer la distribución y las características de las mutaciones, no sólo en los casos, sino también en las mujeres portadoras. La aplicación de estas herramientas es indispensable para otorgar un asesoramiento genético de certeza y con ello la oportunidad de prevenir estos padecimientos invalidantes y letales.

A la consulta externa de Genética del Instituto Nacional de Pediatría, S.S., acuden 132 familias con DMD/DMB, sin embargo sólo 41 de ellas tienen antecedentes heredofamiliares para la enfermedad. En estas familias la madre fue diagnosticada como portadora obligada; sin embargo en las hermanas y otros familiares femeninos el estado de portadora fué incierto, al igual que el resto de las madres y hermanas de los 91 casos índice sin historia familiar de la enfermedad. La mayoría de estas mujeres potencialmente portadoras se encuentran en etapa reproductiva; por lo que en ellas es indispensable conocer su estado de portadora, para realizar un asesoramiento genético de certeza y brindarles el beneficio del diagnóstico prenatal.

En forma adicional, el empleo de un número mayor de marcadores intragénicos mejoraría la eficiencia del asesoramiento genético mediante análisis de ligamiento, además de que no existen datos de la población mexicana sobre el índice de recombinación intragénica en este locus.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las mutaciones responsables de las DMD/DMB a través del estudio molecular del gen DMD, y de manera paralela establecer el diagnóstico de portadoras y el diagnóstico prenatal en una muestra de población mexicana.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar las mutaciones (deleciones) responsables de los fenotipos Becker y Duchenne.
2. Correlacionar el fenotipo clínico con el genotipo encontrado.
3. Determinar la frecuencia de mutaciones *de novo* en los pacientes mexicanos con DMD/DMB.
4. Determinar la frecuencia de recombinación en el gen DMD de pacientes mexicanos y compararla con la reportada en la literatura.
5. Determinar si existen "puntos calientes" de recombinación en el gen DMD y su correlación con los puntos calientes para las deleciones.
6. Detectar a las portadoras de las distrofias musculares tipos Duchenne y Becker.
7. Conocer la utilidad por separado y en forma conjunta, de los análisis de ligamiento (RFLPs) y por PCR-MC para el diagnóstico certero en familias con DMD/DMB.
8. Determinar la frecuencia de mosaicismo germinal.
9. Proponer un algoritmo diagnóstico fundamentado en biología molecular para familias con DMD/DMB, el cual incluya diagnóstico prenatal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Clasificación del estudio: Observacional, transversal, descriptivo y clínico.

I. Estrategia general.

A todos los integrantes de las 132 familias no relacionadas (132 pacientes masculinos, sus respectivas madres, y sus familiares de primer y segundo grado) se les realizó extracción de DNA genómico a partir de leucocitos de sangre periférica mediante la extracción fenol-cloroformo (169) con lo cual se constituyó el banco de DNA. El análisis molecular del gen DMD empleado en las 132 familias fue:

DETECCIÓN DE DELECCIONES EN LOS CASOS ÍNDICE DMD/DMB/DMI: A todos los pacientes con DMD/DMB se les realizó el análisis de deleciones por PCR múltiple del promotor muscular/exón1 y 21 exones (exones Pm-1, 3, 6, 8, 9, 12, 13, 16, 17, 19, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55 y 60), los cuales se amplificaron en 4 reacciones separadas. Los exones analizados representan a las regiones más frecuentemente deletadas en el gen DMD.

DETECCIÓN DE PORTADORAS DE DELECCIÓN: A todas las madres y familiares femeninas de los pacientes con mutación caracterizada, se les sometió a una evaluación de dosis génica por una versión no isotópica de PCR-MC; esta técnica fue la base más importante del proyecto para la detección de portadoras de deleciones en el gen DMD. Este análisis consistió en la coamplificación de al menos un exón no deletado en el caso índice (control interno) y un exón problema (deletado en el caso índice), así como el análisis paralelo de tres controles: un sujeto masculino sano, una mujer sana y un control negativo. Los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida y posteriormente a densitometría. La densitometría, documentó la dosis génica en las mujeres estudiadas, de tal manera que cuando ésta fue del 50%, la mujer se diagnosticó como portadora de la deleción, de lo contrario, si ésta era del 100%, se catalogó como una mujer no portadora.

DETECCIÓN DE PORTADORAS POR AL: Todos los integrantes de las 132 familias, fueron sometidos al análisis de tres marcadores polimórficos del gen DMD: pERT87.8/*TaqI* (intrón 13, tipo RFLP), pERT87.15/*XmnI* (intrón 17, tipo RFLP) y MP1P (región 3' no traducible, tipo VNTR bialélico). El análisis se llevó al cabo por PCR y posterior restricción con la endonucleasa específica, a excepción del marcador MP1P. Se integraron 9 haplotipos posibles y se identificaron los casos de recombinación, la segregación de los alelos DMD mutados y/o de riesgo en las familias, así como su utilidad para brindar AG.

DIAGNÓSTICO PRENATAL: Aquellas mujeres con riesgo elevado de recurrencia del padecimiento (portadoras de una deleción o de un alelo de riesgo caracterizado por haplotipos y con el fin de descartar mosaicismo germinal), fueron asesoradas genéticamente. Quienes solicitaron el estudio, fueron programadas para la realización de amniocentesis antes de la semana 16 de la gestación. Al análisis molecular del gen DMD se agregó la determinación de sexo, la cual consistió en la amplificación mediante PCR de secuencias heterocromáticas del brazo largo del cromosoma Y (DYZ1).

Con base en los datos generados se determinó: la frecuencia y localización de las deleciones; frecuencia de portadoras de las mutaciones; frecuencia de los polimorfismos intragénicos, porcentaje de recombinación intragénica, ocurrencia de mutaciones *de novo* y la utilidad de los marcadores y la PCR-MC para otorgar asesoramiento genético y diagnóstico prenatal a las familias con DMD/DMB.

En la **figura 10** se representa el diagrama de flujo seguido en el diseño experimental de esta tesis.

ALGORITMO METODOLÓGICO

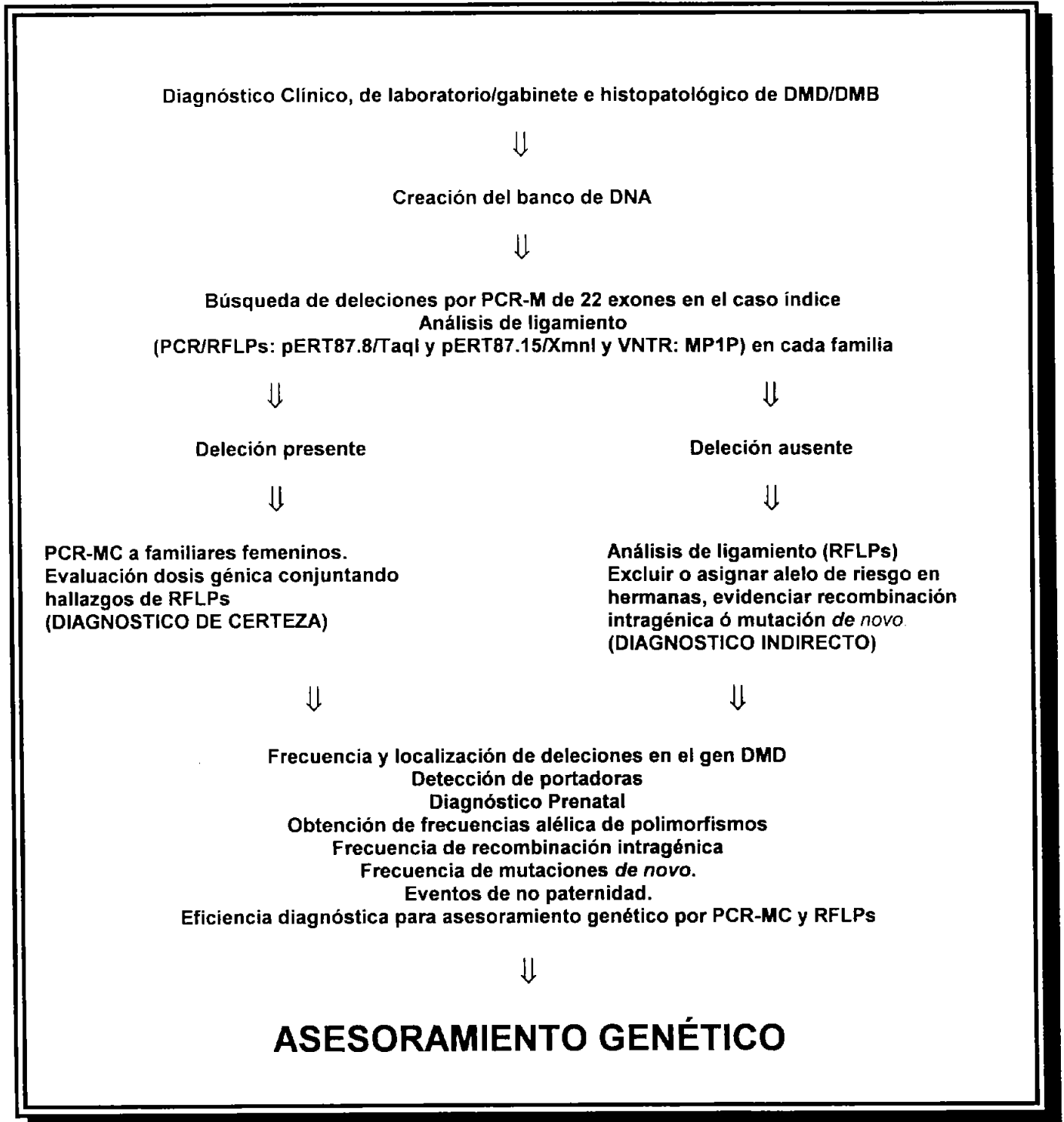


Figura 10. Algoritmo metodológico.

II. Población objetivo y estudio clínico.

Se incluyeron en el estudio un total de 132 familias no relacionadas captadas en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, S.S., todas constituidas al menos por un paciente afectado de DMD/DMB y su madre. Todos los abuelos paternos y maternos del caso índice nacieron en México. Para fines de análisis, sólo se incluyeron a 372 individuos (169 varones y 203 mujeres) pertenecientes a las 132 familias; de éstos, 132 fueron casos índice masculinos con DMD/DMB, 132 madres, 11 padres, 71 hermanas, 26 hermanos (10 de ellos con DMD/DMB). Cabe mencionar que en algunas familias se analizaron muestras de primas y primos hermanos, sobrinas (os), abuelas, tías y tíos por rama materna.

El diagnóstico de DMD/DMB/DMI fue realizado por el servicio de Genética Médica con base en la historia clínica completa con elaboración de árbol genealógico (**anexo 1**), determinación sérica de CPK, electromiografía y análisis histopatológico de rutina en biopsia muscular. La clasificación de los pacientes en fenotipos DMD, DMI ó DMB, se realizó con base a la gravedad del cuadro clínico, tomando en cuenta la edad de inicio, evolución y edad de la pérdida de la deambulación. Así, los pacientes que dejaron de caminar antes de los 15 años se clasificaron como DMD, mientras que los pacientes con pérdida de la deambulación después de los 16 años se consideraron como DMB. Los pacientes con fenotipo intermedio perdieron la capacidad para deambular a los 13-15 años.

De igual manera, se realizó el diagnóstico prenatal a partir de una muestra de líquido amniótico provenientes de 7 madres (2 portadoras de delección, 4 no portadoras de delección y 1 portadora probable de mutación no caracterizada) y 1 hermana (portadora probable de una delección en región 5'). Todas ellas contaban con previa caracterización molecular, a excepción de la hermana quién acude a diagnóstico prenatal a las 14 SDG por antecedente de DMD en uno de sus hermanos.

III. Criterios.

Inclusión:

1. Pacientes masculinos diagnosticados por el Servicio de Genética Médica del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. como distrofia muscular tipo Duchenne o Becker o con fenotipo intermedio y que cuente con electromiografía, valores de CPK sérica elevados y biopsia muscular con datos distróficos.
2. Familiares de 1er. grado.

Exclusión:

1. Familias que no cuenten con madre y caso índice disponibles para el estudio clínico, de laboratorio, de gabinete y molecular.
2. Familias cuyo caso afectado sea mujer y no se cuenten con datos de herencia recesiva ligada al cromosoma X.
3. Familias con caso afectado cuyo diagnóstico clínico, de laboratorio y gabinete sea de una distrofia muscular no debida a distrofinopatía (distrofia muscular congénita, DM facioescápulohumeral, DM tipo Emery-Dreiffus, DM miotónica, DM tipo Fukuyama).
4. Temporalmente, pacientes transfundidos en un lapso menor a tres meses.

IV. Estudio molecular.

IV.a. Extracción de DNA.

Se obtuvieron 7-15 ml de sangre periférica en tubos Vacutainer con EDTA o ACD, los leucocitos se separaron por centrifugación a 2,500 rpm, se lavaron con amortiguador para células rojas y se lisaron con proteinasa K. Se eliminaron las proteínas por extracción fenólica y el exceso de fenol fue retirado con 2 lavados de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1. El DNA se precipitó con NaCl y etanol a -20°C, se lavó con etanol al 70% a temperatura ambiente y posteriormente se resuspendió en 200-300 μ l de amortiguador TE pH 8.0. Para la cuantificación del DNA se realizó una dilución de 1:250 de DNA genómico:agua bidestilada y se cuantificó en un espectrofotómetro a una densidad óptica (D.O.) de 260 nm mediante la siguiente fórmula:

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

donde:

DO_{260} : = Densidad óptica a una λ de 260 nm

F= Constante equivalente a 0.05 (1 D.O.) = 50 μ g de DNA

Factor de dilución: Equivalente a 1:250 μ l

El criterio de pureza de fenol y proteínas, se obtuvo calculando el cociente entre las lecturas obtenidas a 240 nm (fenol) y 280 nm (proteínas) 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 en electroforesis en geles de agarosa al 0.7% a 100V por 30 minutos. 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 1 banda nítida de alto peso molecular (>23 kb del marcador de pesos moleculares fago λ /HindIII).

IV.b. Síntesis de oligonucleótidos iniciadores F y R.

Los oligonucleótidos se prepararon utilizando el método de fosforoamidita en un oligosintetizador (Pharmacia) y se purificaron en columnas de Sephadex G-25. La secuencia de los 22 exones y los 3 polimorfismos (pERT87.8/*TaqI*, pERT87.15/*XmnI*, MP1P) y el peso de los productos respectivos se muestran en la **Tabla 3**.

IV.c. Reacción de PCR-M.

La estrategia utilizada en nuestro laboratorio, puede amplificar 21 exones y el promotor muscular-exón 1 en 4 reacciones separadas (datos no reportados). La búsqueda de deleciones en los 132 casos índice con DMD/DMB/DML, se llevó al cabo con los 22 pares de oligonucleótidos sintetizados previamente. Se formaron 4 grupos de reacciones:

GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C	GRUPO D
Exón 45	Exón 1 y Pm	Exón 48	Exón 19
Exón 43	Exón 12	Exón 51	Exón 3
Exón 49	Exón 17	Exón 54	Exón 8
		Exón 44	Exón 55
Exón 16	Exón 50	Exón 6	Exón 13
		Exón 60	
Exón 47	Exón 52	Exón 53	

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos.

SEG.DMD	SECUENCIA PRIMER	TAMAÑO DEL AMPLICON (pb)
PCR MÚLTIPLE DE 22 SEGMENTOS		
Pm1	F: GAAGATCTAGACAGTGGATACATAACAAATGCATG R: TTCTCCGAAGGTAATTGCCTCCCAGATCTGAGTCC	535
EXON 3	F: TCATCCATCATCTTCGGCAGATTA R: CAGGCGGTAGAGTATGCCAAATGAAAATCA	410
EXON 6	F: CCACATGTAGGTCAAAAATGTAATGAA R: GTCTCAGTAATCTTCTTACCTATGACTATGG	202
EXON 8	F: GTCCTTTACACACTTTACCTGTTGAG R: GGCCTCATTCTCATGTTCTAATTAG	360
EXON 12	F: GATAGTGGGCTTTACTTACATCCTTC R: GAAAGCACGCAACATAAGATACACCT	331
EXON 13	F: AATAGGAGTACCTGAGATGTAGCAGAAAT R: CTGACCTTAAGTTGTTCTTCCAAAGCAG	238
EXON 16	F: TCTATGCAAATGAGCAAATACACGC R: GGTATCACTAACCTGTGCTGTACTC	290
EXON 17	F: GACTTTCGATGTTGAGATTACTTTCCC R: AAGCTTGAGATGCTCTCACCTTTTCC	416
EXON 19	F: TTCTACCACATCCCATTTTCTTCCA R: GATGGCAAAAAGTGTGAGAAAAAGTC	459
EXON 43	F: GAACATGTCAAAGTCACTGGACTTCATGG R: ATATATGTGTTACCTACCCTTGTCGGTCC	357
EXON 44	F: CTTGATCCATATGCTTTTACCTGCA R: TCCATCACCTTCAGAACCTGATCT	268
EXON 45	F: AAACATGGAACATCCTTGTGGGGAC R: CATTCTATTAGATCTGTGCGCCCTAC	547
EXON 47	F: CGTTGTTGCATTTGTCTGTTTCAGTTAC R: GTCTAACCTTTATCCACTGGAGATTTG	181
EXON 48	F: TTGAATACATTGGTTAAATCCCAACATG R: CCTGAATAAAGTCTTCCCTTACCACAC	506
EXON 49	F: GTGCCCTTATGTACCAGGCAGAAATTG R: GCAATGACTCGTTAATAGCCTTAAGATC	439
EXON 50	F: CACCAAATGGATTAAGATGTTTCATGAAT R: TCTCTCTCACCCAGTCATCACTTCATAG	271
EXON 51	F: GAAATTGGCTCTTTAGCTTGTGTTTC R: GGAGAGTAAAGTGATTGGTGGAAAATC	388
EXON 52	F: AATGCAGGATTTGGAACAGAGGCGTCC R: TTCGATCCGTAATGATTGTTCTAGCCTC	113
EXON 53	F: GGCTCTGGCCTGTCCTAAGAC R: CAGAACC GGAGGCAACAGTTGA	100
EXON 54	F: AGGATTCAGAAGCTGTTTACGAAGT R: AATCCTCATGGTCCATCCAGTTTCA	329
EXON 55	F: ATGAGTTCACTAGGTGCACCACTTCT R: TGTTCAATTGGATCCACAAGAGTGC	303
EXON 60	F: AGGAGAAAATTGCGCCTCTGAAAGAGAACG R: CTGCAGAAGCTTCCATCTGGTGTTCAGG	139
RFLPs		
pERT87.8 <i>TaqI</i>	F: GTCAGTTGGTCAGTAAAAGCC R: CAGATCAGTCGACCAATTTAAAACCCACAGCAG	A1: 145 A2: 71 / 74
pERT87.15 <i>XmnI</i>	F: GACTGGAGCAAGGGTCGCC R: CTGATGAACAATTTCCCTTTCATTCCAG	A1: 740 A2: 520 / 220
VNTRs		
MP1P MP1P	F: ATGATCAGAGTGAGTAATCGGTTGG R: ATATCGATCTAGCAGCAGGAAGCTGAATG	A1:60 A2: 56

Para los 4 grupos se mezclaron de 250-500 ng de DNA genómico con una solución que contenía: amortiguador para el fragmento Stoffel[®] de la *Taq* polimerasa (10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl), 200 μ M de dNTPs, 0.1-0.25 μ M de oligonucleótidos iniciadores F y R, 3 U de *Taq* polimerasa y 6.8 mM de MgCl₂, a un volumen final de reacción de 50 μ l. Como control de cada reacción se agregó un tubo conteniendo todos los reactivos excepto DNA. El volumen de reacción se cubrió con 25 μ l de aceite mineral grado molecular para evitar la evaporación de la muestra.

Las reacciones de amplificación se llevaron al cabo en un termociclador (DNA Thermal Cycler 480 de Perkin Elmer) bajo los siguientes parámetros: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min seguida de 26 ciclos constituidos por: desnaturalización a 94°C por 50 seg, alineación a 55°C por 1 min. y extensión a 68°C por 4 min, con una extensión final de 72°C por 5 min.

IV.d. Electroforesis de los productos de la PCR-M en geles de agarosa.

Las muestras amplificadas (15 μ l) se corrieron 30 minutos a 100 V en un gel de agarosa al 3.0%. Los productos de PCR se visualizaron y se fotografiaron en un transiluminador con luz UV con película Polaroid 667. Se corroboraron los pesos moleculares de cada amplificado por su migración y con respecto a un marcador de pesos moleculares de 100 pb.

IV.e. Reacción de PCR-MC.

La técnica de PCR-M, cuando se modifica para hacerla cuantitativa, se puede aplicar a la detección de duplicaciones, mutación no detectable por simple PCR-M (167,169). Asimismo ésta se aplica a la determinación de dosis génica en la detección de

mujeres portadoras (187-191). Se analizaron las muestras de las madres y hermanas de los pacientes en los que se encontraron deleciones mediante la técnica de PCR-M. En este procedimiento se aseguró que todas las reacciones se hicieran con la misma cantidad de DNA (125 ng) y se utilizaron las condiciones descritas para PCR-M, excepto por la utilización de una concentración de oligonucleótidos a 0.5 μ M.

Las condiciones para la amplificación se ajustaron de la siguiente manera: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min seguida de 23 ciclos de desnaturalización a 94°C por 48 seg alineación a 56°C por 48 seg, extensión a 68°C por 3 min con incrementos de 5 seg en cada ciclo, seguidos de una elongación final de 3 min a 68°C. Para cada familia en particular se analizaron uno o dos de los exones afectados en el paciente y se utilizarón como control intramuestra uno o dos de los no deletados. Asimismo se corrieron en forma simultánea las muestras de un sujeto femenino y masculino normales como controles intermuestra, y el control blanco sin DNA.

IV.f. Electroforesis de los productos de la PCR-MC en geles de poliacrilamida.

Las muestras de los amplificados obtenidos por PCR-MC se corrieron en geles de poliacrilamida al 5% durante 45 min a 75 V para lograr una visualización y un registro fotográfico de la intensidad de las bandas generadas por cada uno de los amplificados. El peso de cada amplificado se corroboró con base en su migración con respecto a un marcador de pesos moleculares de 100pb. El gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio (100 μ g/100ml en solución acuosa) por 10 minutos y posteriormente se quitó el exceso de bromuro de etidio por inmersión del gel en agua bidestilada. Los productos amplificados se visualizaron en un transiluminador con luz UV y se fotografiaron con película Polaroid 665 (ASA300), con positivo y negativo.

IV.g. Determinación de dosis génica.

El negativo fotográfico obtenido del paso anterior se analizó en un densitómetro automático (CliniscanTM). Se obtuvieron los picos máximos para muestras problemas y en cada una de las reacciones se incluyeron muestras controles de hombres y mujeres normales y se calcularon los valores promedio para cada una de las bandas. Se consideró además la variación intramuestra que resulta de la comparación de la intensidad generada por la amplificación en el mismo individuo, tomando como referencia la eficiencia de amplificación de los mismos exones en sujetos normales (controles). La variación en cuanto a eficiencia de amplificación para cada uno de los exones fue un hallazgo reproducible en los ensayos por duplicado de todas las muestras. Este fenómeno de amplificación desigual intramuestra en todos los segmentos analizados se debe básicamente al tamaño de cada uno de los amplificados, a las diferencias sutiles de las *Tm* óptimas respectivas de los oligonucleótidos iniciadores, a la concentración ideal de Mg⁺⁺ libre para cada uno de los amplificados y finalmente al porcentaje de G-C en cada uno de los exones (169,187,188). Así, al igual que en otros reportes, los exones con alta eficiencia de amplificación producen picos mayores en el análisis densitométrico con respecto a los de menor eficiencia, aún en estudios que utilizan fluorocromos (187-190), sin embargo esto no interfiere con la asignación de dosis génica, ya que incluso los amplificados de mayor eficiencia de amplificación muestran doble dosis en los controles femeninos con respecto a los masculinos.

Asimismo consideramos la variación intermuestra a aquella que resultó de la comparación de la intensidad generada por cada exón en un individuo (problema y control) y con base en ello se determinó la dosis génica de las muestras problemas. Las relaciones resultantes se obtuvieron a partir de dicha comparación (1:2:1, hombre normal : mujer normal : mujer portadora de delección, respectivamente).

Así la dosis génica atribuida a cada muestra se interpretó como sigue:

- * Una sola dosis: varón normal o mujer portadora de delección según sea el caso: 50% =1.
- * Doble dosis: mujer normal: 100% =2.

IV. h. Análisis de RFLPs / VNTR (pERT87.8/*TaqI*, pERT87.15/*XmnI* y MP1P).

Para esta parte del estudio se incluyeron las 132 familias. Se estudiaron mediante PCR, 3 sitios polimórficos intragénicos del locus DMD, ampliamente utilizados para consejo genético en otras poblaciones (180,202): pERT87.15/*XmnI* (X) y pERT87.8/*TaqI* (T) y MP1P (P/M). La amplificación de estos sitios polimórficos se llevó al cabo mezclando 100-250 ng de DNA genómico en una solución con amortiguador para el fragmento Stoffel® de la *Taq* polimerasa (10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl), 2.0 UI de AmpliTaq fragmento Stoffel®, 0.1µM de cada oligonucleótido iniciador, 150µM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 5% de DMSO (únicamente para *XmnI*), en un volumen de reacción final de 50 µl. En el caso de *TaqI* y MP1P, la reacción se llevó al cabo bajo las siguientes condiciones: se inició con una desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 50 seg, alineación a 55 °C por 50 seg y extensión a 70°C por 3 min y una elongación final a 70°C por 5 min. Para *XmnI*, fueron 26 ciclos bajo las mismas condiciones exceptuando la temperatura de extensión que fue a 68°C. La restricción se llevó al cabo mezclando el amplificado con 3UI de *TaqI* o 12UI de *XmnI* a 65°C y 37°C respectivamente, durante toda la noche. Los productos de restricción de *TaqI* y *XmnI* se corrieron en geles de agarosa al 3.0% bajo las condiciones ya descritas. La interpretación de los alelos MP1P se realizó mediante electroforesis (120V / 45 min) en geles de poliacrilamida al 9% (C.L. 3.3%) para posteriormente ser teñidos, visualizados y fotografiados de la manera previamente descrita para los geles de poliacrilamida de la

dosis génica. 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 RFLPs.

IV. i. Diagnóstico prenatal molecular de DMD/DMB.

Mediante amniocentesis realizada a las 16 SDG se obtuvieron de 15-20 ml de líquido amniótico (LA). De 5-10 ml de la muestra obtenida se centrifugó a 2500 rpm a temperatura ambiente con la finalidad de separar a los amniocitos. En tres de los diagnósticos prenatales realizados, el 50% del volumen del LA fue destinado para estudio citogenético. Los amniocitos se procesaron mediante la técnica de fenol-cloroformo para la obtención del DNA genómico total.

La búsqueda de deleciones se realizó mediante la amplificación por PCR-M 2-10 exones seleccionados dependiendo de la deleción presente en la familia. Siempre se incluyó un exón no deletado en la familia como control interno, así como un control masculino y negativo de la reacción. De igual manera la muestra problema se corrió por duplicado en todos los ensayos. La PCR-M se llevó al cabo con 50-100 ng de DNA genómico, con una solución que contenía: amortiguador para la *Taq* polimerasa *AmpliTaq Gold*[®] (10mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl), 200 μ M de dNTPs, 0.1-0.25 μ M de oligonucleótidos iniciadores F y R, 2 UI *Taq* polimerasa *AmpliTaq Gold*[®] y 4 mM de $MgCl_2$, a un volumen final de reacción de 50 μ l. El volumen de reacción se cubrió con 25 μ l de aceite mineral grado molecular para evitar la evaporación de la muestra.

Las reacciones de amplificación se llevaron al cabo en un termociclador (DNA Thermal Cycler 480 de Perkin Elmer) bajo los siguientes parámetros: desnaturalización inicial a 95°C por 8 min seguida de 30 ciclos constituidos por: desnaturalización a 95°C por

1 min, alineación a 56°C por 1 min y extensión a 68°C por 4 min, con una extensión final de 72°C por 5 min. La electroforesis, visualización y registro de los productos de amplificado, se realizó de la forma antes descrita.

De manera paralela a la PCR-M, se realizó la determinación rápida de sexo a través de la amplificación de secuencias Y-específicas denominadas DYZ1, localizadas en la región heterocromática del cromosoma Y (Yq12) (203). La reacción de PCR incluyó 50 ng de DNA genómico, buffer para la *Taq* polimerasa AmpliTaq Gold® (10mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl), 200 µM de dNTPs, 0.1 µM de oligonucleótidos iniciadores F y R, 1UI de *Taq* polimerasa AmpliTaq Gold® y 2.5 mM de MgCl₂, para un volumen final de reacción de 50 µl. El programa de PCR empleado consistió en una desnaturalización inicial a 95°C por 8 min, seguida de 25 ciclos con desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineación a 58°C por 1 min y una extensión a 72°C por 2 min, finalizando con una extensión de 72°C por 10 min. La muestra problema se analizó por duplicado y se incluyeron a un control masculino (presencia del producto de PCR), un control femenino (ausencia de producto de PCR) y un control blanco sin DNA. La electroforesis, visualización y registro de los productos de PCR Y-específicos fue la descrita para los polimorfismos *Xmnl* y *TaqI*. Cuando el amplicón indicaba la presencia de un cromosoma Y, éste era compatible con un complemento sexocromosómico XY y por ende el producto era del sexo masculino.

IV. j. Diagnóstico molecular para la exclusión de paternidad.

Debido a la incongruencia de genotipos de los polimorfismos *Xmnl* y *TaqI* encontrados en algunas familias, fue necesario aplicar el estudio de un marcador altamente polimórfico con la finalidad de descartar la paternidad en algunos de los integrantes de dichas familias, pues la no paternidad puede conducir a errores de asignación/exclusión del diagnóstico de portadoras a través del análisis de ligamiento.

Para tal efecto se procedió a amplificar mediante PCR un marcador autosómico del tipo VNTR, multialélico (27 alelos posibles con una unidad básica repetitiva de 16 pb) denominado D1S80 (1p36.3) (204). La reacción incluyó 10 ng de DNA genómico, con buffer para la *Taq* polimerasa AmpliTaq Gold® (10mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl), 250 µM de dNTPs, 0.01 µM de oligonucleótidos iniciadores F y R, 1UI de *Taq* polimerasa AmpliTaq Gold® y 1.5 mM de MgCl₂, para un volumen final de reacción de 50 µl. El programa de PCR empleado consistió en una desnaturalización inicial a 95°C por 8 min, seguida de 29 ciclos con desnaturalización a 95°C por 1 min, alineación a 65°C por 1 min y una extensión a 72°C por 1 min, finalizando con una extensión de 72°C por 10 min. Los productos de PCR (5 µl) provenientes de los integrantes de una familia, junto con un marcador de pesos alélicos conocidos para D1S80, se sometieron a electroforesis vertical en geles no desnaturalizantes de 32 cm tipo secuenciación de poliacrilamida al 7.5% (C.L. 2.0%), a 50 watts y 90 minutos de corrimiento. Los geles se tiñeron con nitrato de plata (204). La interpretación de los alelos se realizó comparando el peso del amplicón respecto al marcador de pesos alélicos y siempre se buscó la presencia obligada de alguno de los dos alelos paternos en la descendencia en cuestión.

La misma metodología fue empleada para indagar posible contaminación con células maternas en LA que presentaban aspecto hemático.

V. Correlación fenotipo-genotipo.

Este análisis se realizó de acuerdo a la hipótesis de Mónaco (1,124), donde se propone con base al número de nucleótidos en el extremo 3' del exón que antecede al deletado (1, 2 o 3 nucleótidos) y de los nucleótidos 5' del exón siguiente a la deleción, se puede inferir pérdida o no del marco de lectura. Este efecto sobre el marco de lectura se dedujo del conocimiento de la secuencia y los límites de cada exón y de empalmar los

límites de los exones que quedaban contiguos por el efecto de la eliminación del o los exones (1,99). Este tipo de análisis sólo puede hacerse cuando se conocen los límites precisos de la deleción y exones restantes.

RESULTADOS

Del total de las 132 familias, 102 (77.3%) presentaron fenotipo Duchenne, 26 (19.7%) fenotipo Becker y 4 (3%) fenotipo intermedio. Asimismo, 91 de ellos (68.93%) fueron familias con casos únicos, en tanto que el resto (n=41 familias, 31.06%) tenían historia familiar positiva de DMD/DMB (23 con fenotipos Duchenne, 16 con fenotipos Becker y 2 con fenotipos intermedios). Las madres portadoras obligadas de estas 41 familias, tenían antecedentes de hermano, tío o primo por rama materna con DMD/B u otro hijo afectado por la misma patología.

En la totalidad de los sujetos analizados se obtuvo DNA genómico de buena calidad y cantidad (**Fig. 11**).

I. Caracterización de las deleciones en pacientes DMD/DMB mediante PCR-M.

En todos los casos índice se realizó PCR-M y mediante esta metodología fue posible detectar o descartar deleción del gen DMD de cualquiera de los 22 segmentos analizados (**Fig. 12**).

En todos los fenotipos (intermedios, Becker y Duchenne), se documentaron deleciones de tamaño variable en la región 5' o en la región central. El 53.8% (n=71 pacientes) de los casos presentaron deleciones en el gen de la distrofina; el 84.5% (n=60) fue DMD, el 11.3% (n=8) DMB y el 4.2% (n=3) DMI. El 73.2% de las deleciones (n=52 pacientes) se localizó en la región central (exones 43 al 55) o punto caliente mayor y el 19.7% (n=14 pacientes) en el punto caliente menor o región 5' (Pm-exón 1 al 19) (**Fig. 13**). El resto de éstas correspondieron a grandes deleciones que abarcaron de la región 5' a la región central (1.4%, n=1 paciente), de la región central a la región 3' (1.4%, n=1 paciente) ó deleción completa del gen (n=3, 4.2%) que fue evidenciada por la ausencia de amplificación en los 22 segmentos analizados (**Fig. 14**). En uno de estos últimos pacientes, se logró amplificar sólo el Pm1.

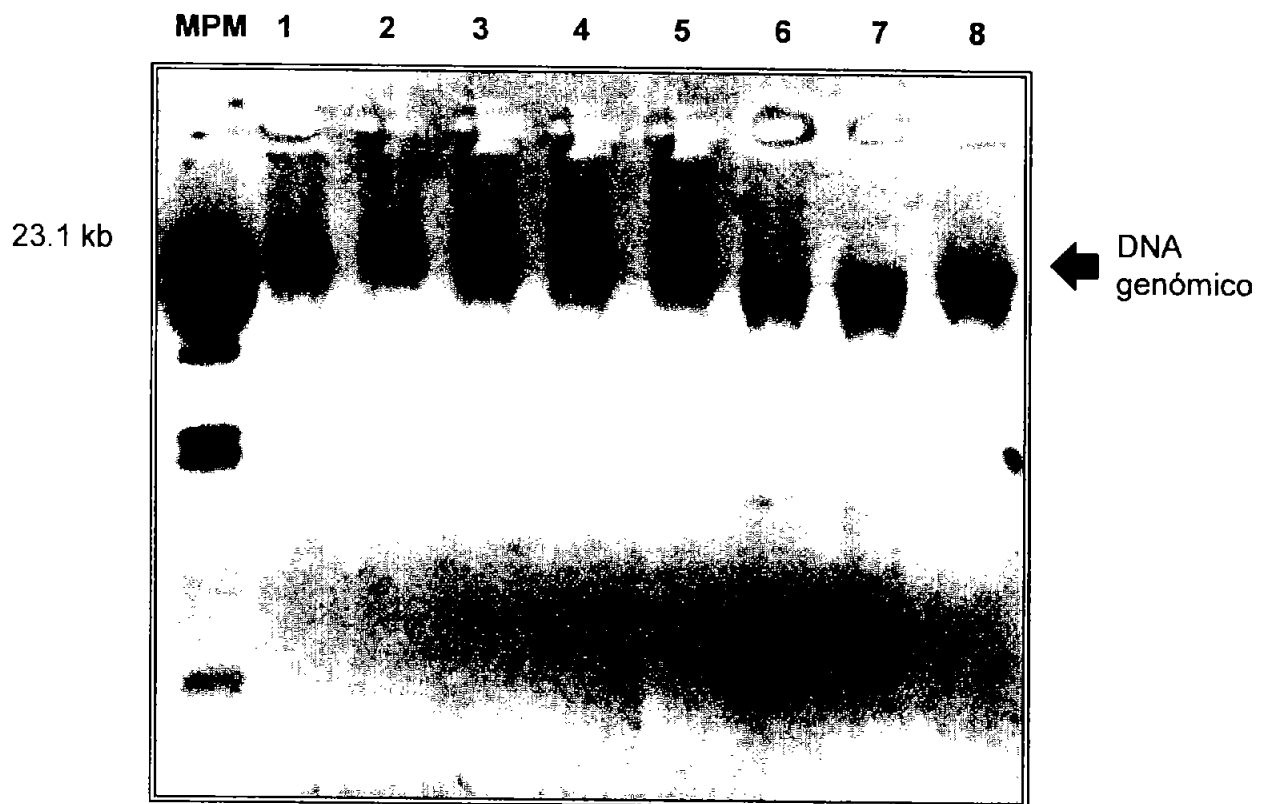
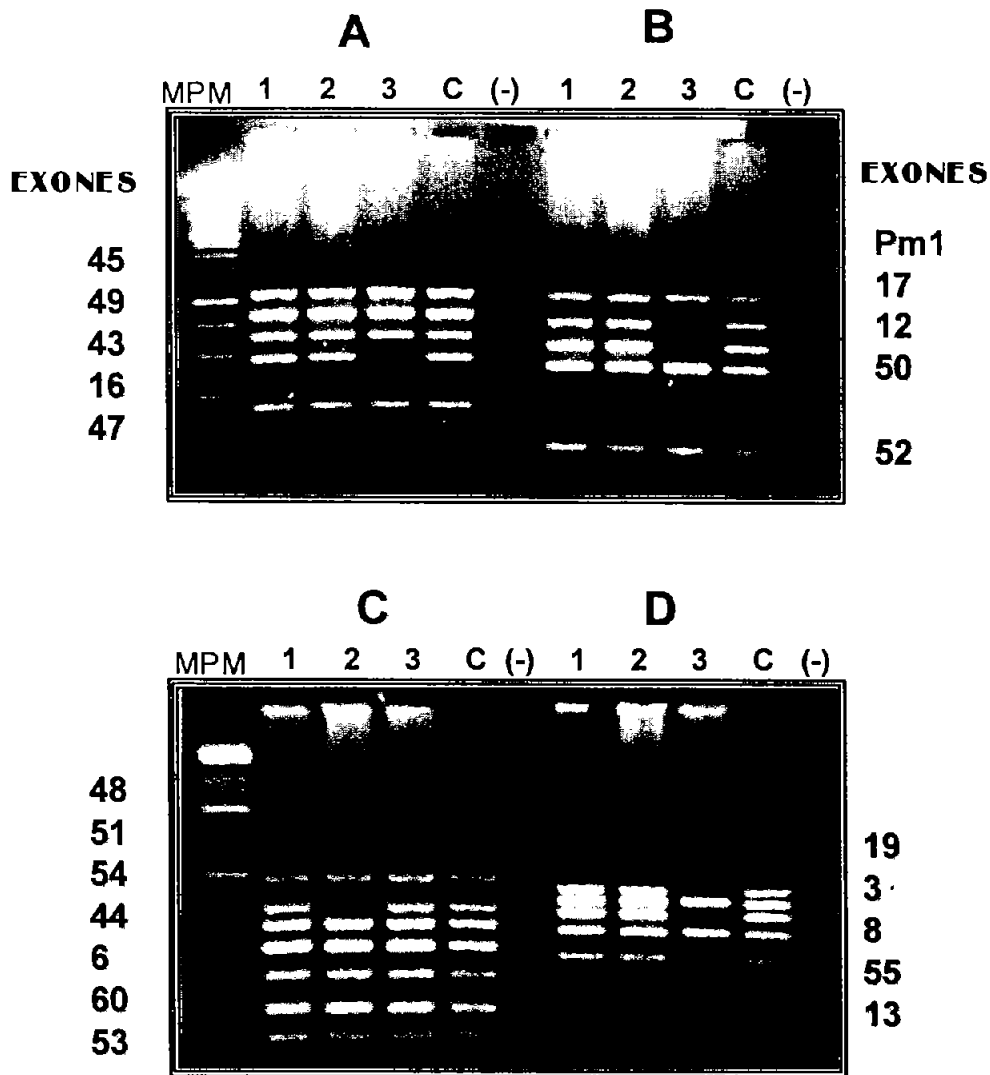


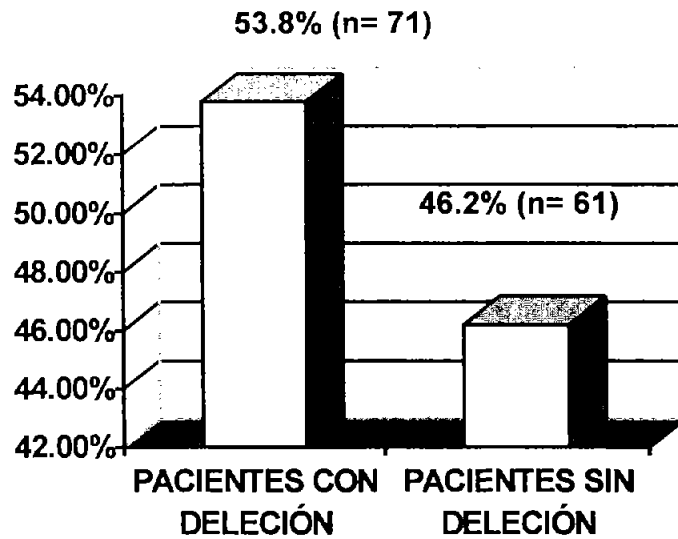
Figura 11: Gel de agarosa al 0.7%, que muestra el patrón electroforético del DNA genómico obtenido a partir de leucocitos de sangre periférica de ocho individuos. Nótese una sólo banda que comigra con el fragmento de 23.1 kb del fago λ HindIII.



Agarosa al 3%

Figura 12: Ensayo de PCR-M de 22 exones del gen DMD. MPM: marcador de pesos moleculares, escalera de 100 pb. Carril 1: pacientes DMD sin delección de los exones analizados; carril 2: paciente DMD con delección del exón 48 (región central) (Grupo C), nótese que los exones 47 y 49 están intactos (Grupo A); carril 3: paciente DMD con delección del exón 8 al 19 (región 5') (Grupo D: 8, 13, 19; grupo A; 16, grupo B: 12 y 17) se desconoce la integridad de los exones 7 y 20; carril C: control masculino sano; carril (-): blanco.

A)



B)

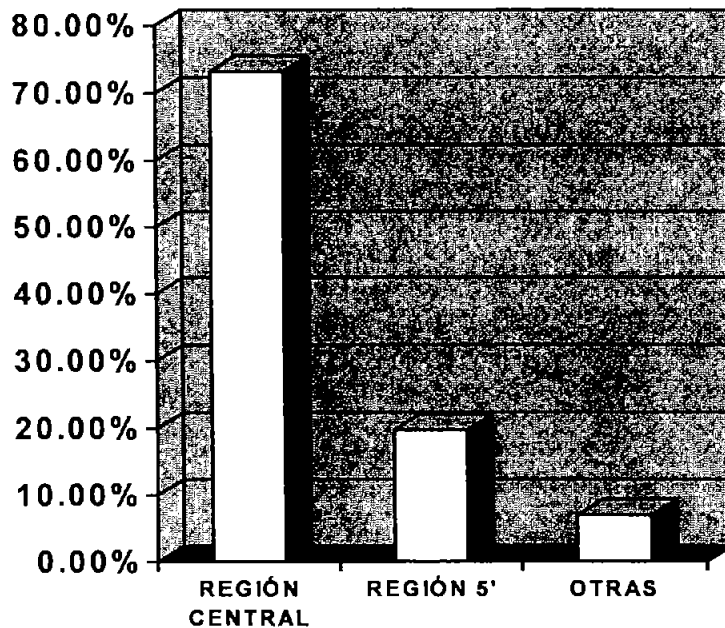


Figura 13: A) Frecuencia de las deleciones en los 132 casos índice estudiados por PCR-M de 22 exones. B) Distribución de las deleciones encontradas en 71 casos índice; se observa una alta ocurrencia de éstas en el punto caliente central del gen DMD.

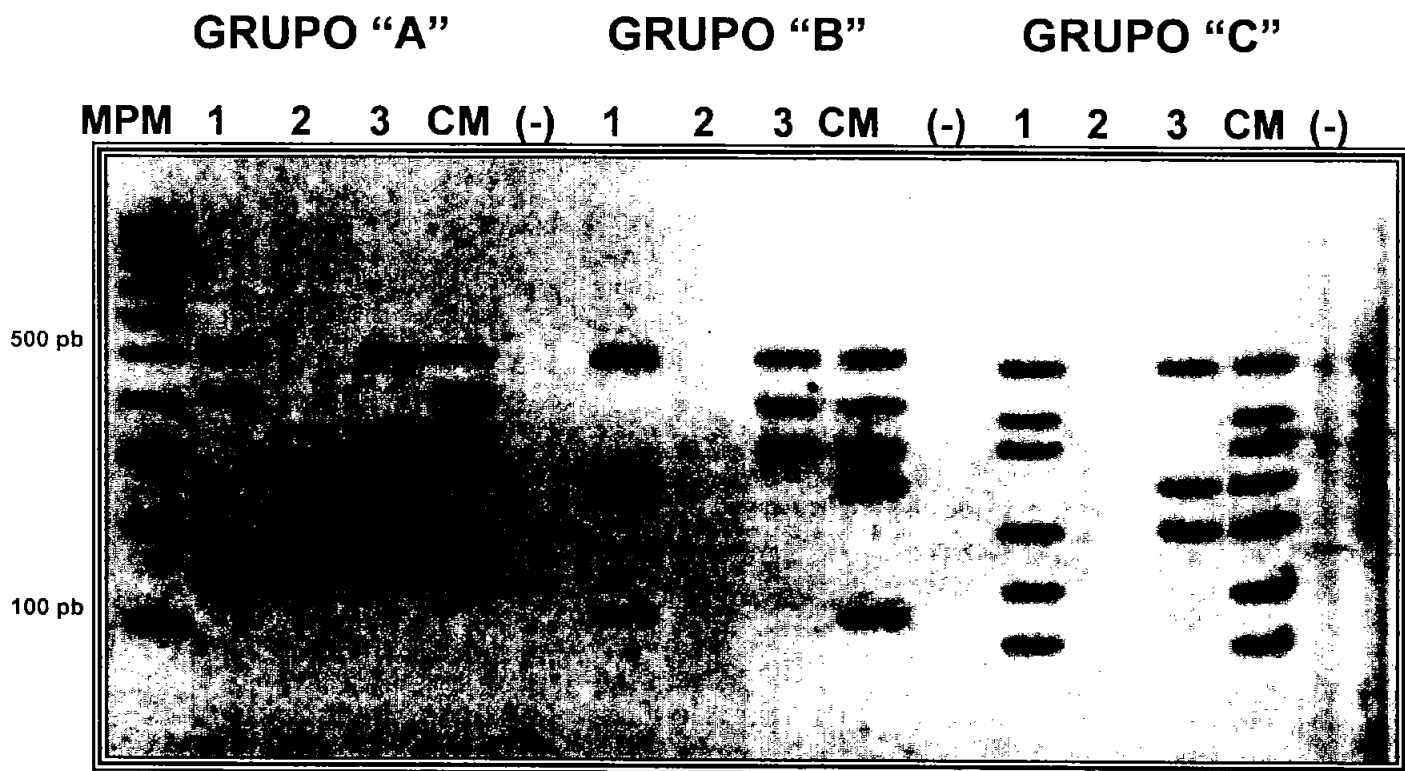


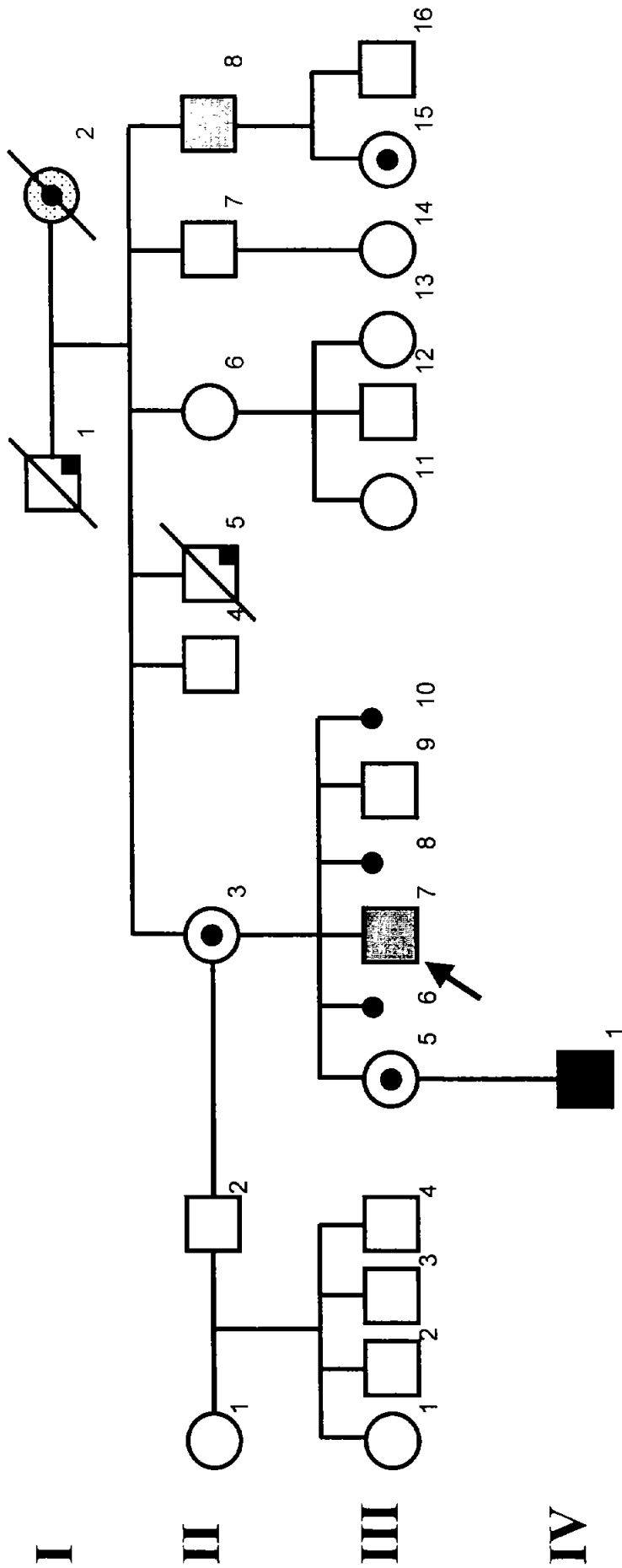
Figura 14. Análisis de PCR-M de 17 exones en tres pacientes DMD con grandes deleciones. Carril 1: paciente con deleción del exón 12 (región 5') al 44 (región central); carril 2: paciente con deleción completa del gen, evidenciada por la ausencia del producto de PCR desde el Pm-exón 1 hasta el exón 60; carril 3: paciente con deleción del exón 49 (región central) al exón 60 (región 3'). CM: control masculino sano; (-), blanco de las tres reacciones. MPM: marcador de pesos moleculares escalera de 100 pb.

Los pacientes con delección completa del gen, de la región 5' a la región central (exones 12 al 44) y de la región central hasta la región 3' (exones 49 al 60), manifestaron siempre fenotipos Duchenne (**Figs. 13 y 14**), incluso en uno de los pacientes con delección total se dedujo aneusomía segmentaria expresada como un síndrome de genes contiguos ya que además de manifestar DMD, presentó características clínicas de insuficiencia adrenal, sugiriendo que la delección afecta al menos al gen DMD y al gen de la hipoplasia adrenal congénita, cuyos loci están contiguos.

Las delecciones de los exones 3 al 6 (se desconoce el estado de los exones 2 y 7), 12 al 19 (se desconoce la integridad de los exones 11 y 20), 48 al 55 y 45 al 53 sólo estuvieron en pacientes con DMB (n=5), dichas delecciones se encuentran fuera de marco, con excepción de la que involucra a los exones 3 y 6. La delección de los exones 45-48, 45-47 y 6, estuvieron presentes tanto en los tres pacientes restantes con DMB, como en algunos pacientes con fenotipo DMD y de hecho en las mutaciones de la región central se documentó la integridad de los exones 44 y 49, por lo que se deduce un corrimiento del marco de lectura. La delección del exón 6 mantiene el marco de lectura abierto, incluso se pudo documentar en dos familias (casos familiares extensos) la coexistencia de pacientes con fenotipos DMB y DMD (variación intrafamiliar) (**Fig. 15**) que portaban delecciones del exón 6 y 45 al 48.

Tres de los 4 pacientes con DMI, también presentaron delecciones (2 en región central y 1 con delección en región 5'). Las delecciones centrales de los exones 48-50 y 47-51 (sin conocer integridad de exón 46) también estuvieron presentes en pacientes con DMD; sólo la delección de la región 5' (exones 3-12, sin conocer integridad de exón 2) fue exclusiva del tercer paciente DMI con delección y de hecho el defecto condiciona corrimiento del marco de lectura.

Si bien fue cierto que la mayoría de las delecciones de la región 5' o central de los pacientes con DMD condicionaron corrimiento del marco de lectura o eliminaron grandes extensiones del gen DMD, hay delecciones que no concordaron con la Hipótesis de Mónaco, pues en teoría no se alteró el marco de lectura, pero condicionaron fenotipos DMD; un ejemplo de ello fueron 2 pacientes con eliminación de los exones 48-49 (exones



IV-1: DMD. Evolución rápidamente progresiva. Signo de Gowers franco a los 5 años. No sube escaleras a los 6 años. PCR-M: Delección en región central (exones 45-48).



I-1 y II-5: Muerte por alcoholismo



II-8 y III-7: DMB. Capacidad para deambular y subir escaleras >16 años. Estudio de CPK, biopsia muscular, EMG: distrofinopatía. PCR-M: Delección en región central (exones 45-48).



I-2: Portadora obligada DMB. Muerte por carcinoma cervicouterino.

Figura 15. Árbol genealógico de una familia donde coexisten fenotipos DMD y DMB atribuibles a una delección de los exones 45-48, ejemplificando un caso poco común de variabilidad intrafamiliar reportadas en distrofinopatías.

47 y 50 íntegros) y 51 (exones 50 y 52 íntegros), donde ambas deleciones mantuvieron el marco de lectura.

II. Detección de portadoras.

Ila. Dosis génica en familias con deleción: Análisis con PCR-MC

De acuerdo con los datos obtenidos por genealogía de las 132 familias, fué de llamar la atención que sólo el 31.06% de ellas contó con antecedentes familiares, presentándose un alto número de familias con casos únicos (68.93%, n=91 familias). Las madres de los casos únicos y las hijas de portadora obligada (PO) fueron catalogadas como portadoras probables (PP). Todas las madres de los casos únicos con deleción, independientemente de ser PO o PP, fueron sometidas a evaluación de dosis génica de segmentos del gen DMD mediante PCR-MC (**Figs. 16,17,18**). En el 100% (n=19) de las PO donde se detectó deleción en el caso índice se logró confirmar su estado de portadora; mientras que de las madres de casos únicos con deleción (n=52), sólo el 9.6% (n=5), se detectó como portadora de deleción. Así, las deleciones heredadas a través de una madre portadora se observaron en 24 de las 71 familias con deleción (33.8%) (**Fig. 19**), ninguna de las madres sin deleción fue asignada como PO por genealogía, por lo que se descartó la presencia de mosaicismo germinal. En el 66.2% (n=47 madres) de las familias la deleción fue generada por un evento *de novo* en línea germinal, aunque en ellas no se pudo descartar mosaicismo germinal.

De igual manera, todas las hermanas, hijas de madres portadoras de deleción se sometieron a PCR-MC para descartar o asignar con certeza el estado de portadora. Dos mujeres portadoras manifestaron diferentes grados de compromiso muscular; una de ellas fue heterocigota de una deleción de los exones 53-54 confirmada por PCR-MC manifestó un cuadro clínico leve con hipercreatininfosfocinemia de 2,034 UI/dl, Gowers negativo y caídas aparentemente frecuentes. Mientras que la otra portadora de una mutación desconocida, manifestó un fenotipo Becker, quedó confinada a silla de ruedas a los 25 años y murió a causa de una cardiomiopatía dilatada que la llevó a insuficiencia cardíaca a los 30 años.

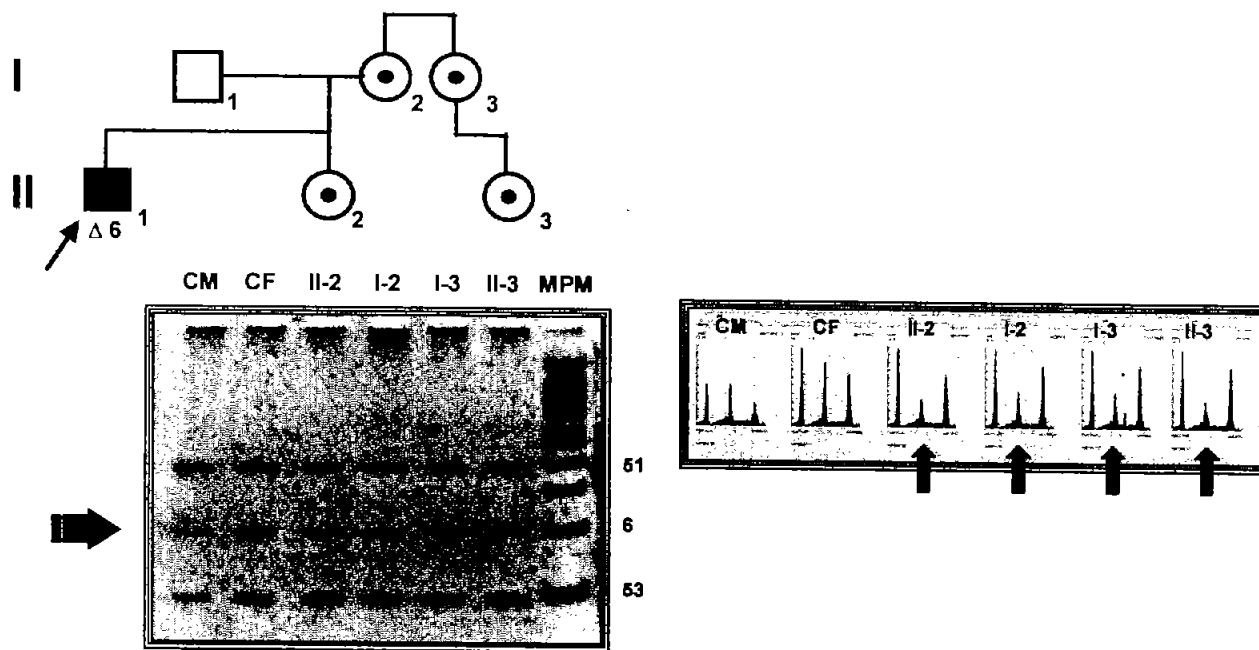
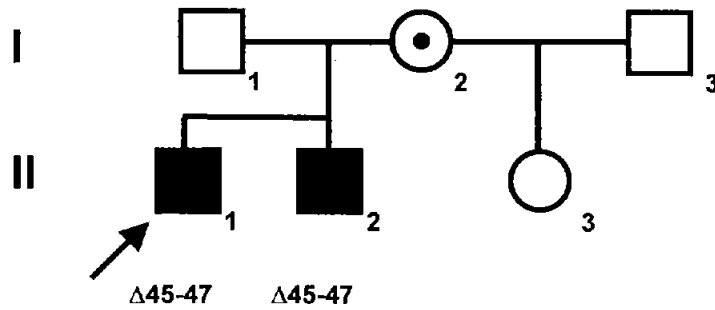


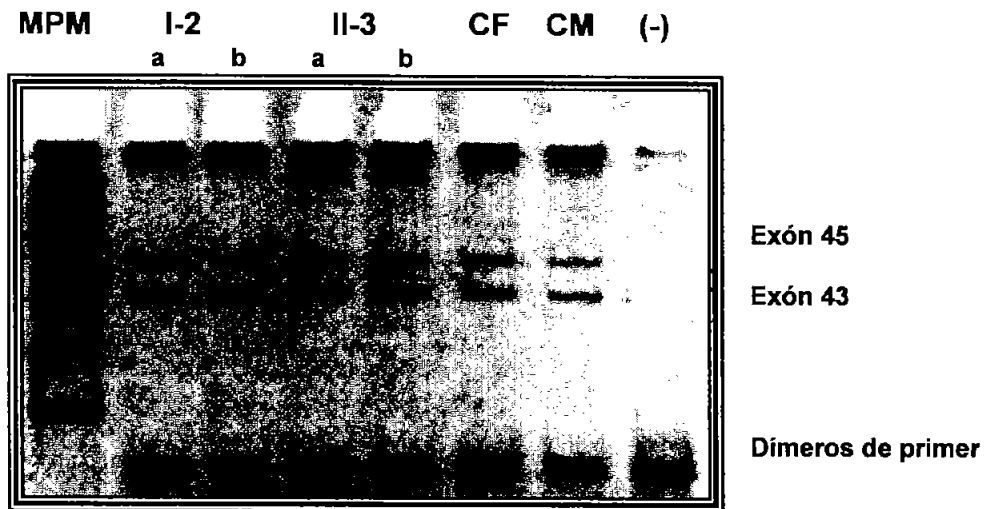
Figura 16: Dosis génica en mujeres de familias con antecedentes DMB, atribuible a una deleción del los exones 3 al 6. A) La PCR-MC demostró reducción de la dosis génica para el exón 6 en I-2, I-3, II-2 y II-3; CF: control femenino; CM: control masculino; MPM: marcador de pesos moleculares, escalera de 100 pb. B) La densitometría muestra reducción del 50% de la dosis génica para el exón 6 en I-2, I-3, II-2 y II-3, respecto al CF; en tanto la dosis génica para los exones controles, conserva la doble dosis respecto al CM.

Las flechas en la fotografía del gel del gel de poliacrilamida y en el análisis densitométrico indican el exón afectado.

A)



B)



EVALUACIÓN DENSITOMÉTRICA

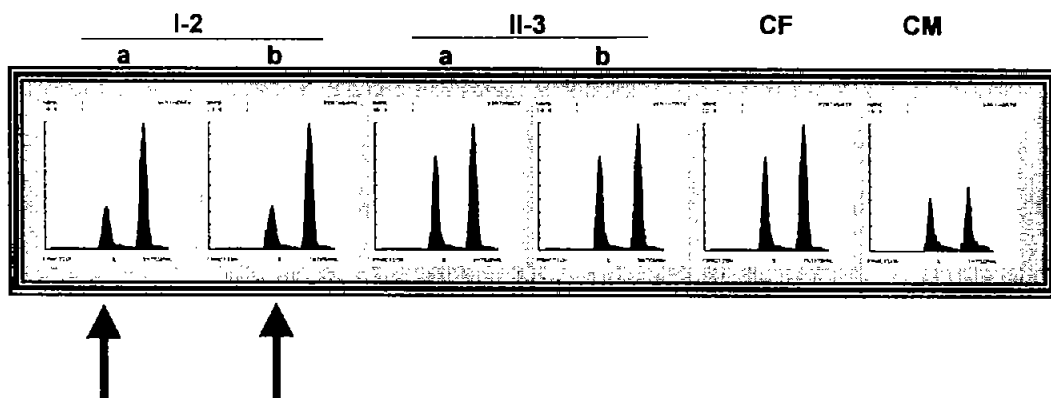
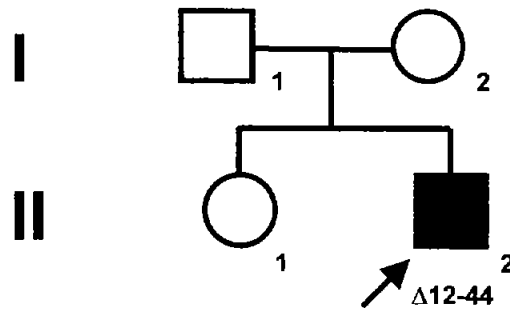
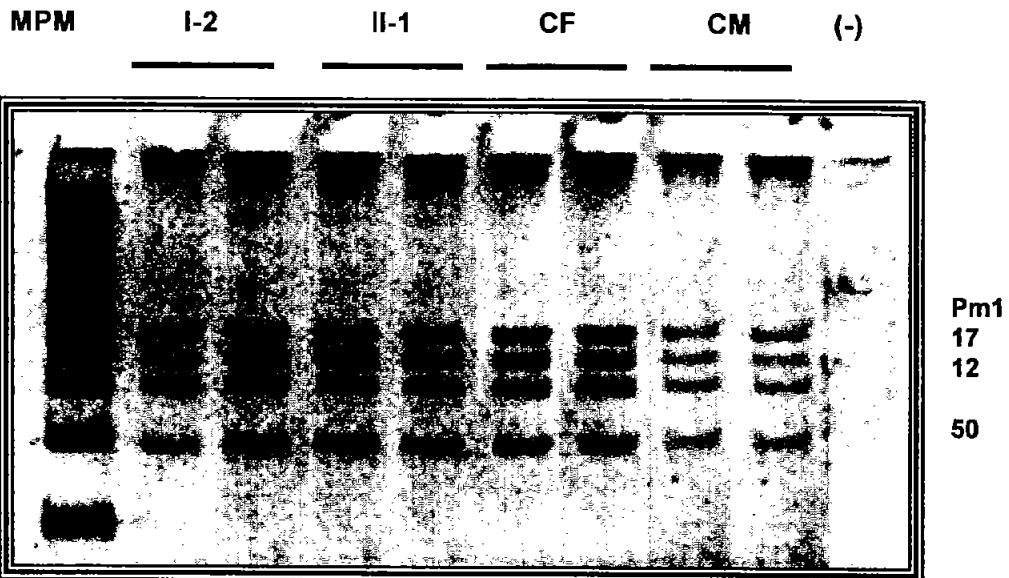


Figura 17: Utilidad de la PCR-M en la detección de portadoras en una familia con DMB por delección de los exones 45-47. A) Por genealogía la madre (I-2) del caso índice es PO. B) Nótese en el análisis densitométrico la reducción de la dosis génica al 50% del exón 45 (flechas) en la madre (I-2), respecto al control femenino normal (CF). La media hermana del caso índice (II-3), mostró una dosis normal para el exón 45, lo cual indica que heredó el alelo normal y por ende no es portadora del padecimiento. CM: control masculino sano.

A)



B)



C)

EVALUACIÓN DENSITOMÉTRICA

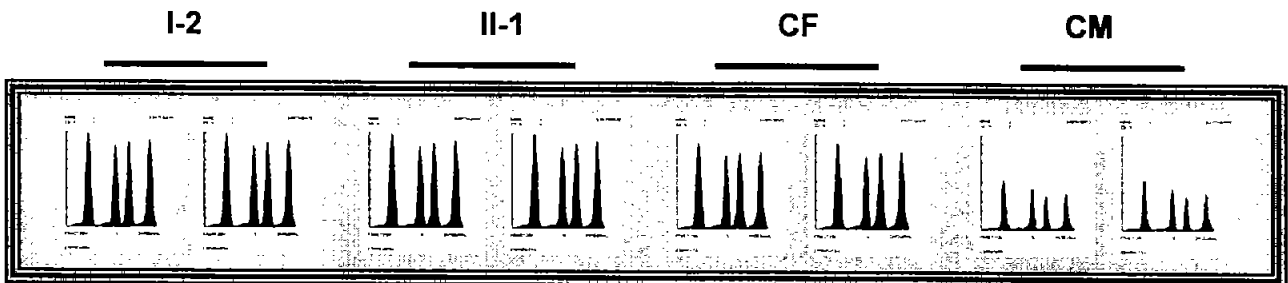


Figura 18: Análisis de dosis génica en una familia DMD por delección de la región 5' y central. A) Árbol genealógico que muestra un caso único. B) PCR-MC donde se estudiaron los exones Pm1 y 50 como controles, y los exones 12 y 17 como problema. C) Densitometría: Nótese la doble dosis génica normal para todos los exones analizados en la madre y en la hermana (I-2 y II-1). Los resultados obtenidos indican que la delección de los exones del 12 al 44 encontrada en el caso índice (II-2), fue originada como un evento *de novo*. CF y CM, controles femenino y masculino sanos.

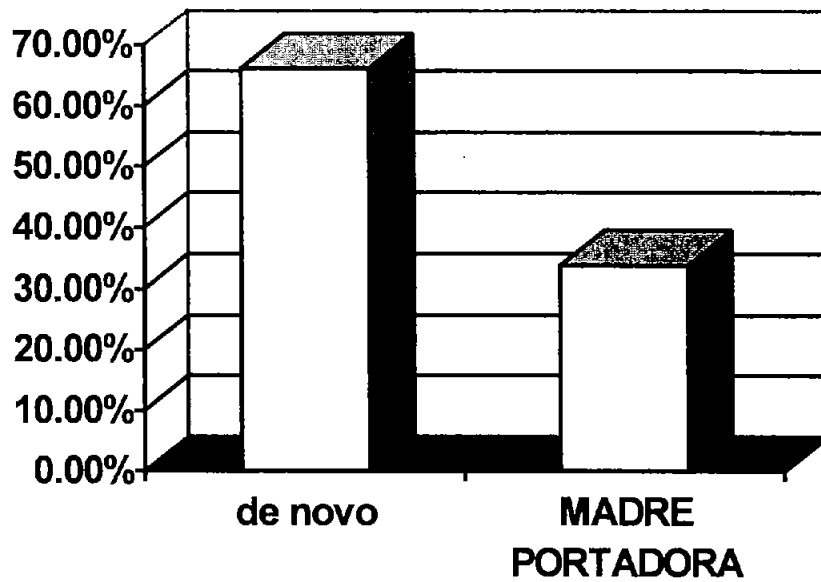


Figura 19: Origen de las deleciones en pacientes mexicanos con DMD. La mayoría de estas mutaciones (66.2%) se originaron como evento *de novo* en línea germinal materna.

IIb. Análisis de ligamiento (detección indirecta de portadoras)

En todas las familias se investigaron las frecuencias alélicas obtenidas para tres marcadores intragénicos bialélicos del gen DMD (pERT87.8/*TaqI*, pERT87.15/*XmnI* y MP1P), la informatividad de cada uno de ellos, la utilidad de estos para la asignación o exclusión del estado de portadora y la frecuencia de eventos de recombinación evidenciables. Las estandarizaciones de los marcadores de pERT87.8/*TaqI* (intrón 13), pERT87.15/*XmnI* (intrón 17) y MP1P (región 3' no traducible) se muestran en las **figuras 20 y 21**.

El polimorfismo tipo RFLP pERT87.15/*XmnI* fue el marcador más informativo con un total de 54.54% de madres heterocigotas (n=72), mientras que el marcador menos informativo de los tres fue el VNTR MP1P (38%, n=50 madres). El índice de heterocigocidad global fue del 81% (n=107 madres heterocigotas para al menos un marcador). A pesar del alto índice de informatividad observado, el AL sólo pudo asignar o descartar el estado de portadora en el 16.6% (22/132) de las madres (**Figs. 22 y 23**). Con el uso del AL y el PCR-MC se lograron documentar 8 eventos de recombinación (**Fig. 24**) en 294 meiosis analizadas (2.7%) con una distribución del 50% tanto para la región central, como para la región 5'. Sólo uno de los ocho eventos de recombinación no tuvo implicaciones negativas para el asesoramiento genético, pues se tenía caracterizada una deleción central resolviendo el estado de portadora mediante PCR-MC.

En 4 familias con deleción de la región 5' (que involucraran a los exones 12 al 19), los marcadores pERT lograron descartar directamente el estado de portadora en las madres por su carácter heterocigoto, hallazgo interpretado como integridad de ambos alelos maternos.

Asimismo, la integración de los haplotipos y el análisis de segregación en la descendencia permitió evidenciar la no paternidad en dos familias, condición confirmada por el análisis del marcador D1S80 (**Fig. 25**); en ambos casos se guardó la confidencialidad de los resultados. Estas familias presentaban antecedentes familiares

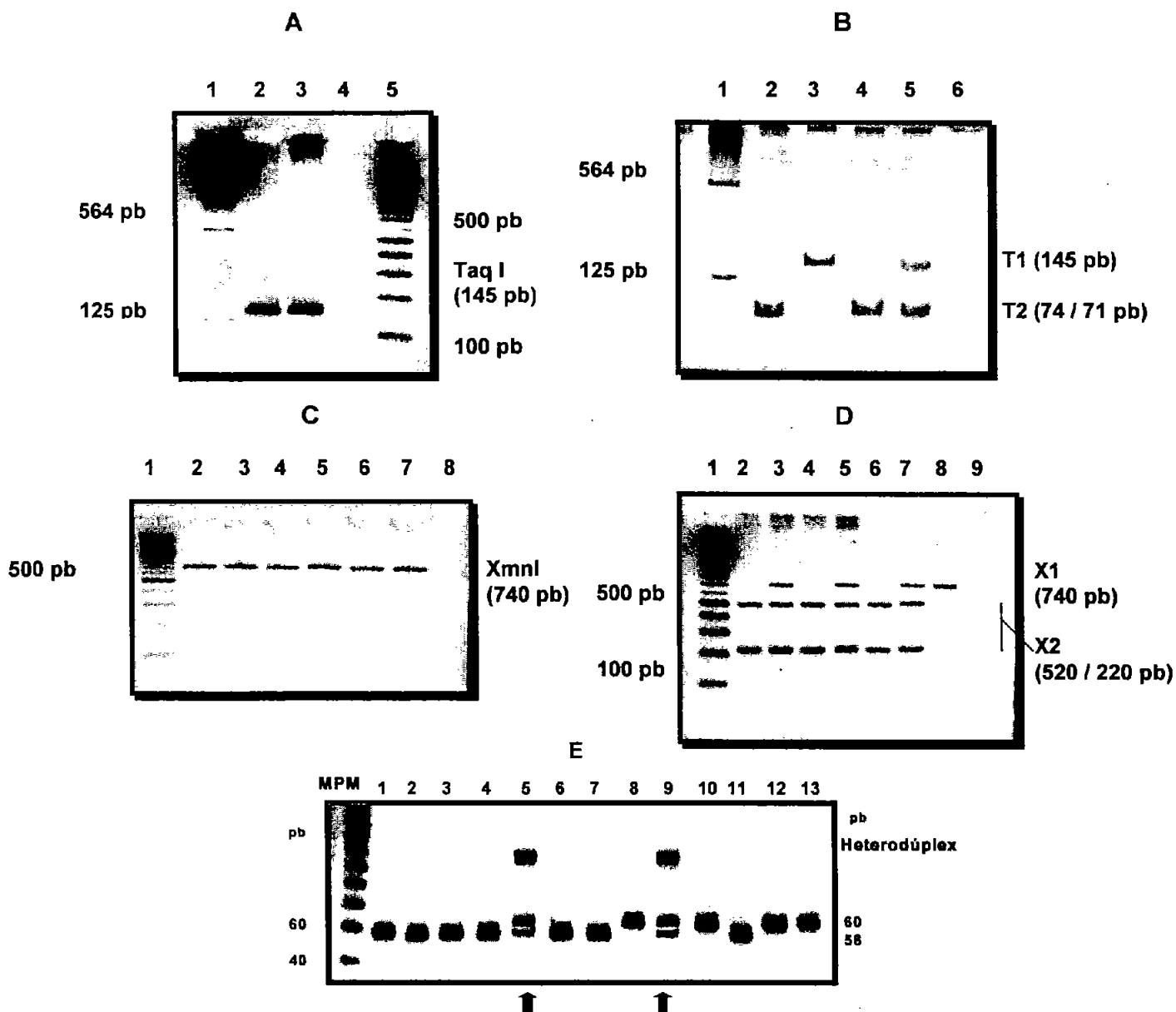
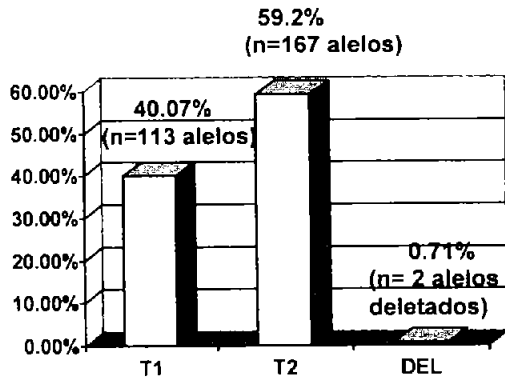
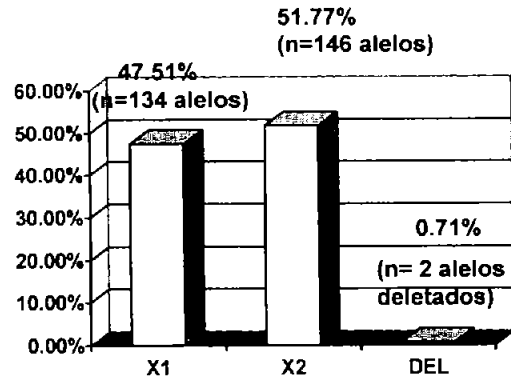


Figura 20. Análisis de los polimorfismos MP1P, pERT87.8/*TaqI* y pERT87.15/*XmnI*. A) Amplificado de pERT87.8/*TaqI* (145 pb). Carril 1 y 5: marcadores de pesos moleculares (MPM) (fago λ HindIII) y escalera de 100 pb); carril 2 y 3: sujetos normales masculino y femenino; carril 4: blanco. B) Patrones de restricción del amplificado pERT87.8/*TaqI*. Carril 1: MPM (fago λ HindIII); carril 2: alelo T2 (hombre); carril 3: alelo T1 (hombre); carril 4: alelos T2/T2 (mujer); carril 5: alelos T1/T2 (mujer) y carril 6: blanco. C) Producto de amplificado pERT87.15/*XmnI* (740 pb). Carril 1: MPM (escalera de 100 pb); carriles 2-7: sujetos normales masculinos y femeninos; carril 8: blanco. D) Patrones de restricción de pERT87.15/*XmnI*. Carril 1: MPM (escalera de 100 pb); carril 2: alelo X2 (hombre); carril 3: alelos X1/X2 (mujer); carril 4: alelo X2 (hombre); carril 5: alelos X1/X2 (mujer); carril 6: alelos X2/X2 (mujer); carril 7: alelos X1/X2 (mujer); carril 8: alelo X1 (hombre) y carril 9: blanco. E) Separación de los alelos MP1P. Carriles 1-4, 6, 7 y 11: alelos M (56 pb); carriles 8, 10, 12 y 13: alelos P (60 pb). Las flechas muestran a mujeres heterocigotas P/M, en las cuales incluso se aprecia la existencia de heterodúplex de cadenas P/M como artefacto de la técnica.

FRECUENCIAS ALÉLICAS pERT87.8/TaqI
(282 alelos: 132 madres y 18 padres)



FRECUENCIAS ALÉLICAS pERT87.8/XmnI
(282 alelos: 132 madres y 18 padres)



FRECUENCIAS ALÉLICAS MP1P
(282 alelos: 132 madres y 18 padres)

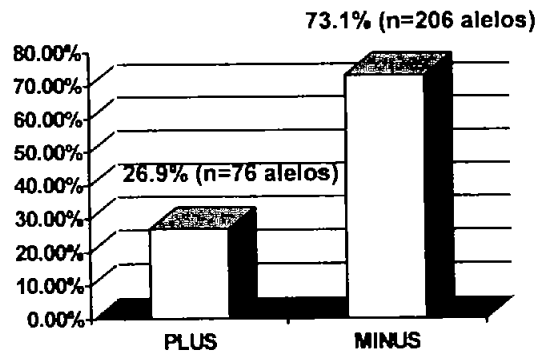


Figura 21: Frecuencias alélicas de tres marcadores en la población mexicana. DEL: alelos que carecen del polimorfismo por estar involucrados en una deleción de la región 5' que elimine a los intrones 13 y 17.

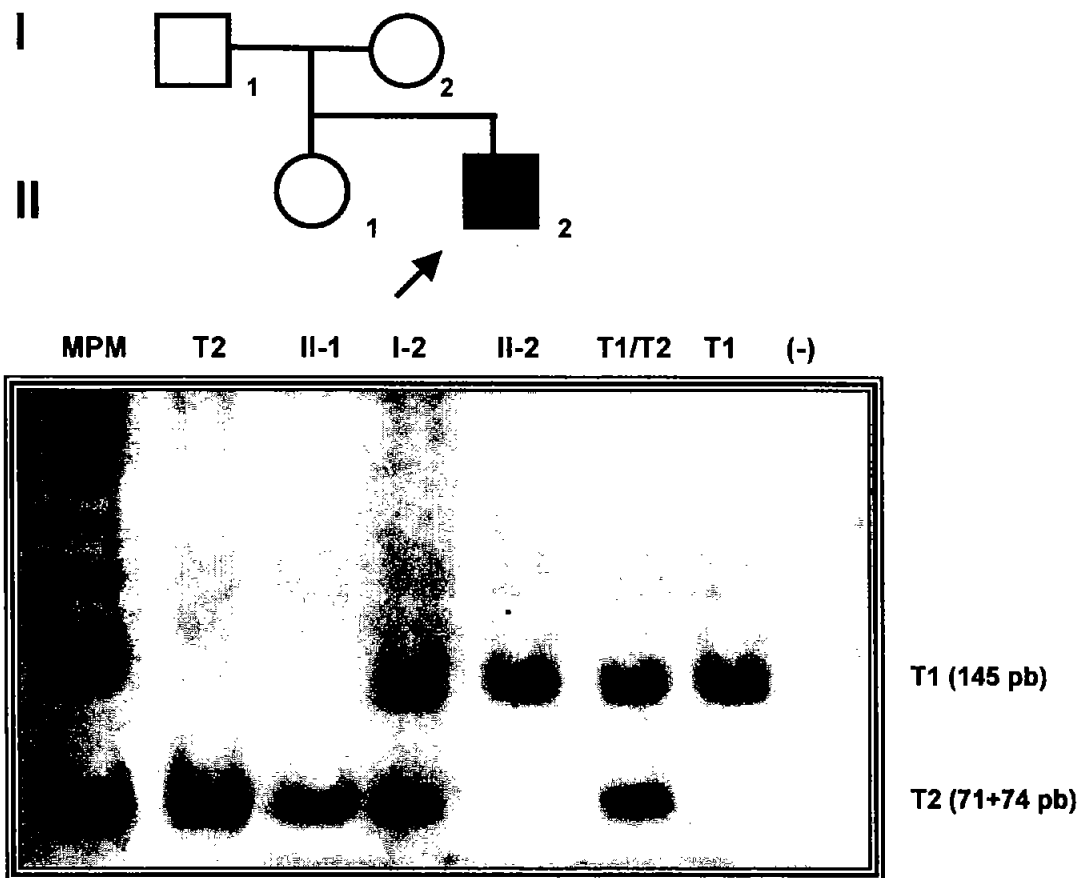


Figura 22: Exclusión de alelo en riesgo en una familia con DMD con caso único sin delección. La hermana del caso índice (II-1) es homocigota T1. Con ello se puede descartar el estado de portadora en >90%, pues existe una posibilidad de error en la exclusión debido a los eventos de recombinación. En especial en esta familia, la madre fue también informativa para *XmnI*, pero homocigota para MP1P, con lo cual no se puede descartar que la hermana haya heredado un haplotipo recombinante. Carril T1: varón control hemicigoto T1; carril T1/T2: mujer control heterocigota; carril T2: mujer control homocigota T2.

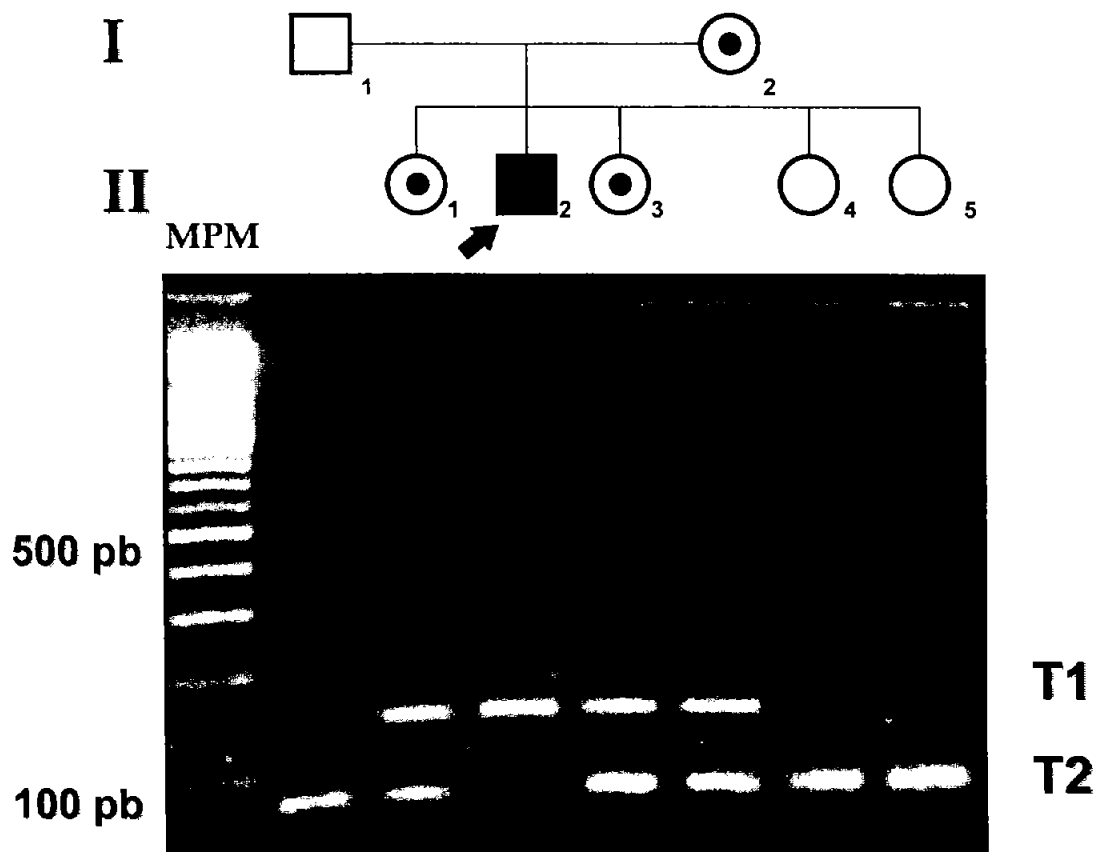


Figura 23: Asignación y exclusión del estado de portadora en un caso familiar de DMB sin mutación caracterizada. I-2, es PO del padecimiento, por poseer antecedentes familiares de DMB y un hijo afectado. La madre del caso índice fue informativa para el marcador *TaqI*, por lo que se procedió a identificar el alelo que cosegrega con la mutación desconocida. Asimismo debido a la informatividad de I-2 en el marcador MP1P, se logró visualizar eventos de recombinación. Aquellas hijas que son heterocigotas T1/T2 (II-1 y II-3) son portadoras del padecimiento prácticamente con una probabilidad del 100%, pues heredaron el alelo T1 (presente en el caso índice) de la madre y el T2 del padre (I-1) y no se evidenció recombinación con MP1P. Las hijas homocigotas T2 (II-4 y II-5) no son portadoras de DMD con una probabilidad del 100%, pues tampoco se evidenció recombinación con el marcador MP1P. El DP mediante AL es plausible en las hijas portadoras (II-1 y II-3), pues se tiene caracterizado a todo el haplotipo de riesgo.

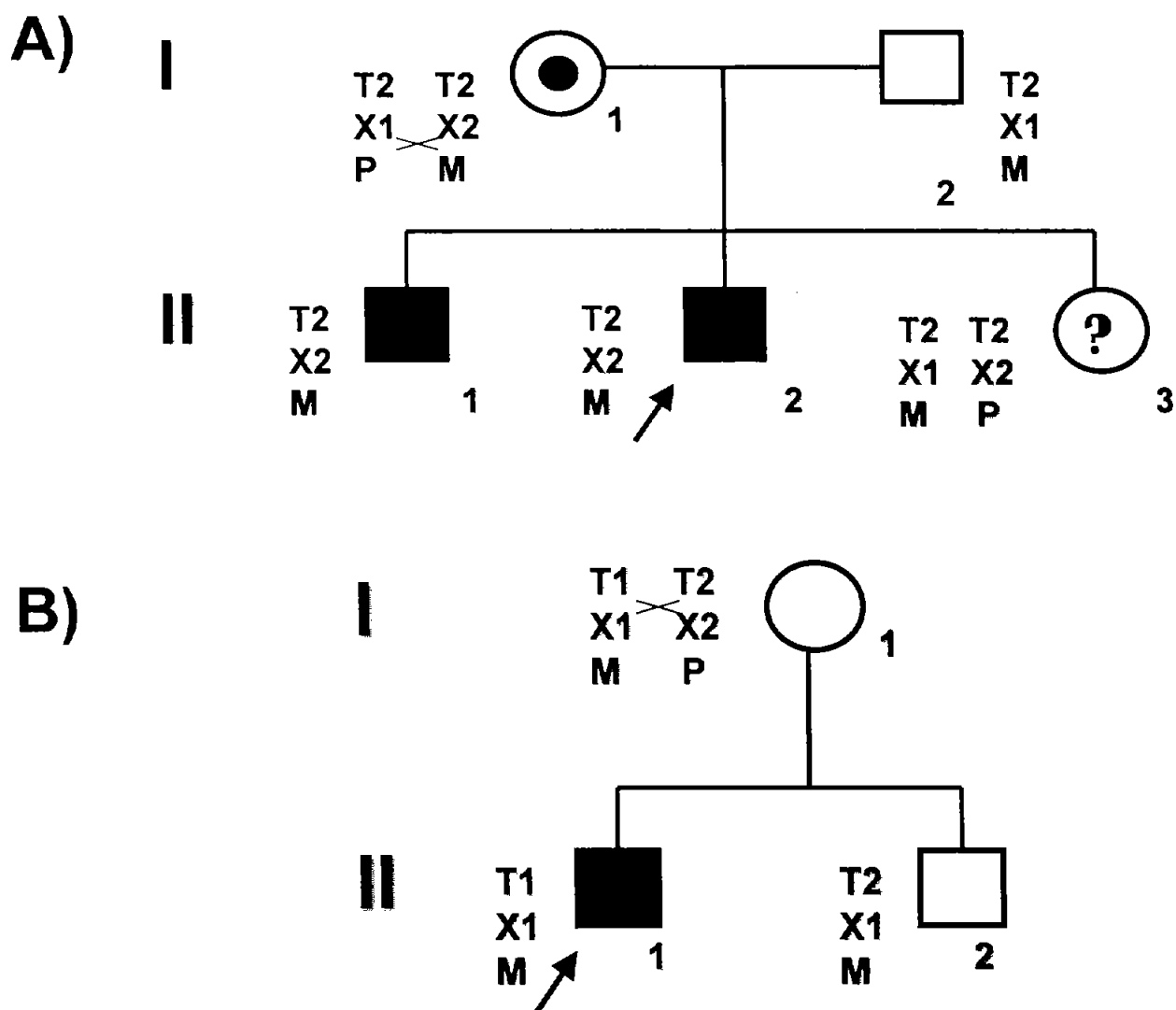


Figura 24: Esquema que muestra dos de los eventos de recombinación detectados en nuestro estudio. A) AL en un caso familiar de DMB sin delección. La madre del propósito (I-1) fue informativa para los tres marcadores analizados; ambas pacientes (II-1, II-2) presentaron el mismo haplotipo, sin embargo su hermana II-3 presentó un haplotipo recombinante (entre los marcadores pERT y MP1P). Los efectos desfavorables de este fenómeno se explicaron en el asesoramiento genético con relación a recurrencia, decidiendo someterse a técnicas de fertilización asistida para selección de sexo. B) Familia con caso único de DMD. El estudio de PCR-M tampoco demostró delecciones en el paciente II-1. Debido a la existencia de un hermano sano, se busco identificar al menos si la mutación era *de novo*, si es que el hermano sano portara el mismo alelo. La madre del caso índice fue informativa en los tres marcadores, pero también se observan diferentes haplotipos en ambos hermanos a causa de una recombinación central. Con ello no se puede aseverar o descartar a I-1 como portadora de DMD.

para DMD y DMB, el caso índice de la familia con DMD mostró integridad en los 22 exones analizados, por lo que el análisis de ligamiento fue fundamental para la asignación de portadoras; mientras que la familia con historia de DMB, presentaba una deleción de los exones 3 al 6, por lo que la evaluación de la dosis génica pudo establecer el diagnóstico de portadoras.

III. Asesoramiento genético y diagnóstico prenatal.

La evaluación de la dosis génica por la PCR-MC permitió la identificación certera de portadoras en el 53.8% (71/132) de las familias incluídas en este estudio. A pesar de que los tres marcadores utilizados fueron altamente informativos en las 132 madres, el AL sólo contribuyó en un 16.7% (n=22 familias) en la asignación de certeza sobre el estado de portadora. Las **figuras 26 y 27** muestran los resultados conjuntos del AL y PCR-MC para brindar asesoramiento genético.

A todas las parejas en etapa reproductiva donde se logró caracterizar la mutación o el alelo de riesgo en el caso índice se brindó la posibilidad de DP. Asimismo para evitar falsos negativos en la asignación de portadoras por mosaicismo germinal, el diagnóstico prenatal se planteó a las madres no portadoras de casos índice con deleción caracterizada y/o angustia materna y/o edad materna avanzada.

En siete madres y una hermana sometidas a DP, se obtuvo DNA genómico a partir de amniocitos y en todos ellos no hubo complicaciones post-procedimiento, ni presencia de aneuploidías por edad materna avanzada, este último rubro sólo se documentó prenatalmente por citogenética en tres de las madres. El aspecto de los LA fue normal, sin embargo uno presentó aspecto hemático. Ante la sospecha de contaminación con células maternas, se sometió al análisis del marcador D1S80, el cual sólo reveló presencia de dos alelos de intensidad similar, evidenciando la no contaminación con DNA materno. Tampoco en el resto de los 7 LA se apreciaron datos de contaminación con DNA genómico materno.

Las siete madres sometidas al DP contaban con estudio molecular previo y genealogía conocida; así, se estudiaron dos mujeres portadoras obligadas de una deleción,

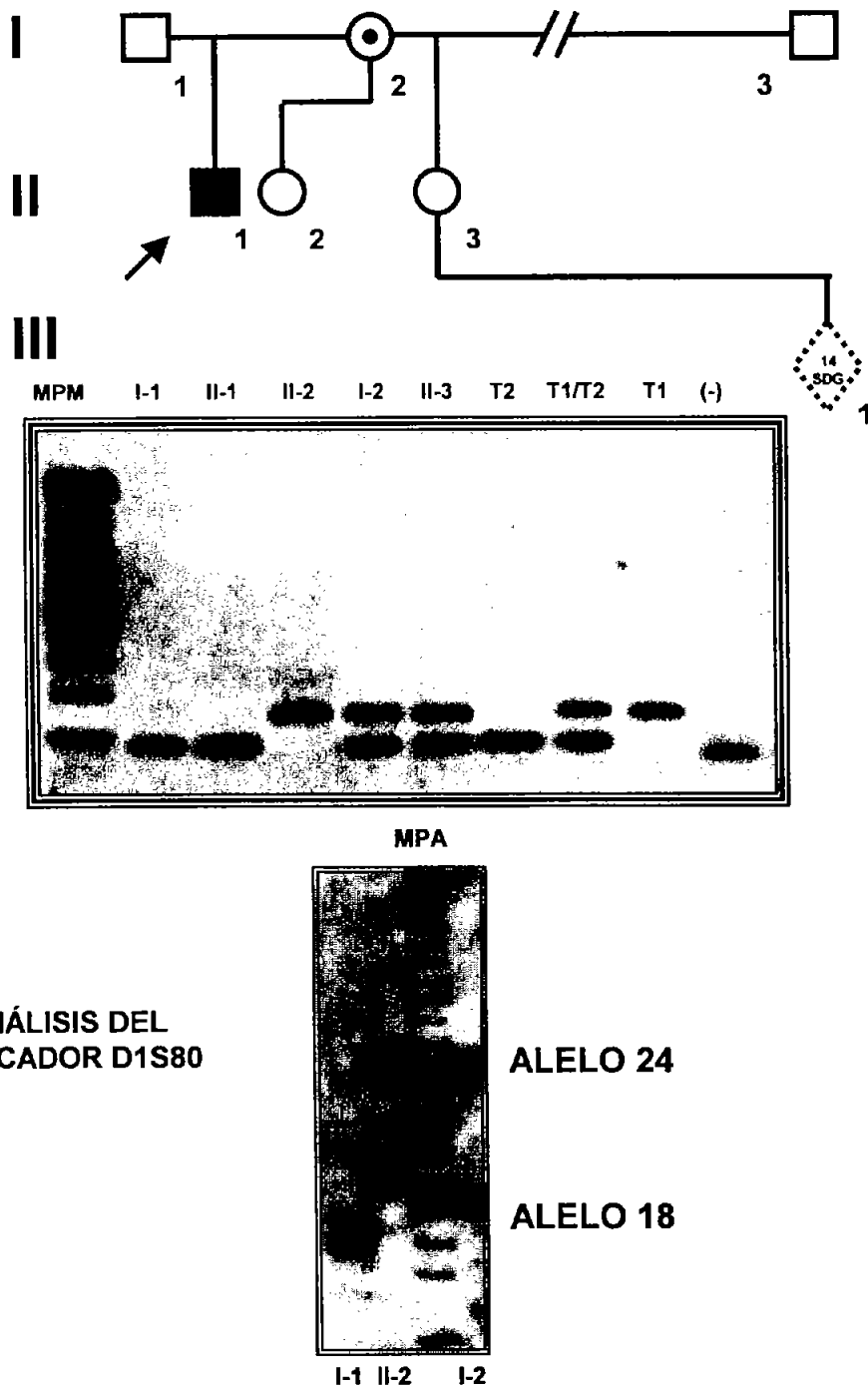


Figura 25: Documentación de no paternidad en un caso familiar de DMB. Nótese la ausencia del alelo paterno obligado T2 (I-1) en II-2 (homocigota T1/T1). Abajo se muestra la exclusión de paternidad mediante el análisis del marcador D1S80, el cual corroboró los hallazgos *TaqI*, pues el padre putativo (I-1) es homocigoto para el alelo 17 y II-2 es heterocigota para el alelo 19 y 24, este último heredado de I-2. La media hermana del caso índice (II-3) acudió con nosotros cursando un embarazo de 14 SDG (III-1) y fue una de las 8 pacientes sometidas a DP, pues conocíamos la deleción en II-1 (exones 3-6). Carriles T1, T1/T2 y T2 controles de genotipos *TaqI* conocidos; carril (-), control blanco de la reacción; carril MPM, marcador de pesos moleculares escalera de 100 pb; carril MPA, marcador de pesos alélicos D1S80. 76

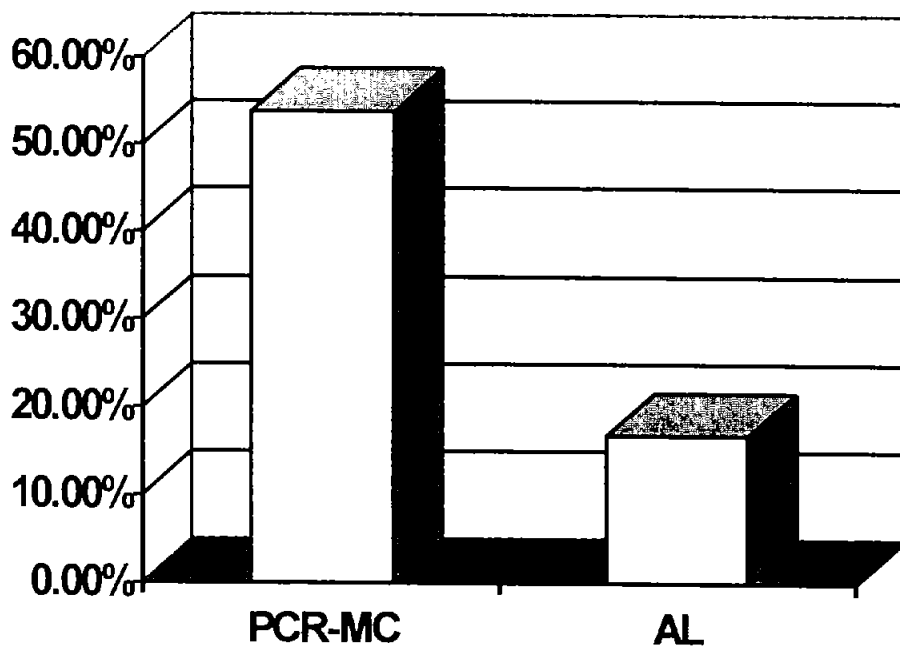
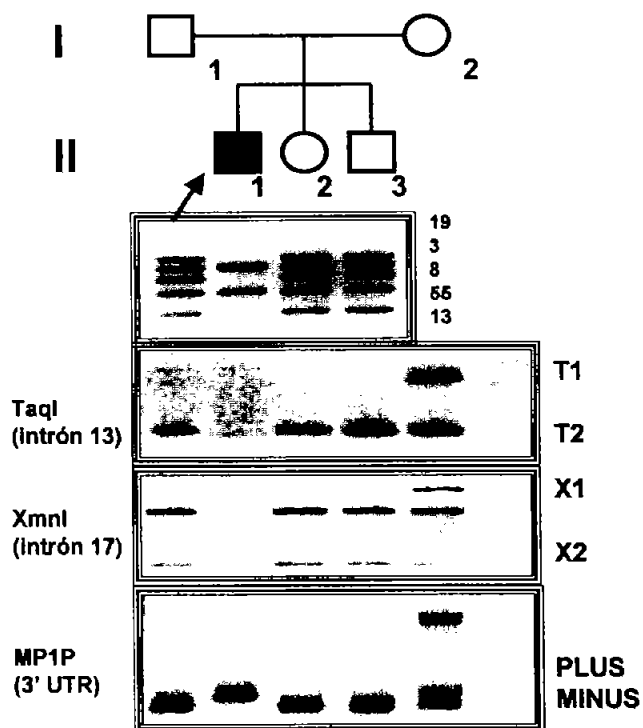


Figura 26: Eficiencia diagnóstica de la PCR-MC y el AL para el otorgamiento de un asesoramiento genético de certeza. La técnica que demostró ser más útil fue la evaluación de la dosis génica, pues en todas las madres de casos índice con delección, se llegó a excluir o asignar inequívocamente el estado de portadora de delección.

A)



B)

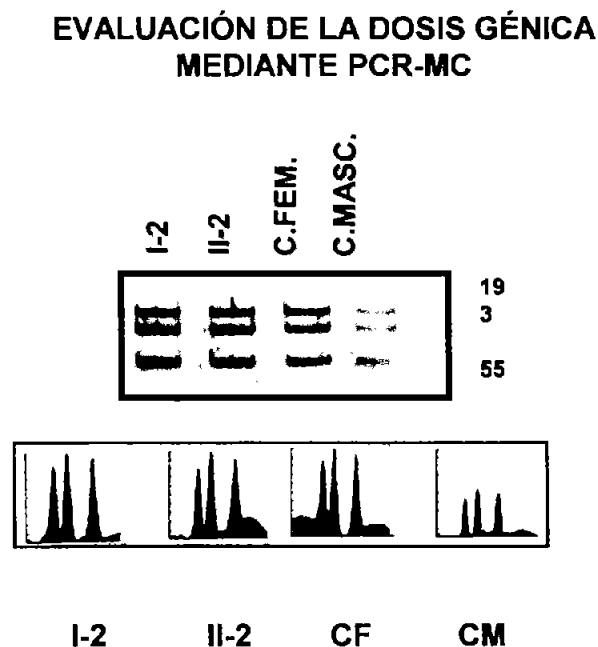


Figura 27: Se muestra el abordaje conjunto del AL y la PCR-MC en una familia, cuyo caso único presenta DMD atribuible a una delección de la región 5' (exones 8 al 19). La delección involucra a los dos sitios pERT, condicionando la no amplificación de los sitios en el caso índice (II-1). El AL muestra heterociguidad de los tres polimorfismos en la madre (I-2), lo cual indica la Integridad de ambos alelos al menos en sangre periférica, siendo esto una condición compatible con el estado de no portadora. Este hallazgo posteriormente es corroborado mediante la PCR-MC, donde se demuestra una dosis normal tanto en I-2, como en II-2 para los exones control (19 y 55) y problema (19). Lo anterior, indica que la mutación ocurrió como evento *de novo* y queda descartada al menos en II-2 la posibilidad de recurrencia atribuible a mosaicismo germinal. CF y CM, controles femenino y masculino sanos, respectivamente.

una mujer portadora probable que era madre de un caso único sin delección, pero en la que se logró caracterizar el alelo de riesgo y cuatro mujeres no portadoras de delección. En estas últimas mujeres, se consideró como indicación de DP el riesgo de mosaicismo germinal, edad materna avanzada (3 de ellas) y angustia materna. La octava muestra de LA provenía de una hermana de un caso índice de una delección del exón 3 al 6, catalogada como portadora probable por ser hija de una PO, la cual llegó con nosotros para iniciar estudio molecular ya con un embarazo de 14 SDG.

Los resultados de los ocho DP se enlistan en la **tabla 4**. La **figura 28** muestra tres de los DP realizados. Sólo un producto masculino de una de las dos portadoras obligadas de delección (caso 1), se diagnosticó como producto masculino afectado de DMD (**Fig. 29**). Este estudio fue publicado en *Annales de Génétique* 2001 (205) (**anexo 3**).

El análisis de las muestras siempre fue por duplicado, encontrado en todos los casos resultados reproducibles.

El producto de la madre portadora probable fue un varón quién heredó el alelo de riesgo. En la evaluación clínica postnatal del paciente no ha mostrado manifestaciones de distrofinopatía, por lo que, tomando en cuenta que no se puede descartar por completo los eventos de recombinación, existe una probabilidad del 90% que la madre no sea portadora de DMD.

Cabe mencionar que el estudio molecular permitió realizar el DP en un lapso menor a 36 hrs. El lapso de entrega es por mucho gracias a la caracterización previa de los alelos de riesgo o mutados en las familias con DMD/DMB.

Finalmente, la combinación de las diferentes metodologías empleadas (PCR-MC y análisis de ligamiento) permitió brindar un AG de certeza al 70.4% de las familias DMD/DMB/DMI hasta ahora captadas.

Tabla 4. Resultados del diagnóstico prenatal molecular de DMD/DMB.

NO.	ANTECEDENTES	MUTACIÓN PREVIAMENTE CARACTERIZADA	HALLAZGOS EN EL DP	DIAGNÓSTICO
1	Portadora obligada Caso familiar DMD	Δ 12-19	⁽¹⁾ DYZ1: (+) AL: Ausencia de XmnI/TaqI ⁽²⁾ PCR-M: Δ12-19	PRODUCTO MASCULINO AFECTADO (Fig. 29)
2	No portadora de deleción central	Δ 47-48	DYZ1: (+) PCR-M: Normal	PRODUCTO MASCULINO SANO
3	No portadora de deleción central	Δ 45-53	DYZ1: (+) PCR-M: Normal	PRODUCTO MASCULINO SANO
4	No portadora de deleción 5'	Δ 19	DYZ1: (+) PCR-M: Normal	PRODUCTO MASCULINO SANO (Fig. 28)
5	No portadora de deleción central	Δ 49-52	DYZ1: (+) PCR-M: Normal	PRODUCTO MASCULINO SANO (Fig. 28)
6	Portadora probable	No deleción	DYZ1: (+) AL: Identificación de haplotipo de riesgo	PRODUCTO MASCULINO CON ALELO DE RIESGO. SANO POR SEGUIMIENTO (3 años de edad)
7	Portadora obligada de deleción 5' Caso familiar DMB	Δ 3-6	DYZ1: (-) PCR-MC: Normal	PRODUCTO FEMENINO SANA Y NO PORTADORA
8	Portadora probable de deleción 5' Caso familiar DMB	Δ 3-6	DYZ1: (+) PCR-M: Normal	PRODUCTO MASCULINO SANO (Fig. 28)

⁽¹⁾ DYZ1: Se indica la presencia (+) o ausencia (-) de las secuencias Y-específicas.

⁽²⁾ PCR-M: Indica la integridad de los exones problema (normal: sin deleción).

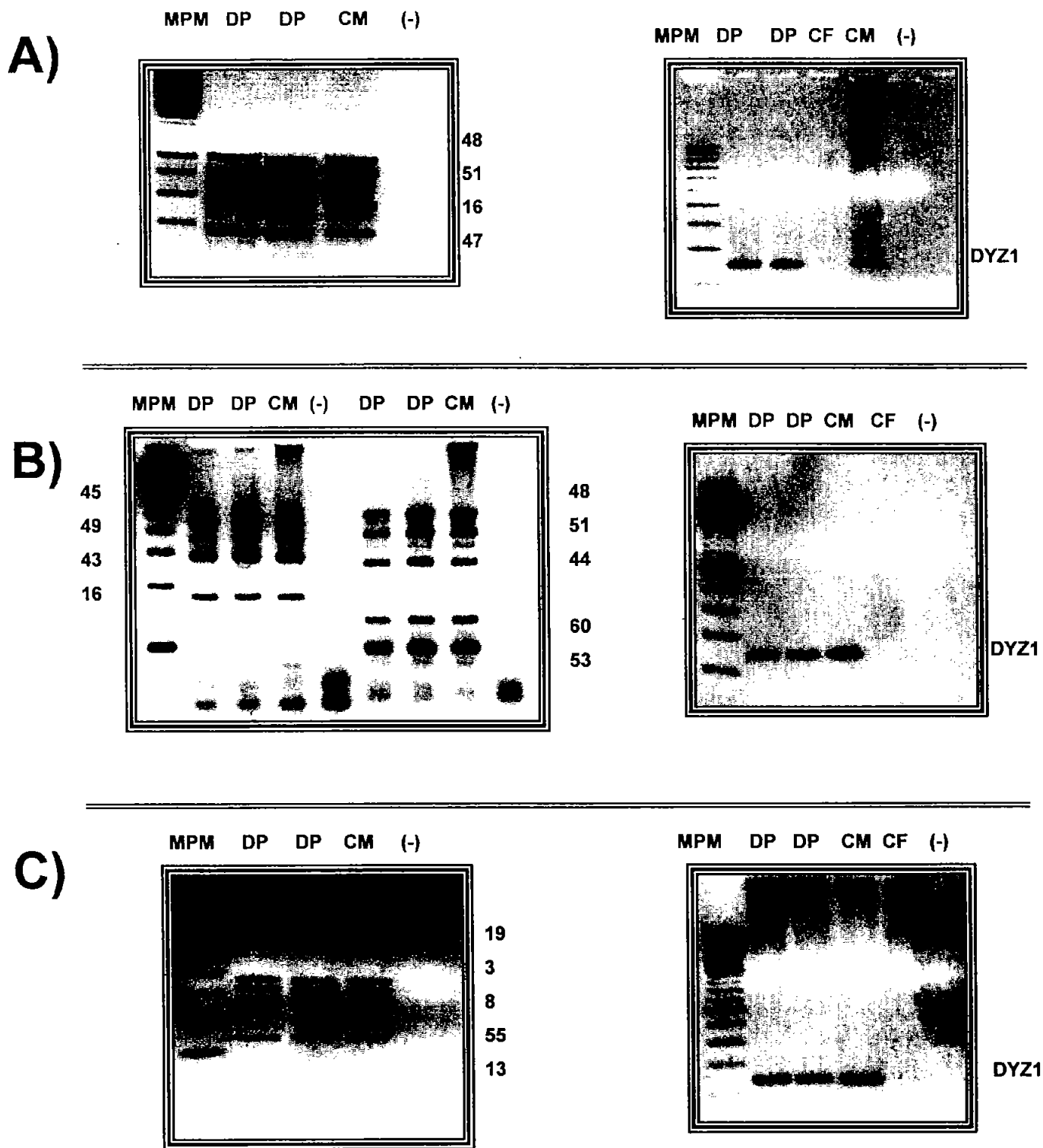


Figura 28: Diagnóstico prenatal en tres productos masculinos (ver tabla 4). A) Caso No. 2. B) Caso No. 3. C) Caso No. 4. Los PCR-M pueden tener modificaciones dependiendo de la delección presente en el paciente DMD/DMB. MPM: marcador de pesos moleculares, escalera de 100 pb. CM y CF, controles masculino y femenino, respectivamente.

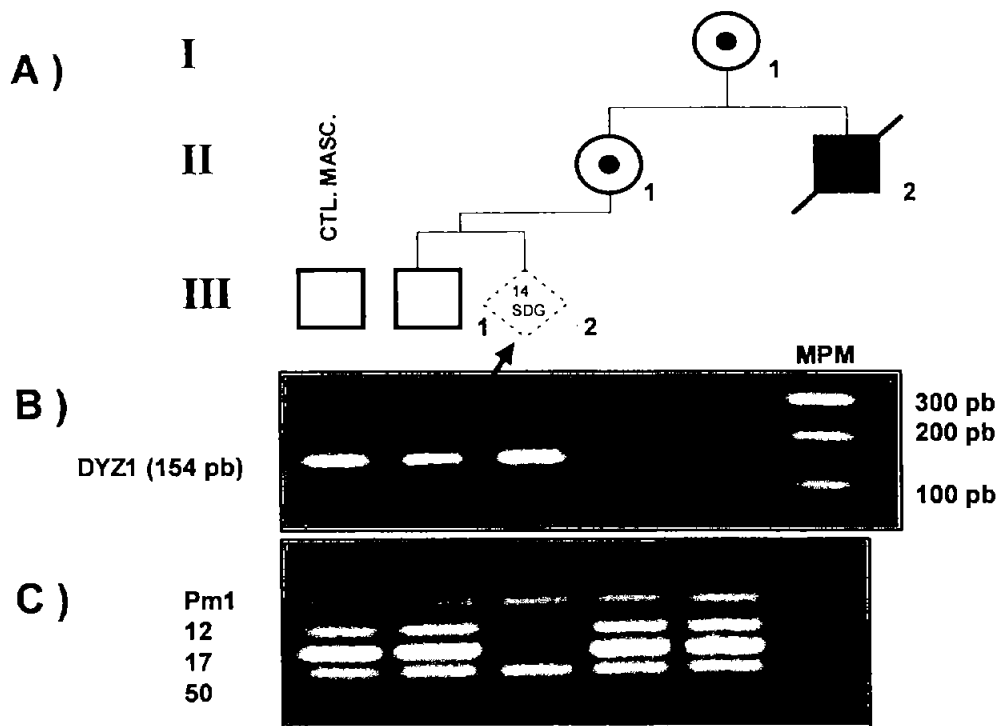


Figura 29: A) Diagnóstico prenatal de DMD en caso familiar sin disponibilidad de individuos afectados (caso No. 1). B) La determinación prenatal de sexo en el producto (III-2). La presencia de secuencias DYZ1 indicó un producto masculino. C) PCR-M de grupo B en el producto. La reacción analizó exones deletados (12 y 17) y no deletados (Pm1 y 50), previamente estudiados en I-1 y II-1. La ausencia de los productos de PCR de los exones 12, 17 confirmaron el diagnóstico de producto masculino afectado de DMD. El DNA genómico del producto tampoco mostró amplificación de los exones 13, 16 y 19, ni de los dos polimorfismos pERT (imágenes no mostradas). Esto último confirmó sin lugar a dudas la delección de la región 5' en el producto.

DISCUSIÓN

Las DMD/DMB son enfermedades degenerativas progresivas que, principalmente la tipo Duchenne, conducen a la muerte antes de los 20 años (8). La aportación más importante de la biología molecular en este tipo de distrofias ha sido la posibilidad de identificar las alteraciones moleculares en pacientes y mujeres portadoras (41,77,78). Este gran avance ha revolucionado los métodos de diagnóstico y ha abierto la posibilidad de proporcionar un asesoramiento genético de certeza (175), de diagnóstico prenatal (78,180) e incluso de diagnóstico preimplantación en blastómeros (10,206,208). A la fecha no existe un tratamiento definitivo para estas enfermedades (82), por lo que actualmente los principales esfuerzos están encaminados a la prevención del padecimiento (1,175). Los ensayos de terapia génica han tenido un éxito relativo en modelos animales DMD (208,209) utilizando vectores *in vivo* (209-211), sin embargo aún existe una enorme brecha para su aplicación en humanos (212-215).

En México no se tienen datos de la frecuencia de estas enfermedades, aunque los datos indican que no existen diferencias significativas entre grupos étnicos (139). En la actualidad diversos grupos dedicados al estudio molecular de las DMD/DMB, realizan la detección de deleciones en casos índice por diversas variantes de la PCR-M, y la detección de portadoras se realiza en el mejor de los casos con base al análisis de ligamiento (diagnóstico de portadoras de tipo indirecto) (201). Este último presenta limitaciones serias tales como la alta frecuencia de casos únicos y el fenómeno de recombinación. Cabe señalar que en nuestro país, la mayoría de los Centros de atención médica de 2do. y 3er. nivel, el diagnóstico de portadoras continúa basándose en la historia familiar y en las determinaciones de CPK (200). Es bien sabido que esta última presenta un alto grado de variabilidad entre portadoras y que no existen valores patognomónicos para identificar a las portadoras (1,71,176).

En el servicio de Genética Médica del Instituto Nacional de Pediatría, se presentan mensualmente alrededor de 3 familias con DMD/DMB. En este trabajo se estudiaron 132 familias de las cuales sólo 41 (31.06%) tuvieron antecedentes familiares positivos, lo que pone de manifiesto la necesidad de aplicar estrategias de biología molecular. El alto número de familias (n=91, 68.94%) con caso único observado en este estudio, es superior a lo reportado en otras series (47,140,182,186) (50-60%), lo que sugiere un número más elevado de mutaciones generadas como eventos *de novo*. A pesar de estas observaciones, en otras Instituciones el asesoramiento genético se basa en el árbol genealógico, el riesgo de recurrencia empírico y el análisis bayesiano, sin embargo en este trabajo esta problemática ha sido superada gracias al empleo de técnicas de DNA recombinante, logrando definir el estado de portadora en el 70.4% de las familias DMD/DMB (46).

Para cumplir el objetivo principal de este estudio que fue caracterizar las mutaciones responsables de las DMD/DMB, y de manera paralela establecer el diagnóstico de portadoras y el diagnóstico prenatal en familias DMD/DMB, se analizaron las muestras de DNA por la estrategia de PCR-M, previamente reportada en la literatura, incluyendo además un exón representativo de la región 3' (exón 60) (145,168,216) (**Fig. 12**). La mayoría de las PCR-M no analizan este segmento del gen, pues menos del 3% de las deleciones involucran esa región (42,140,165). Con ello, podríamos asumir que la eficiencia de detección de deleciones es comparable al estudio de Southern blot (>98%), sin embargo este último es una técnica más costosa, laboriosa, y que requiere mayor cantidad y calidad de DNA genómico y mayor cantidad de tiempo (168), parámetro especialmente limitante para su aplicación en el diagnóstico prenatal. Con la amplificación de 22 exones mediante PCR-M se logró la caracterización de grandes rearrreglos tipo deleción que son responsables del cuadro clínico de DMD/DMB en el 53.8% de las

familias estudiadas. La localización de las deleciones correspondió en su mayoría al punto caliente central (76.3%) (**Fig. 13**), similar a lo reportado en otras poblaciones (139,140), lo cual sugiere que los eventos mutacionales para el gen DMD no dependen del origen étnico de las poblaciones, como sucede en otras entidades monogénicas (fibrosis quística, hemocromatosis y otras enfermedades con efecto fundador).

A diferencia de otras patologías genéticas, en la DMD/DMB no existe evidencia de la participación del medio ambiente y de genes modificadores, característica que colocaría a las DMD/DMB como un buen modelo para llevar al cabo una correlación precisa del genotipo con el fenotipo; sin embargo la correlación entre el genotipo-fenotipo (7,52,124) aún no esta clara. Aunque en el presente estudio se realizó esta correlación utilizando como criterio la hipótesis de Mónaco, sólo dos de las 8 deleciones encontradas (del exón 6 y del 3 al 6) en pacientes con fenotipo Becker mantuvieron el marco de lectura, y dos de las 60 deleciones encontradas en pacientes DMD conservaron el marco de lectura (exones 48-49 y del exón 51). Estas excepciones a la Hipótesis de Mónaco, han sido previamente reportadas en la literatura y posiblemente esto se deba a la ausencia de la delimitación precisa de los bordes intrón-exón en el gen DMD (127). Aunque con el desciframiento de la secuencia completa del cDNA y de los bordes intrón-exón de los 79 exones del gen DMD (77,99), se ha logrado una valoración más exacta del emplame en marco de lectura de los exones delimitantes de una deleción, aún así existen pacientes que son excepciones a la Hipótesis de Mónaco (9,127,125). A mediados de los 90's, se enfoco el interés a definir el efecto de la mutación (deleción o duplicación) en el procesamiento post-transcripcional del mRNA. Con el descubrimiento de secuencias intrónicas y exónicas regulatorias de *splicing*, los sitios altamente conservados del "branch-point" y el tracto de polipirimidinas indispensable para la primera transesterificación del *splicing* dirigida por U2, entre otros, es de suponerse que el análisis del marco de lectura para predecir el fenotipo de una distrofinopatía, tendría que hacerse

en el transcrito mutante. Roberts y cols. (126) fueron los primeros en analizar transcritos mediante RT-PCR y secuenciación directa del cDNA del gen DMD proveniente de diversos pacientes con deleciones. Se evidenció que el patrón de *splicing* en algunos pacientes era distinto al predicho simplemente por comparar los sitios de empalme en los exones conservados del gen. Así una deleción que estuviera fuera de marco de lectura asociada a fenotipos Becker, podría restaurar su marco de lectura si el proceso de *splicing* saltaba exones íntegros a nivel de gen o a la inversa, un fenotipo Duchenne condicionado por el mismo mecanismo pese a existir una deleción en marco a nivel de DNA (125-127). Esta visión, se complica aún más por la sofisticada regulación de la expresión génica del gen DMD (múltiples promotores tejido-específicos, intenso *splicing* alternativo) (**Fig. 4**). Inclusive, hoy en día se asume que las fibras musculares revertantes (con positividad a distrofina y con muy poco patrón distrófico) encontradas frecuentemente en pequeñas agrupaciones, pueden ir más allá del procesamiento post-transcripcional, argumentando la presencia de un segundo evento mutacional somático que restaura la capacidad de la fibra muscular para sintetizar distrofina (9,217,218).

Aún más, la deleción del exón 6 encontrada en un caso con fenotipo Becker, estuvo presente en una familia donde sorprendentemente coexistieron fenotipos Duchenne y Becker (**Fig. 15**). Estos hallazgos hacen pensar en la posibilidad de que factores epigenéticos o ambientales sí pudieran tener influencia en los fenotipos DMD/DMB. En apoyo a esta aseveración, recientemente a través de estudios en ratones *mdx*, se ha sugerido que un gen modificador de las DMD/DMB, podría ser el locus de utrofina (219), proteína altamente homóloga a distrofina y con la cual comparte el mismo extremo carboxilo terminal. Se postula que la función de la utrofina probablemente sea el retardo de la degeneración muscular, pues ratones *mdx* "knock-out" para utrofina, presentan un cuadro rápidamente progresivo y letal por cardiomiopatía (220,221). Estudios ulteriores en humano, quizá de SNPs en utrofina, podrían confirmar si es un gen modificador de las

distrofinopatías. Cabe señalar que la correlación en nuestros pacientes, necesitaría de la aplicación de metodologías que indaguen la integridad del marco de lectura a nivel de transcrito, caracterizar la variante mutacional más abundante en la fibra muscular mediante RT-PCR (127) y finalmente la valoración de distrofina muscular por inmunoblot y/o inmunohistoquímica (19,47,48). La misma técnica de RT-PCR en forma adicional permitiría la detección de duplicaciones (125,126), un tipo de mutación no analizada en el presente estudio, pero que es responsable de la enfermedad en un 6-8% de los casos (58,140,151).

Por otro lado, en 61 de los pacientes no se logró caracterizar la mutación, aunque es posible que existan deleciones en <1% de estos pacientes (**Fig. 13**), ya que las deleciones que ocurren en los exones 20 al 42 sólo se han descrito de manera anecdótica. Así, lo más probable es que los pacientes sin deleción presenten duplicaciones parciales o mutaciones puntuales (42,141,156). La detección de las mutaciones puntuales o microinserciones / microdeleciones podría realizarse mediante el análisis de conformación de cadena sencilla de DNA, análisis de heterodúplex o ensayo de proteína truncada. Dado el tamaño del gen las dos primeras técnicas de tamizaje deberán llevarse al cabo en cDNA (156,170), aunque las mutaciones que alteran el *splicing* o la regulación de la expresión génica son difíciles de estudiar por esta vía (173). La estandarización en nuestro laboratorio del PCR-MC podría ser una alternativa para la detección de duplicaciones en un futuro (187).

De acuerdo con la literatura, hasta el 8% de las mujeres portadoras pueden manifestar un grado variable de compromiso muscular, que va desde la elevación asintomática de CPK, hasta cuadros completos de DMD (1,59,66,198). En nuestro estudio, sólo 2 hermanas del total de las mujeres captadas presentaron compromiso muscular. Aunque en ninguna de las dos se realizó cariotipo, podemos aseverar que el

cuadro clínico, en al menos una de ellas, se debía al estado heterocigoto de una delección de la región central que involucra a los exones 53-54. Las manifestaciones clínicas de esta mujer heterocigota, podría ser debido a inactivación del cromosoma X normal, ya que la PCR-MC documentó el 50% de dosis génica en los exones afectados y del doble en los exones normales descartando una monosomía del cromosoma X y de manera adicional, el cuadro clínico de la paciente fue DMB mientras que en su hermano y su tío se manifestó con DMD excluyendo translocación del cromosoma X. La segunda paciente sintomática, presentaba fenotipo Becker y falleció a causa de CMD a la edad de 30 años. En ella sin embargo no fue posible la realización de estudio citogenético, post-mortem o análisis de laboratorio y gabinete, por lo que la monosomía del cromosoma X y otras aberraciones estructurales no pudieron ser descartadas en esta familia. Esta familia también ejemplifica la variabilidad intrafamiliar pocas veces encontrada en familias DMD/DMB (222), pues su hermano a pesar que conservó la capacidad para deambular independientemente hasta los 15 años, presentó una CMD de temprana aparición (13 años) y con progresión rápida. El estudio post-mortem confirmó los hallazgos clínicos de DMB y CMD. La presencia de delecciones en esta familia DMB con CMD, no pudo ser documentada por M-PCR, lo cual podría corresponder a algunas familias reportadas con mutaciones puntuales localizadas en el promotor muscular que eliminan la expresión del mRNA de distrofina específico de músculo condicionando CMD con compromiso variable de músculo esquelético (37,223-228). Se sabe que la deficiencia de la isoforma muscular de 427 kDa, puede ser compensada a nivel de músculo esquelético por la expresión del gen DMD a través de los transcritos de las isoformas neuronal y de las células de Purkinje (224), en cambio los cardiomiocitos y el sistema de conducción, no pueden llevar al cabo este cambio compensatorio, originando así la CMD (223,225). Por otra parte, la delección u otras mutaciones del Pm (225-228) no siempre se asocian a CMD, incluso en nuestra serie captamos a dos pacientes con fenotipos DMD clásicos sin CMD. Como ya se mencionó, la utrofina como posible gen modificador podría también participar en la evolución de la CMD

del humano (confirmada en ratones transgénicos *mdx*) (221) y con ello dar más argumentos para la explicación de estas incongruencias genotípicas de las CMD.

Por otro lado, la identificación de secuencias polimórficas en el gen DMD, ha facilitado la detección de portadoras a través del análisis de segregación, estudio especialmente útil cuando no se logra caracterizar la mutación responsable (181,182,185). Con el propósito de conocer la frecuencia de recombinación, la utilidad de los RFLPs/VNTR en la detección de portadoras y el asesoramiento genético, así como las frecuencias alélicas de los polimorfismos, en el presente trabajo se analizaron tres regiones del gen DMD correspondientes a la región 5' pERT87: pERT87.8/*TaqI* y pERT87.15/*XmnI* (intrón 12 y 17 respectivamente) y la región 3' no traducible: MP1P (**Fig. 20**).

Uno de los puntos clave en nuestro estudio fue el de evaluar la eficiencia de los RFLPs y el VNTR como estrategia molecular de tipo indirecto en el asesoramiento genético. Para la aplicación de éstos se consideró lo siguiente: 1) que la madre fuera informativa para uno o ambos polimorfismos, 2) la posibilidad de excluir el alelo en riesgo en hijas y otras mujeres emparentadas en familias con caso esporádico, 3) la posibilidad de asignación o exclusión del alelo mutado en las hermanas y otras mujeres emparentadas en familias con madre PO informativa, 4) Un 5-10% de error en la asignación o exclusión de portadoras, especialmente si la madre presentaba un genotipo homocigoto MP1P (falsos positivos o falsos negativos) debido a la alta frecuencia de recombinación intragénica. Esta desventaja se explicó en forma detallada a las 22 familias (16.6%) que tuvieron a los RFLPs/VNTRs como único recurso. Esta muestra no presentó familias con consanguinidad, aunque 6 familias provenían de poblaciones con menos de 100,000 habitantes, por lo cual no se puede descartar. La población de estudio se considera representativa de nuestra población y como se observa en la **Tabla 5** existen

diferencias significativas en cuanto a distribución entre los diferentes grupos étnicos (229-234).

La comparación de nuestros hallazgos con otras poblaciones étnicas, mostró similitud para el polimorfismo *TaqI*, entre nuestros resultados y los obtenidos en la población hindú (232). Las otras poblaciones asiáticas (229,231) no guardan semejanzas con la población estudiada para este polimorfismo, ya que sus distribuciones están invertidas en frecuencia (T1 más frecuente). La población caucásica y africana (230,232,233), guarda una proporción mayor de T2. La población japonesa (231) muestra una distribución similar en *XmnI*, con respecto a nosotros. En el resto las distribuciones para X no fueron similares. El análisis de frecuencias de ambos RFLPs-VNTR es el primero documentado para una muestra de población mexicana. El análisis de haplotipos utilizando estos 3 marcadores, fue útil especialmente en el análisis de segregación de alelos para evidenciar recombinación (**Fig. 24**), evento que no se logra observar con el análisis de los polimorfismos en forma aislada. Desafortunadamente el marcador MP1P distante a los dos RFLPs, fue el marcador de menor informatividad (37.8%, n= 50 madre heterocigotas), lo cual condiciona que no podamos identificar un evento de recombinación por la homocigocidad de dicho marcador. Así, la frecuencia de recombinación encontrada (2.7%, 8 eventos en 294 meiosis) puede estar subestimada y por ello nuestra cifra difiere con la mundialmente aceptada (5-12%). De hecho, en un estudio previo con 75 familias (46), nuestro grupo documentó apenas un 0.3% de eventos de recombinación mediante el empleo de los dos RFLPs *TaqI* y *XmnI*, situación esperada para dos marcadores separados por una distancia <1 cM; así podemos inferir que el empleo de MP1P mejoró discretamente la identificación de recombinaciones.

Siete de los ocho fenómenos de recombinación tuvieron implicaciones negativas en el asesoramiento genético, pues no presentaban delección y se dependía del AL para

Tabla 5. Frecuencias alélicas de los polimorfismos pERT87.8/TaqI y pERT87.15/XmnI en diferentes poblaciones.

POBLACION (ref.)	T1 (%)	T2 (%)	X1 (%)	X2 (%)
CHINOS (229)	98/145 (0.68)	47/145 (0.32)	123/206 (0.60)	83/206 (0.40)
GALES (230)	(no esp)0.26	(no esp.)0.74	(no esp.)0.32	(no esp.)0.68
JAPONESES (231)	80/114(0.70)	34/114(0.30)	93/170(0.55)	77/170(0.45)
INGLESES (232)	42/150(0.28)	108/150(0.72)	ND	ND
CAUCASICOS (233)	27/105(0.26)	78/105(0.74)	>75 (0.32)	>75 (0.68)
HINDUES (232)	24/57(0.421)	33/57(0.579)	ND	ND
NIGERIANOS (232)	6/28(0.214)	22/28(0.786)	ND	ND
TURCOS (234)	28/117(0.24)	89/117(0.76)	32/122(0.26)	80/122(0.74)
MEXICANOS (*)	113/282(0.4007)	167/282(0.592)	134/282(0.475)	146/282(0.517)

(*) El presente estudio.

definir a las portadoras. La familia donde ocurrió el 8º evento de recombinación, pertenecía a un caso familiar y además presentaba una delección en la región central, por lo que la disponibilidad de la PCR-MC descartó con certeza el estado de portadora en la hija independientemente del resultado del AL.

La estimación real de la frecuencia de recombinación podría llevarse al cabo mediante el estudio de marcadores microsatélite de la región central y 3', los cuales tienen un índice de heterocigocidad >90%, la desventaja del análisis de microsatélites, es la gran proporción de bandas inespecíficas producto del "patinaje" de la *Taq* polimerasa, lo cual puede conducir a errores de asignación de genotipos; sin embargo una vez estandarizada la metodología, contando con individuos control con genotipos conocidos y con el empleo de secuenciadores automáticos, la asignación de genotipos es precisa (181,184,185).

Consideramos que la determinación de la frecuencia de recombinación podría mejorar con el empleo de microsatélites; por otra parte, posiblemente el asesoramiento genético de las familias podría no verse beneficiado en gran parte. Ello estaría condicionado por el elevado número de casos únicos sin delección (n=39 familias, 29.5% del total de familias) y la estructura familiar; si no contamos con un mayor número de hermanos varones sanos y afectados, padres y hermanas, el tener un alto índice de informatividad no ayudaría significativamente a elevar la eficiencia en su asesoramiento genético. Existen 22 familias con antecedentes familiares DMD/DMB sin delección, las cuales sí podrían beneficiarse mediante el empleo de microsatélites, pues podría definir con exactitud el haplotipo que cosegrega con la mutación, sin el riesgo de falsos positivos o negativos en la asignación/exclusión de portadoras y el diagnóstico prenatal.

Un estudio detallado de la distribución de alelos DMD (deletados / no deletados) con los haplotipos resultantes y su segregación desde los abuelos maternos pudiese

brindar algún argumento para la explicación de la génesis de mutaciones, aunque en este tipo de padecimientos genéticos debidos a un alto número de mutaciones ocurridas a nivel germinal, se espera no encontrar diferencias significativas en la frecuencia de haplotipos entre la población general y la población afectada, puesto que todos los alelos tienen la misma probabilidad de mutación y con ello se disminuye la probabilidad de ligamiento entre marcador y mutación (182). Sin embargo, Pegoraro y cols. (198) opinan que en sí la utilidad del AL detallado en tres o más generaciones, podría brindar más argumentos para estimar el riesgo de recurrencia empírico ante un haplotipo que proviene del abuelo materno, lo cual conferiría a la madre de un caso único sin delección, un riesgo elevado de ser portadora de una mutación puntual originada en espermatogénesis (148).

La naturaleza de las mutaciones en el gen DMD de sujetos afectados, permitió implementar métodos directos de diagnóstico de portadoras, ya que del 50-70% de las delecciones se localizan en dos regiones perfectamente definidas en el gen DMD (144). En nuestro estudio las siguientes razones avalaron el uso de la evaluación de dosis génica por PCR-MC: 1) el comportamiento de estas mutaciones fue el mismo que a nivel mundial, 2) 52 de las familias con delección, acudían con caso único y la madre se encuentra en etapa reproductiva, 3) existencia de hermanas en casos familiares asociados a delección y con resultados por RFLPs, pero en donde idealmente se debía corroborar en forma directa la ausencia o presencia del alelo deletado y así superar el error por recombinación, 4) la baja eficiencia global de los RFLPs.

La evaluación de dosis génica mediante PCR-MC es una metodología ampliamente utilizada para indagar en forma directa el estado portador de mujeres emparentadas a casos índice con delección o duplicación en el gen DMD (174, 187-191). En la actualidad se han logrado utilizar metodologías fluorescentes sumamente sensibles pero también muy costosas (188,189). La estandarización en nuestro laboratorio de una versión diseñada

para evaluar rápida y eficazmente dosis génica utilizando bromuro de etidio y análisis densitométrico en negativo fotográfico (187) (**Figs. 16-18**), nos permitió incrementar notablemente el número de familias a las que se les pudo brindar consejo genético de certeza (**Fig. 19**). La técnica por sí sola permitió el esclarecimiento del estado portador/no portador de las madres en el 100% de las familias (n=71) con deleción caracterizada. Interesantemente el estudio molecular documentó un alto número de mutaciones *de novo* en éstas familias que acudieron como casos únicos (90.4%, 47/52); en el resto (n=5), el caso índice y único había heredado el alelo mutado de una madre portadora. Estos casos familiares asociados a deleción mostraron que sólo el 33.8% (n=24) de las deleciones fueron heredadas de una madre portadora y las otras dos terceras partes (66.2%, n=47) fueron mutaciones *de novo* (**Fig. 19**), probablemente ocurrida de acuerdo a la literatura, durante la maduración de línea germinal materna (148). Estos hallazgos se contraponen a la aseveración de que una tercera parte de las mutaciones son *de novo* (1,3,43), probablemente esta discrepancia se deba a que anteriormente no se contaba con el diagnóstico molecular (33,44-46) y por lo tanto no se refiere a una mutación en particular o a diferencias étnicas. Estos resultados han sido apoyados por un estudio reciente en población hindú el cual mostró el mismo comportamiento que nuestra población (45). Por otro lado, un estudio en población brasileña (54) mostró la probabilidad de recurrencia en familias con casos únicos con deleción en la región central es del 4%, lo cual habla a favor de que la mayoría de éstas se deben a eventos *de novo*. La mayor ocurrencia de deleciones centrales *de novo* concuerda con el índice de recombinación meiótica que ocurre en el intrón 44, índice que es 12 veces mayor con respecto al genoma en general, es decir que el índice de recombinación presente entre los exones 44 y 45 alcanza los 14cM/Mb, cuando el índice de recombinación promedio para el cromosoma X es de 1.2cM/Mb (42,144). Nuestros resultados sugieren que las mutaciones *de novo* tipo deleciones se encuentran presentes en 2/3 partes de nuestra población (46) y esto puede

deberse al elevado índice de rearrreglos por recombinación homóloga en los dos puntos calientes durante la maduración de la línea germinal materna (148,152).

Se menciona que la eficiencia de la PCR-MC no alcanza el 100% debido a la probabilidad aunque remota, de mosaicismo somático (madre o hijo) o germinal (madre) reportados en la literatura como causas de dificultad diagnóstica en DMD/DMB y cuya frecuencia en familias con caso único es del 8 al 12% (53). Passos-Bueno y cols. (54) mencionan en sus resultados que las deleciones proximales se encuentran hasta en el 80% de los casos asociados a mosaicismo germinal. Sin embargo, ninguna de nuestras 14 familias con deleción proximal, ni las 52 restantes con deleción central, hicieron sospechar mosaicismo germinal. Aunque de acuerdo con nuestros resultados, la condición de mosaicismo germinal no pudo ser detectada con PCR-MC, la detección de esta condición se buscó en forma intencional por el análisis detallado de polimorfismos, dosis génica en hermanas y genealogía.

Una de las relevancias de este trabajo estriba en el hecho de que se logró incrementar substancialmente la detección de portadoras. La combinación de diferentes técnicas moleculares con la genealogía, logró asignar el estado de portadora o no portadora a mujeres en riesgo en el 70.4% (53.8% de la PCR-MC y 16.4% del AL) de las 132 familias. Esta cifra en otras palabras, significa que de cada 10 familias que se estudian en nuestro servicio, 7 de ellas reciben un asesoramiento genético de certeza, situación que no se logra con los métodos tradicionales, tales como la valoración de CPK sérica o la biopsia muscular. Así, un paciente que demuestre una deleción del gen DMD en leucocitos de sangre periférica o incluso con tan sólo 10 bulbos pilosos, ello confirmaría el diagnóstico clínico de distrofinopatía.

Por otro lado estos resultados permitieron crear una base sólida para emprender el diagnóstico prenatal (**Tabla 4, Figs. 28-29**). Es de tomar en cuenta que el diagnóstico prenatal a través de vellosidades coriónicas sería el de mayor riesgo de contaminación con DNA materno, además de conferir un riesgo mayor de complicaciones para el producto (22,169). Es por ello, que en este trabajo se empleó a la amniocentesis como el método de diagnóstico prenatal. Los procedimientos se manejaron de manera multidisciplinaria y con estrecha colaboración entre el Instituto Nacional de Perinatología, S.S. Ello reditúo en diagnósticos prenatales moleculares de certeza en la totalidad de procedimientos realizados (n=8) y sin complicaciones, las cuales están calculadas en 1 en 1000 amniocentesis (0.1%). El estudio molecular de amniocitos no mostró contaminación, fue rápido, y la toma de la muestra permitió el estudio citogenético a la par, además fue reproducible y mostró una alta sensibilidad y especificidad. Así la determinación molecular de sexo a través de la amplificación de secuencias DYZ1 (203) es un procedimiento muy sensible, pero no definitivo, pues la técnica no identifica aberraciones numéricas y/o estructurales de los sexocromosomas y la identificación definitiva del complemento cromosómico deberá ser en la medida de lo posible, confirmada por el estudio citogenético. Esta confirmación se realizó en tres de los diagnósticos prenatales y en ninguno hubo discrepancia con el estudio de secuencias DYZ1. El estudio ultrasonográfico de otros 4 diagnósticos prenatales, también estuvo acorde con la asignación de sexo molecular. La contaminación de la muestra de LA es un riesgo presente en cada amniocentesis. La contaminación con DNA genómico materno (dermis, músculo, sangre, etc.) puede dificultar la interpretación de los resultados, sin embargo esta se evita con las medidas de cambio de aguja y jeringa durante la punción y la obtención del LA. Sólo uno de los LA tenía aspecto hemático, pero el estudio del marcador D1S80, mostró dos bandas de intensidad similar y acorde a un estado heterocigoto, sin la aparición de una tercera banda ajena al producto y de origen materno. Ello sin embargo, no excluye por completo la contaminación. Asimismo, la intensidad de las bandas de los productos de

PCR en especial de los exones problema, no mostraron diferencias en las muestras analizadas por duplicado en 2 reacciones de 12 exones. Se acepta que más del 90% de los diagnósticos prenatales realizados a nivel mundial son normales, resultados concordantes con nuestro estudio (22).

La confiabilidad de nuestro estudio para la realización del DP se documentó en los productos sanos que han llegado a término (n=7), sólo en la familia 8 no se logró confirmar el resultado prenatal dado que no tuvimos acceso al producto. Así, la confirmación de los hallazgos moleculares en los productos, como se ha hecho para otras metodologías (p. ej. DP citogenético), es indispensable para constituir la sensibilidad y especificidad real del estudio.

La incongruencia de la paternidad biológica en el asesoramiento genético de las familias e incluso en estudios de ligamiento para caracterizar genes responsables de enfermedad, es un factor adverso que condiciona errores de asignación en los riesgos de recurrencia. En nuestro estudio, los marcadores *Xmnl* y *TaqI*, que son poco polimórficos y posteriormente con un marcador autosómico altamente polimórfico, excluyeron la paternidad biológica de dos hijas en 2 casos familiares de DMD. Estos resultados fueron corroborados por interrogatorio de la madre. En una de estas familias no había mutación caracterizada (**Fig. 25**). La segunda familia, presentaba una deleción caracterizada, por lo que la evaluación de dosis génica solventó la asignación de portadoras. Por fortuna, la incongruencia de paternidad biológica en sí no dificultó el asesoramiento de estas familias, tal como puede suceder en otras entidades monogénicas (p. ej. autosómico dominantes). Las consecuencias en la familia ante una paternidad biológica incongruente y que ha pasado desapercibida en el interrogatorio, en la cual se depende el uso del AL con marcadores bialélicos del gen DMD (*TaqI/Xmnl*) para asignar portadoras de casos familiares y sin mutación caracterizada, puede dar lugar a errores graves en la asignación

o la exclusión del estado de portadora en la descendencia femenina (pues es la única que hereda obligadamente el cromosoma X del padre). Cabe mencionar que en sólo en una de las dos familias, se nos advirtió previo al estudio molecular la posibilidad de la no paternidad, por lo que debemos hacer hincapié a través de un interrogatorio dirigido, conservando la confidencialidad y brindando una explicación previa detallada de las consecuencias adversas de esta situación en la detección de portadoras. Se ha argumentado (182), que la eficiencia en la identificación de no paternidad en las familias DMD/DMB y en otras patologías mendelianas, puede incrementarse mediante el empleo de marcadores intragénicos más polimórficos (STR's), los cuales además dan el beneficio de los aspectos ya mencionados en el asesoramiento. La prueba definitiva ante la sospecha de un alelo no concordante, deberá ser mediante el perfil de DNA.

Es indispensable hacer énfasis en la necesidad de poner al alcance de las familias la posibilidad de un diagnóstico de certeza. Desafortunadamente en México, la cultura de la genética molecular empieza apenas a hacerse patente, condicionando que en nuestra experiencia hayamos observado numerosas familias con mujeres en etapa reproductiva y donde no existe la disponibilidad de casos afectados, pues nunca se considero la preservación de alguna muestra biológica (cabellos, sangre, piezas post-mortem, piezas dentarias, etc.) para el estudio molecular de portadoras. Estas muestras han demostrado tener un papel preponderante en algunas familias reportadas (235). En las DMD/DMB, el caso índice afectado es indispensable para la caracterización de la mutación o del alelo de riesgo; sin la muestra de dicho paciente difícilmente se puede ofrecer un AG de certeza, aunque puede haber excepciones (205) (**Fig. 29**). Debido al carácter estable de la molécula de DNA, la conservación de la muestra no requiere metodologías tan sofisticadas, tal como lo ejemplifica la colocación de 4 gotas de sangre en la tarjeta de Guthrie la cual conserva al DNA genómico por años, siempre y cuando se mantenga en un entorno anhidro (236).

Es evidente que el número de familias beneficiadas con el estudio molecular es superior al que se obtiene con los métodos tradicionales de diagnóstico. La implementación de nuestras metodologías brindan mayores argumentos para el asesoramiento en subsecuentes familias no sólo pertenecientes a nuestra Institución, sino a las referidas de otras instituciones de salud. Asimismo, es importante la implementar metodologías que permitan caracterizar a las mutaciones del tipo puntual o duplicación, lo cual mejoraría aún más el número de familias caracterizadas y aumentaría nuestro conocimiento acerca de la fisiopatología de la enfermedad. Finalmente con los resultados obtenidos, proponemos una metodología molecular para seguir una estrategia molecular de las familias mexicanas con DMD/DMB (**Fig. 30**).

ALGORITMO DIAGNÓSTICO EN DMD/DMB

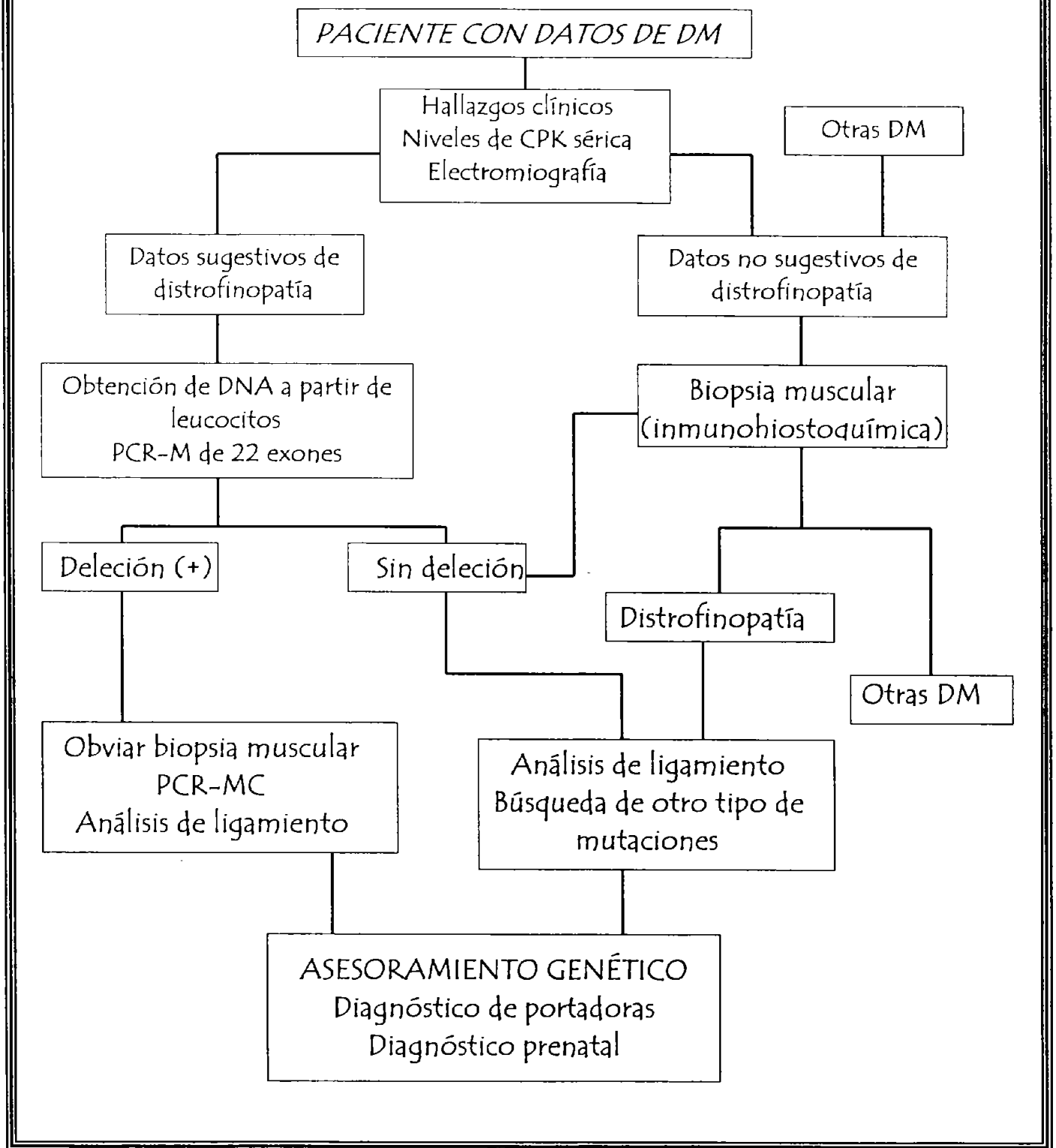


Figura 30. Algoritmo metodológico propuesto para el estudio molecular de las familias DMD/DMB.

CONCLUSIONES

1. La proporción de familias captadas con caso único de DMD/DMB/DMI fue similar a las reportadas para otras poblaciones (alrededor de 2/3 partes de los casos totales).
2. La frecuencia y localización de las deleciones en nuestra muestra fue similar a las reportadas en la literatura.
3. La correlación fenotipo-genotipo, presentó excepciones a la hipótesis de Mónaco. Dicha correlación, requerirá del empleo de otras metodologías.
4. La alta incidencia de deleciones ocurridas como eventos *de novo*, se contrapone a las cifras clásicamente reportadas, con excepción de lo encontrado en población hindú.
5. La frecuencia de recombinación intragénica 5' observada fue baja (2.7%), aunque puede ser una cifra que no refleje el índice de recombinación real, tanto por el número limitado de marcadores, como por su carácter bialélico. Aún, así es un factor negativo que deberá tenerse en cuenta en el asesoramiento genético.
6. La estrategia de PCR-MC demostró ser un método rápido, reproducible, de bajo costo y confiable en la asignación de portadoras en el 100% de las familias con DMD/DMB causadas por una mutación tipo deleción.
7. La utilidad de los RFLPs y el VNTR para el asesoramiento genético de las familias con DMD/DMB/DMI, presentó limitaciones debido a la alta frecuencia de casos únicos y a estructura familiar inadecuada.
8. El beneficio de la aplicación de PCR-MC y AL, fue del 70% de las familias analizadas.
9. Con las estrategias empleadas y la genealogía presente en las familias, el mosaicismo germinal o somático son condiciones que no pueden ser descartadas como causa de DMD/DMB.
10. El trabajo finca las bases de un algoritmo diagnóstico aplicable a las familias DMD/DMB, el cual mejora las perspectivas para el asesoramiento genético y establece condiciones para el diagnóstico prenatal.
11. La detección de familias con paternidad biológica incongruente en nuestro estudio, podría indicar la existencia de familias adicionales con la misma condición, pudiendo llegar a ser un factor seriamente adverso en el asesoramiento genético de certeza en las familias con DMD/DMB.

ANEXO 1



Instituto Nacional de Pediatría
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION EN GENETICA HUMANA
LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR



FECHA _____

NOMBRE _____ EDAD _____ M F

LUGAR DE ORIGEN _____

DIRECCION _____

_____ TELEFONO _____

PADRE _____ EDAD AL NAC. _____ OCUPACION _____

MADRE _____ EDAD AL NAC. _____ OCUPACION _____

AHF _____

APP _____

AGO: G _____ P _____ A _____ DURACION DE LA GESTACION _____ MOV. FETALES _____

PROBLEMAS DURANTE EL EMBARAZO _____

PARTO _____ PRESENTACION _____ PESO _____ TALLA _____

ATENDIDO EN _____ ANALGESIA _____

NEONATAL INMEDIATO _____

ARBOL GENEALOGICO



Instituto Nacional de Pediatría

D.P.M. _____

EDAD DE INICIO _____ SINTOMAS PRINCIPALES _____

EVOLUCION _____

E.F. _____

C.P.K. _____

E.M.G. _____

BIOPSIA MUSCULAR _____

E.K.G. _____

RESULTADO POR M-PCR

MUESTRA	PACIENTE	MADRE	HERMANAS	PADRE	OTROS

Normal (N) Alteración (DMD/B)

BUSQUEDA DE OTRAS MUTACIONES

MUESTRA	PACIENTE	MADRE	HERMANAS	PADRE	OTROS

Normal (N) Alteración (DMD/B)

DIAGNOSTICO _____

CANALIZADO POR _____

ANEXO 2

Short Report

High frequency of *de novo* deletions in Mexican Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. Implications for genetic counseling

Alcántara MA, Villarreal MT, Del Castillo V, Gutiérrez G, Saldaña Y, Maulen I, Lee R, Macías M, 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. © Munksgaard, 1999

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most common lethal hereditary neuromuscular disease. As there is no effective treatment, accurate carrier detection is essential for genetic counseling and prevention. Although linkage analysis has been widely used for this purpose, being an indirect analysis it has several limitations. Using linkage analysis for carrier detection, we found serious limitations, mainly because 82.9% of all probands were isolated cases. We used quantitative polymerase chain reaction for direct carrier detection in families with exon deletions and found a higher than expected frequency of *de novo* deletions (62.2%). Furthermore, only 20.7% of the mothers of isolated deletion DMD/Becker muscular dystrophy (BMD) patients were found to be carriers. This result suggests that the Mexican population has a high frequency of *de novo* DMD mutations.

MA Alcántara^a, MT Villarreal^a, V Del Castillo^b, G Gutiérrez^a, Y Saldaña^a, I Maulen^a, R Lee^a, M Macías^a and L Orozco^{a,b}

^aDepartment of Research in Human Genetics, National Institute of Pediatrics, CICATA-IPN, Mexico City, Mexico

Key words: carrier detection - Duchenne muscular dystrophy - gene deletion - quantitative PCR

Corresponding author: Lorena Orozco, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur No. 3700-C, Col. Insurgentes-Cuicuilco, Del. Coyoacán, D.F. 04530, México. Fax: +52 5 608 59 81

Received 2 October 1998, revised and accepted for publication 28 January 1999

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most common lethal neuromuscular genetic disease affecting approximately 1/3500 males (1). Both Duchenne and the milder allelic form Becker muscular dystrophy (BMD) are inherited as X-linked recessive disorders, caused by mutations of the dystrophin gene located at Xp21 (2). Approximately 50-60% of the affected individuals have a deletion of one or more exons clustered at two hotspots: 30% at the proximal and about 70% at the central region of the gene; and approximately 6% of the patients have exon duplications (3-7). The frequency and distribution of deletions and duplications apparently show no ethnic variance (8); however, this issue has been a matter of controversy (9-15).

So far, there is no effective treatment for the disease. Therefore, determination of carrier status is of utmost importance for genetic counseling and prevention. Although linkage analysis is a

common approach for carrier detection, there is a high recombination rate across the gene (12%) (16), and the non-carrier state of mothers of isolated cases can only be determined if they are heterozygous for an intradeletion polymorphism. Other techniques such as quantitative Southern blot and multiplex quantitative polymerase chain reaction (MQ-PCR) have been successfully used to quantify gene dosage for the direct identification of gene deletion/duplication carriers (15, 17-19); and variations of quantitative PCR have been thoroughly assessed indicating that the technique may completely discriminate between deletion carriers and normal females (20).

We studied the frequency and distribution of exon deletions in 76 Mexican DMD/BMD patients, and used the quantitative PCR procedure described by Abbs and Bobrow (17) for carrier detection, finding a high frequency of *de novo* deletions.

Materials and methods

Subjects

Seventy-six Mexican DMD/BMD families were included in the study, 67 were DMD and 9 were BMD. The patients were diagnosed at the Neurology and Genetics Departments of our Institute. Clinical diagnosis was based on physical examination and family history, including serum creatine phosphokinase (CPK) levels, electromyography, and muscle biopsy. Serum CPK levels were also measured in all first-degree female relatives (at least twice) and were considered as elevated when > 150 U/l (normal range 96–150 U/l). Distinction between DMD and BMD was carried out on the basis of progression of disease, age of ambulation, and confinement to wheel chair (21). Blood samples were drawn from a total of 231 individuals: 76 index cases and 155 first-degree relatives, including 76 mothers of DMD patients, 70 sisters, and 9 healthy males. DNA was extracted from peripheral blood leukocytes according to conventional protocols.

Deletion screening by multiplex PCR

All patients were screened for deletions of 19 exons by multiplex PCR using previously described oligonucleotides (22, 23). A thermal cycler (Perkin-Elmer 9600 Corp., Norwalk, CT, USA) was used for DNA amplification. We used 250 ng of DNA; 100–200 nM of each primer; 200 nM of each dNTP, 3 U Stoffel fragment of Amplitaq DNA polymerase™ (Perkin-Elmer Cetus Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA), 6.7 mM MgCl₂ in a reaction buffer at a final concentration of 10 mM Tris-HCl, 10 mM KCl at pH 8.3, all in a final volume of 50 µl. Amplification was carried out with an initial denaturation at 94°C 5 min, followed by 26 cycles of 1 min denaturation at 94°C, 1 min annealing 55°C, 4 min extension 68°C and a 5 min final extension at 68°C PCR. Products were resolved in a 5% polyacrylamide gel.

Carrier identification

RFLPs analysis. Two intragenic polymorphic sites were analyzed using the primers described by Roberts et al. (24). One-fifth of the products of amplification were digested with 5–10 U of either XmnI or TaqI for 1 h at appropriate temperatures and then analyzed electrophoretically.

Gene dosage by MQ-PCR. All first-degree female relatives at risk for carrying exon deletions were tested for gene dosage by MQ-PCR as described

by Abbs and Bobrow (17). DNA concentration was measured spectrophotometrically in triplicate. PCRs were performed under conditions of exponential relationship between template DNA and the amount of PCR product obtained to facilitate gene dosage. Then, 125 ng DNA was added to each reaction tube containing 500 nM of each oligonucleotide primer, 500 nM dNTPs, 6.7 mM MgCl₂, 3 U Stoffel fragment of Amplitaq DNA polymerase™, and the buffer described above. The thermal cycler conditions were: 5 min initial denaturation at 94°C, followed by 23 cycles of 94°C denaturation for 50 s, 55–56°C annealing for 50 s, 68°C extension for 3 min, and final elongation at 70°C for 3 min. Reaction mixtures were electrophoresed in a 5% polyacrylamide gel at 75 V during 45 min. All samples were tested in duplicate, and gene dosage was assessed by densitometric analysis in a Cliniscan device (Helena Laboratories, Beaumont, TX). We used non-deleted exons as intrasample controls, and healthy male and female individuals as intersample controls. For patients with whole gene deletions and their female relatives, the intrasample controls used were stretches of DNA of a non-DMD gene (intron 18 sequence for RFLP BclI of the factor VIII gene) (25).

Statistical analysis

The statistical analysis was performed with an EPI6 program. The families were divided in two groups according to the proband's M-PCR analysis (37 deleted families and 39 non-deleted). A comparative analysis was made using the Kruskal-Wallis test for non-Gaussian distributed continuous variables, and chi-square analysis for categorical variables. Statistical significance was considered when $p < 0.05$.

Sensitivity and specificity were estimated as described by Sacket et al. (26). Sensitivity and specificity of serum CPK levels were calculated to predict carrier state with a 2 × 2 table, using gene dose as gold standard. Patients having elevated serum CPK (> 150 U/l) and 0.5 gene dose as compared to the DNA measure of a healthy female control were considered as true positives. Finally, to detect if the proportion of deletion carriers in the present study differed from the expected, we used the chi-square of proportions test.

Results

The analysis of family pedigrees showed that only 13/76 (17.1%) mothers were obligate DMD/BMD carriers and the remainder 63 cases (82.9%) were isolated. Deletions removing portions of the DMD

gene were found in 37 index cases (48.7%; 95% CI: 37–60%); 29 deletions (78.4%) occurred in the central region of the gene. 6 (16.2%) at the 5' region, 1 patient apparently had a whole gene deletion, and in 1 more patient the promoter amplified, but not the other exons tested. Only 8 of the deletions cases (22%) and 5 of the non-deletion cases (13%) had a positive family history for DMD/BMD ($\chi^2 = 509$, $p = 0.47$).

Carrier detection using pERT polymorphisms showed 80% of the mothers were informative for at least one of these RFLPs, but we found serious limitations for carrier detection: first, 82.9% of all probanda were isolated cases; second, we found a high intragenic recombination frequency (data not shown); and third, these polymorphisms were intradeletional in only three families. To improve the efficiency of carrier detection, we used MQ-PCR to test all first degree female relatives of patients with exon deletions (37 families). We analyzed all obligate deletion carriers and healthy females with no family history of X-linked muscular dystrophy in a blind fashion, and we were able to unequivocally assign the carrier or non-carrier state in all of them. Fig. 1 shows the case of a DMD patient with a deletion from exon 45–54. Exons 6, 51 and 53

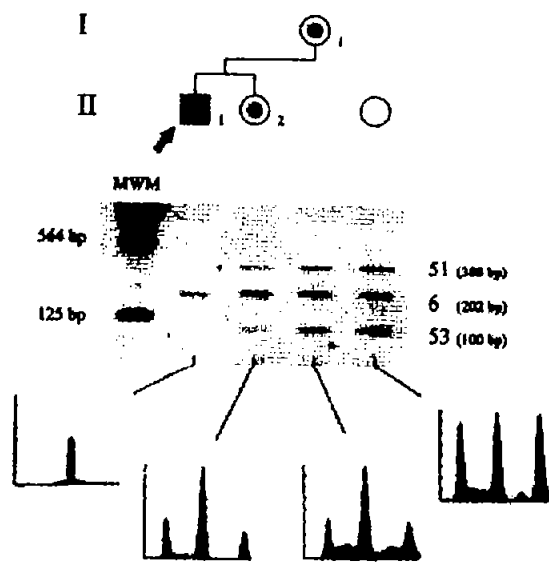


Fig. 1. Identification of DMD carriers by MQ-PCR. The upper part shows the pedigree of a DMD family. The target DNA (exons 51 and 53) was amplified together with the control DNA (exon 6) as a reference. Lane 1: Molecular weight marker *Hind*III-digested lambda DNA; lane 2: index case; lane 3: patient's sister; lane 4: patient's mother; lane 5: normal female control. The bottom part shows the densitometric analysis of each sample. The patient had the exons 51 and 53 deleted; the mother and the sister had half of gene dosage to those same exons comparing with the intrasample control (exon 6) and the intersample control (normal female).

were amplified in the same reaction. The exons amplified in the mother and sister, although exons 51 and 53 showed less intensity than exon 6 on electrophoresis. The densitometric analysis confirmed that both the mother and sister were deletion carriers based on the peak area ratios.

One patient was found to have a deletion of all exons tested. His mother was found to be a non-carrier, as she was heterozygous for both *Taq*I and *Xmn*I polymorphisms, and gene dosage was found to be normal (using a stretch of intron 18 of the factor VIII gene as an intrasample control). One more patient had a deletion of all exons tested except for the promoter. Although his mother was homozygous for RFLP *Xmn*I, she was heterozygous for RFLP *Taq*I, proving that both alleles were present. Furthermore, using the amplified promoter as intrasample control for densitometric analysis, we confirmed that she was a non-carrier.

MQ-PCR allowed us to assign the carrier or non-carrier state in all female relatives of the 37 deletion patients. The deletion was inherited from the mother in only 14 cases (37.8%) (although family history was positive in only 8 cases). Thus, the frequency of *de novo* deletions was 62.2% (23/37) (95% CI: 45–78%), which was significantly higher than the expected frequency of *de novo* mutations (33%) (27) ($\chi^2 = 9.5$, $p < 0.001$).

Serum CPK levels were elevated in 4/37 mothers of the deletion group and in 4/39 mothers of the non-deletion group. In the deletion group, all mothers with elevated CPK were confirmed as carriers by MQ-PCR. Estimated sensitivity and specificity of CPK for carrier detection were 36 and 100%, respectively.

Discussion

Serum CPK levels have been of value for carrier detection, although in carrier females the range of values overlaps the normal range, making the test less than definitive (1). In the present series, serum CPK levels showed a low sensitivity (36%), although all deletion mothers with increased CPK were found to be deletion carriers by DNA analysis. More recently, linkage analysis has been widely used for carrier detection and prenatal diagnosis (27). However, this indirect approach is limited by the high intragenic recombination frequency, and the high frequency of new mutations (28). Since 82.9% of our patients were isolated cases, we also found serious limitations using linkage analysis. Therefore, we used MQ-PCR, which considerably improved carrier detection and allowed the unequivocal assignment of carrier status in all female relatives of the deletion cases. Although the

reaction conditions in quantitative PCR have to be strictly controlled, our blind study proved that the results can be very reliable, as has been assessed by other authors (15, 20). In addition, the technique is easy and fast to perform. Therefore, we consider quantitative PCR is currently the best and most reliable method for carrier detection in DMD/BMD families with deletions or duplications. Furthermore, gonadal mosaicism may be evidenced if the deletion is found in other offspring of an apparently non-carrier mother. This phenomenon has been found to occur in up to 20% of the mothers of apparently isolated DMD deletion cases (29, 30). We also analyzed all sisters and brothers of isolated deletion patients, but did not find evidence of gonadal mosaicism in any of our cases. Of course, this does not rule out gonadal mosaicism, and prenatal diagnosis was offered to all these families. Some researchers have suggested there are ethnic variations in the frequency and distribution of deletions (9-11, 13, 14). Banerjee and Verma (8) suggested that population differences in the frequency of deletions can be explained by a smaller sample or by analysis being restricted to a lower number of exons. We found exon deletions in 48.68% of DMD/BMD patients, located at two mutation hotspots: 78.4% in the central and 16.2% at the proximal regions, which was not significantly different from reports of Baumbach et al. (3), Gillard et al. (4), Koenig et al. (5), Cooke et al. (6), and Upadhyaya et al. (7).

Other possible ethnic differences in DMD/BMD have been observed, such as a high frequency of duplications in the Japanese population (12); a higher incidence of DMD among Asian Indian immigrants in the UK as compared to White people, Black people, and Pakistanis (31); population differences in the distribution of breakpoints by intron (32); and a high frequency of *de novo* deletions in North Indians (15). Our findings were very similar to those of Sinha et al. (15). We also found a high frequency of *de novo* deletions (62%; 95% CI: 48-75%), while only 20.7% of the mothers of isolated deletion patients were found to be carriers. Moreover, the frequency of familial cases was only 17%. Our results suggest that this population may also have an ethnic predisposition to new mutations.

Nevertheless, we must point out that Sinha's study and our own results reporting a high frequency of *de novo* mutations analyzed only deletion families, and the frequency of new deletions may be different from that of new point mutations. In this regard, the mother of an isolated DMD/BMD case has a theoretical 67% risk of being a carrier, provided that the overall mutation rate is

equal in male and female gametes (33). Several studies have confirmed this *de novo* mutation rate (27, 34-36), although they do not consider the nature of the mutation. As deletions/duplications are probably the consequence of non-equal crossing over caused by various homologous sequences within the dystrophin gene (37), they would arise during mitosis or meiosis only in female cells. There is evidence that the vast majority of deletions arise in oogenesis, while most point mutations stem from spermatogenesis (38). Thus, the mother of an isolated DMD patient with no apparent structural anomaly of the gene would theoretically have a higher risk of being a carrier than the mother of an isolated deletion/duplication case. This may explain the high frequency of *de novo* deletions found by us and Sinha et al. (15). However, we would expect a higher frequency of familial cases among non-deletion families, but the proportion of familial cases was similar in non-deletion (13%) and deletion (22%) families ($p = 0.47$). The sample studied here is relatively small, so that accurate carrier detection in a greater number of DMD/BMD families including non-deletion/duplication cases will be necessary to confirm this. Thus, recurrence risks in isolated cases may have to be reestimated according to the nature of the mutation.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Asociación Mexicana de Fibrosis Quística for the support provided.

References

1. Emery AEH. Duchenne Muscular Dystrophy, 2nd edition. Oxford: Oxford University Press, 1993: 150-156.
2. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. Cell 1987; 50: 509-517.
3. Baumbach LL, Chamberlain JS, Ward PA, Farwell NJ, Caskey CT. Molecular and clinical correlations of deletions leading to Duchenne and Becker muscular dystrophies. Neurology 1989; 39: 465-474.
4. Gillard EF, Chamberlain JS, Murphy EG, Duff CL, Burghes AHM, Thompson MW, Sutherland J, Oss Y, Bodrug SE, Klamut HJ, Ray PN, Worton RG. Molecular and phenotypic analysis of patients with deletions within the deletion-rich region of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene. Am J Hum Genet 1989; 45: 507-520.
5. Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettschen T, Meng G, Müller CR, Lindhof M, Kääriäinen H. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. Am J Hum Genet 1989; 45: 498-506.
6. Cooke A, Lanyon WG, Wilcox DE, Dorman ES, Katakai A, Gillard EF, McWhinnie AJM, Morris A, Ferguson-Smith MA, Connor JM. Analysis of Scottish Duchenne and Becker muscular dystrophy families with dystrophin cDNA probes. J Med Genet 1990; 27: 292-297.

7. Upadhyaya M, Smith RA, Thomas NST, Norman AM, Harper PS. Intragenic deletions in 164 boys with Duchenne muscular dystrophy (DMD) studied with dystrophin cDNA. *Clin Genet* 1990; 37: 456-462.
8. Bauerjoss M, Verma IC. Are there ethnic differences in deletions in the dystrophin gene? *Am J Med Genet* 1997; 68: 152-157.
9. Sugino S, Fujishita S, Kamimura N, Matsumoto T, Wapenaar MC, Deng HX, Shibuya N, Miike T, Nukawa N. Molecular-genetic study of Duchenne and Becker muscular dystrophies: deletion analysis of 45 Japanese patients and segregation analysis in their families with RFLPs based on the data from normal Japanese families. *Am J Med Genet* 1989; 34: 555-561.
10. Tsukamoto H, Inui K, Fukushima H, Nishigaki T, Taniike M, Tanaka J, Okada S. Molecular study of Duchenne and Becker muscular dystrophies in Japanese. *J Inherited Metab Dis* 1991; 14: 819-824.
11. Kádasi L, Gécz J, Saksová L. Frequency and distribution of deletions in the dystrophin gene in Duchenne muscular dystrophy patients from an East-European Slavonic population. *Gene Geography* 1991; 5: 137-140.
12. Hiraiishi Y, Kato S, Ishihara T, Takano T. Quantitative Southern blot analysis in the dystrophin gene of Japanese patients with Duchenne or Becker muscular dystrophy: a high frequency of duplications. *J Med Genet* 1992; 29: 897-901.
13. Baranov VS, Gorbunova VN, Malysheva OV, Arsenyeva OV, Kasheeva TK, Evgrafov OV, Polyakov AV, Lebedev VM, Kuznetzova TV, Shlykova SN, Mikhailov AV, Vakharovskiy VG. Dystrophin gene analysis and prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy in Russia. *Prenat Diagn* 1993; 13: 323-333.
14. Ballo R, Viljoen D, Beighton P. Duchenne and Becker muscular dystrophy prevalence in South Africa and molecular findings in 128 persons affected. *S Afr Med J* 1994; 84: 494-497.
15. 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: 327-331.
16. Abbs S, Roberts RG, Mathew CG, Bentley DR, Bobrow M. Accurate assessment of intragenic recombination frequency within the Duchenne muscular dystrophy gene. *Genomics* 1990; 7: 602-606.
17. Abbs S, Bobrow M. Analysis of quantitative PCR for the diagnosis of deletion and duplication carriers in the dystrophin gene. *J Med Genet* 1992; 29: 191-196.
18. Prior TW, Friedman KJ, Highsmith E, Perry TR, Silverman LM. Molecular probe protocol for determining carrier status in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Clin Chem* 1990; 36: 441-445.
19. Bronzova J, Todorova A, Kalaydjieva L. Detection of carriers of deletions in the dystrophin gene in Bulgarian DMD/BMD families. *Hum Genet* 1994; 93: 170-174.
20. Pastore L, Caporaso MG, Frisso G, Orsini A, Santoro L, Sacchetti L, Salvatore F. A quantitative polymerase chain reaction (PCR) assay completely discriminates between Duchenne and Becker muscular dystrophy deletion carriers and normal females. *Mol Cell Probes* 1996; 10: 129-137.
21. Muntoni F, Gobbi P, Sewry C, Sherrett T, Taylor J, Sadhu SK, Abbs S, Robert R, Hodgson SV, Bobrow M. Deletions in the 5' region of dystrophin and resulting phenotypes. *J Med Genet* 1994; 31: 843-847.
22. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the DMD locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 1988; 56: 135-156.
23. Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1990; 86: 45-48.
24. Roberts RC, Cole C, Hart K, Bobrow M. Rapid carrier and prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Nucleic Acid Res* 1989; 17: 811.
25. Gitschier J, Drayne D, Tuddenham EGD, White RL, Lawn RM. Genetic Mapping and diagnosis of Haemophilia A achieved through a BclI polymorphism in the factor VIII gene. *Nature* 1985; 314: 738.
26. Sacket LD, Haynes RB, Togwell P. *Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine*, Toronto: Little Brown, 1985, 17-45: 249-254.
27. Hodgson SV, Bobrow M. Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Br Med Bull* 1989; 45: 719-744.
28. Worton RG, Brooke MH. The X-linked muscular dystrophies. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, eds. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 7th edition. New York: McGraw-Hill, 1995: 4195-4226.
29. van Essen A, Abbs S, Baiget M, Bakker E, Boileau C, van Broeckhoven C, Bushby K, Clarke A, Claustres M, Covone A, Ferrari M, Ferlini A, Galluzzi G, Grimm T, Grubben C, Jaupovic M, Kärrläinen H, Liechti-Gallati S, Melis MA, van Ommen GJB, Poncin JE, Scheffer H, Schwartz M, Speer A, Stuhmann M, Verellen-Dumoulin C, Wilcox DE, van Kate LP. Parental origin and germline mosaicism of deletions and duplications of the dystrophin gene: a European study. *Hum Genet* 1992; 88: 249-257.
30. Passos-Bueno MR, Bakker E, Kneppers ALJ, Takata RI, Rapaport D, den Dunnen JT, Zatz M, van Ommen JB. Different mosaicism frequencies for proximal and distal Duchenne muscular dystrophy (DMD) mutations indicate difference in etiology and recurrence risk. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 1150-1155.
31. Roddie A, Bunday S. Racial distribution of Duchenne muscular dystrophy in the West Midlands region of Britain. *J Med Genet* 1992; 29: 555-557.
32. Danieli GA, Mioni F, Müller CR, Vitiello L, Mostacciolo ML, Grim T. Patterns of deletions of the dystrophin gene in different European populations. *Hum Genet* 1993; 91: 342-346.
33. Haldane JBS. The rate of spontaneous mutation of a human gene. *J Genet* 1935; 31: 317-326.
34. Zatz M, Lange K, Spence MA. Frequency of Duchenne muscular dystrophy carriers. *Lancet* 1977; i: 759.
35. Caskey CT, Nussbaum RL, Cohen LC, Pollack L. Sporadic occurrence of Duchenne muscular dystrophy; evidence for new mutation. *Clin Genet* 1980; 18: 329-341.
36. Williams WR, Thompson MW, Morton EN. Complex segregation analysis and computer assisted genetic risk assessment for Duchenne muscular dystrophy. *Am J Med Genet* 1983; 14: 315-333.
37. Winter RM, Pembrey ME. Does unequal crossing over contribute to the mutation rate in Duchenne muscular dystrophy? *Am J Med Genet* 1982; 12: 437-441.
38. Grimm T, Meng G, Liechti-Gallati S, Bettecken T, Müller CR, Müller B. On the origin of deletions and point mutations in Duchenne muscular dystrophy: most deletions arise in oogenesis and most point mutations result from events in spermatogenesis. *J Med Genet* 1994; 31: 183-186.

ANEXO 3

Carrier detection and prenatal molecular diagnosis in a Duchenne muscular dystrophy family without any affected relative available

M.A. Alcántara^{a,d}, R. García-Cavazos^b, E. Hernández-U^a, A. González-del Angel^a,
A. Carnevale^a, L. Orozco^{a,c*}

^a Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Investigación en Genética Humana, Instituto Nacional de Pediatría, S.S., Insurgentes Sur No. 3700-C, Col. Insurgentes-Cuicuilco, Del. Coyoacán, C.P. 04530, México D.F., Mexico

^b Departamento de Genética Perinatal, Instituto Nacional de Perinatología, S.S., México, D.F., Mexico

^c Programa Interinstitucional de Biomedicina Molecular CICATA-IPN, México D.F., Mexico

^d Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, UNAM, México D.F., Mexico

Received 6 August 2001; accepted 11 September 2001

Abstract – In this paper we report a family where the affected DMD patients were not available for study and a molecular strategy was used for female carriers detection and for prenatal diagnosis. Linkage analysis was performed with two markers within the DMD gene, in all family members screened. DMD markers used (pERT87.8/TaqI and pERT87.15/XmnI) seemed not to be informative because the proposita's mother (II-2) was homozygous for the minor allele at each marker (T2 and X2), however, the proposita and one sister carried only the major allele, which was inherited from the father. These results suggested that a deletion involving both markers could be present, and was inherited from the mother to both daughters. Quantitative multiplex PCR confirmed the deletion in female carriers, involving at least exons 12 to 17. DNA studies of cultured amniotic fluid cells at 14 weeks gestation, by amplification of specific Y-chromosome sequences, followed by multiplex PCR, lead to the diagnosis of a male fetus affected by DMD. © 2001 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

Duchenne Muscular Dystrophy / Prenatal Molecular Diagnosis

1. Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a lethal X-linked recessive disorder affecting 1 in 3,500 male births [19]. It is caused by mutations in the DMD gene, located on Xp21.2, which encodes a protein of the membrane cytoskeleton in skeletal muscle (dystrophin) [9]. Mutations in the DMD gene, result in a progressive muscle degeneration and early death. Most of the affected individuals have a deletion of one or more exons clustered in two hot spots located in the proximal and central regions of the gene [4]. Approximately one-third of the DMD patients carry *de novo* mutations, although in some populations *de novo* mutations accounts for 66% [21]. The absence of effective treatments has led to develop new approaches for carrier detection and prenatal diagnosis [11]. Linkage analysis using intragenic or extragenic

markers, such as RFLPs, VNTRs, or STRs, have been used for carrier detection when DMD gene mutation is not characterized [14]; however, the high rate of intragenic recombination, small family size, and early death of DMD patients, have limited the use of these markers [13, 14]. To date, the direct mutation identification in DMD female relatives is possible using quantitative Southern blot [15], multiplex exon amplification by PCR [12], RT-PCR [18], FISH [7], and immunohistochemical muscle dystrophin studies [6]. At a time that a female carrier is detected, prenatal molecular diagnosis may be done [8] with certainty in DMD families.

Here, we report a family where the affected DMD patients were not available for study and the molecular strategy led to the detection of female carriers and prenatal diagnosis.

* Correspondence and reprints.

E-mail address: lorozco@buzon.main.conacyt.mx (L. Orozco).

2. Materials and methods

2.1. Family

The proposita (III-4) was a 27 year-old woman with two relatives who died of DMD: a brother (III-3) and a maternal uncle (II-4) (*figure 1*). She was referred for genetic counseling to the Genetic Department of the National Pediatric Institute because of a pregnancy, even though she had a healthy 8-year-old son. Her carrier status was determined and prenatal molecular diagnosis of the second pregnancy was done. Her mother (II-2), a healthy brother, three possible carrier sisters, and her son, were also included in this study.

2.2. DNA samples

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes of II-1, II-2, III-1, III-2, III-4, III-6, III-7, IV-4 and amniotic fluid cells (IV-5) according to standard protocols [20].

2.3. Linkage study

Linkage analysis was performed using two intragenic DMD markers: pERT87.8/*TaqI* and pERT87.15/*XmnI*, which are RFLPs, located in introns 13 and 17 of the DMD gene respectively [17].

2.4. Quantitative Multiplex PCR (QM-PCR)

Carrier status detection was performed by QM-PCR in one plex, as previously described [1]. PCR was performed with 125 ng of genomic DNA, 0.5 μ M of each primer, 200 μ M of each dNTP, 3 IU Taq polymerase (Stoffel fragmentTM, Perkin Elmer Roche, CA), 6.7 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, 10 mM KCl (pH 8.3) in a final volume of 50 μ l. Thermal cycling

was carried out by the following steps: samples were heated to 95°C for 5 min., followed by 23 cycles at 95°C for 50 sec., 55°C for 50 sec. and 68°C for 3 min. A final elongation step at 70°C for 3 min. was done. Fifteen μ l of the PCR product was electrophoresed in a 5% polyacrylamide gel, stained with ethidium bromide, and pictures were taken under ultraviolet light with PolaroidTM film mod. 665, ISO 300, B/W negative for densitometric analysis. Genetic dosage tests were performed by densitometric analysis, measuring each PCR product, including healthy control subjects (intersample variation). DMD non-deleted exons were used as intrasample controls. All samples were tested in duplicate and gene dosage was assessed by densitometric analysis in a CliniScanTM device (Helena Laboratories, Beaumont, TX).

2.5. Fetal DNA analysis

To screen specific Y-chromosome sequences by PCR, the DNA from amniocytes (IV-5) was amplified under reported conditions, using two primers designed for the highly repetitive and heterochromatic DYZ1 sequences (Yq12) [10]. DNA from a normal female and a male were used as controls. Amplification products were resolved in a 2% agarose gel.

Multiplex PCR (M-PCR) [5] was performed with 150–250 ng of genomic DNA, 0.1 μ M of each primer, 200 μ M of each dNTP, 2.5 IU Taq polymerase (Stoffel fragmentTM, Perkin Elmer Roche, CA), 6.7 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, 10 mM KCl (pH 8.3), in a total volume of 50 μ l. Samples were amplified under the cycling conditions described above. The DNA of a healthy male control was used as a control. PCR products (15 μ l) were electrophoresed in a 3% agarose gel.

3. Results

The DMD markers used (pERT87.8/*TaqI* and pERT87.15/*XmnI*) were not to be informative because the proposita's mother (II-2) was apparently homozygous for the minor allele at each marker (T2 and X2). The father (II-1) showed the minor allele X2 at the *XmnI* locus and the major allele T1 at the *TaqI* locus. Unexpectedly, the proposita and one sister carried only the major allele, which was inherited from the father (*figure 2*). These results suggested that a deletion involving both markers could be present, that was inherited from the mother to both daughters. To confirm this, we proceeded to look for the presence of the deletion using QM-PCR for exons 12 and 17.

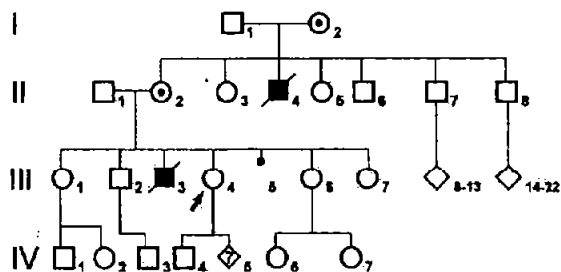


Figure 1. Pedigree of the family pregnant proposita.

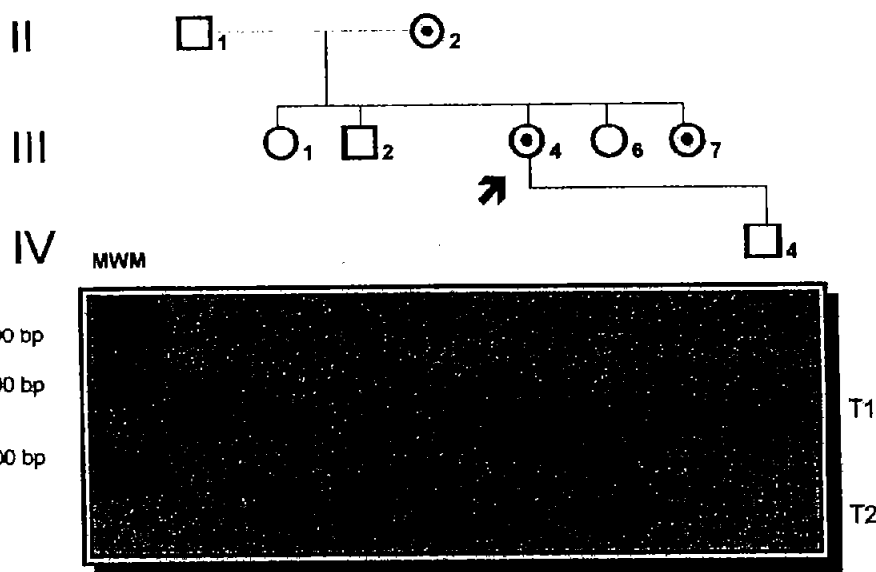


Figure 2. Partial pedigree of the family showing the linkage analysis using pERT87.8/TaqI RFLP marker. The proband's father (II-1) carries the T1 marker and the mother shows homocigosity for T2 marker. The proband's sisters III-1 and III-6 inherited the T1 allele from the father and the T2 allele from the mother. The proband (III-4) and her sister (III-7) show pseudo-homocigosity for T1, suggesting a deletion.

Exon 50 was amplified in the same reaction as an internal control. PCR products and densitometric analysis revealed a genetic dosage reduction of exons 12 and 17 in the obligate carrier mother (II-2), the proposita (III-4) and one of her sisters (III-7) (figure 3). This analysis confirmed the deletion involving at least exons 12 to 17 and the carrier status of the proposita and one of her sisters.

Once the carrier status of the proband was established, prenatal diagnosis was performed by screening specific Y-chromosome sequences and by using multiplex PCR from amniotic fluid cells DNA. PCR of DZY1 heterocromatic sequences from fetal genomic DNA analysis, showed a 154 bp band, indicating the presence of Y specific sequences (figure 4a). The RFLPs analysis also showed the absence of both *TaqI* (figure 4b) and *XmnI* (data not shown) markers in the fetus. In order to confirm the presence of the deletion in the fetus, M-PCR was done including sequences of the 5' region (Pm1, 8,12,17,13 and 19) and non-deleted exons (50 and 55). M-PCR test showed a partial intragenic deletion in 5' region (figure 4c), involving at least exons 12 to 19 leading to the diagnosis of a DMD affected male. Contamination from maternal DNA was not found in the amplification reactions.

4. Discussion

DMD is the most common lethal neuromuscular genetic disorder in males. There is no effective treat-

ment for the disease, therefore, the determination of carrier status and prenatal diagnosis are of utmost importance for genetic counseling. In Mexico, most medical centers are using pedigree analysis, CPK tests, and Bayesian analysis for statistical prediction

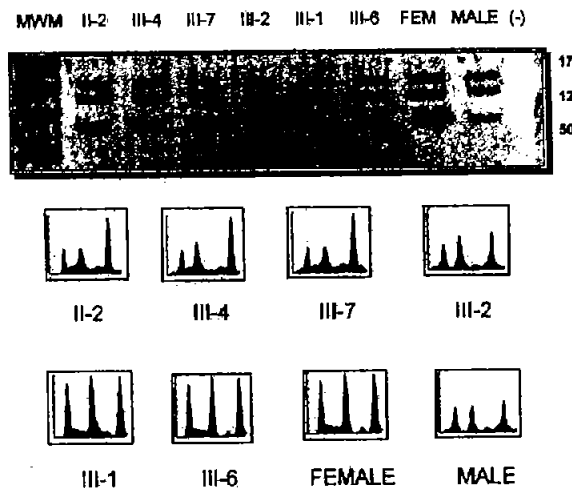


Figure 3. Densitometric analysis is showed, confirming a genetic dosage reduction at 50% of exons 12 and 17 in family members II-2, III-4 and III-7. Genetic dosage was normal for exon 50. Subjects III-1 and III-6 showed normal genetic dosage. Genomic DNA from a normal male and a normal female were used as controls for genetic dosage.

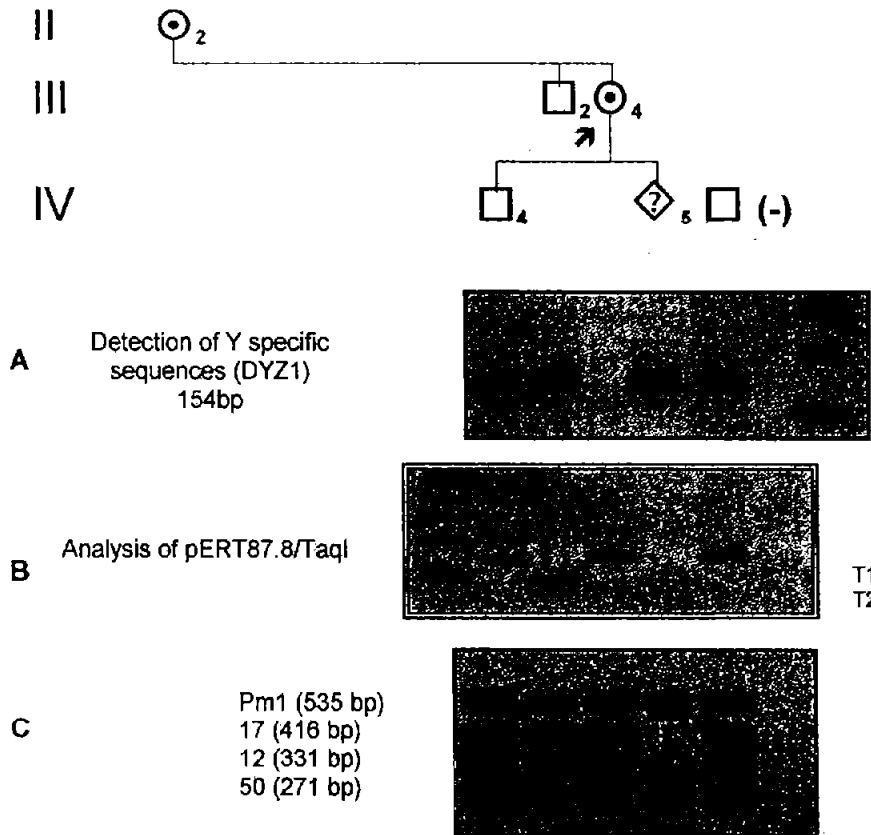


Figure 4. A. Sex determination of the fetus (IV-5). The presence of DYZ1 sequences indicates a male product. B. Amplification and restriction analysis of the intragenic marker involved in the family's deletion, demonstrates that the male product is affected by the same deletion. C. Further amplification by multiplex PCR of deleted and non-deleted exons in females relatives, confirms the deletion in the male fetus.

of carrier status [3]. Advances in molecular studies have allowed the characterization of mutations responsible for DMD and the accurate identification of female carriers, as well as prenatal diagnosis. Although linkage analysis is a common approach for carrier detection, there are several limitations of its use: a) there is a high recombination rate within the gene (12%); b) the carrier status of mothers of isolated cases, can only be determined if they are carriers of an intragenic deletion polymorphism; c) the carrier status of females in families where all affected DMD males are deceased, can only be determined if they bear an intradeletion polymorphism, or if they have a normal brother or son for identification of the normal allele.

Recently, techniques such as quantitative Southern blot and QM-PCR have been used successfully to quantify gene dosage for the direct identification of gene deletion/duplication carriers [12, 15]. Previously, we have reported the identification of deletions in index cases by M-PCR, as well as the discrimination

between carriers and normal females by QM-PCR [2]. In the DMD family reported herein, all affected males were deceased; however, the probanda's mother was an obligate carrier and a normal brother was alive (*figure 1*), suggesting that it would be possible to define the normal allele by linkage analysis. However in this family, the probanda's mother appeared to be non-informative for both polymorphisms used and consequently the normal brother's analysis was not useful. On the other hand, the loss of the maternal *TaqI* polymorphism in the probanda and in one of her sisters (*figure 2*) suggested several options: a) non-maternity, that was discarded by confidential and direct interrogation, b) uniparental disomy, as a rare genetic aberration occurring in both sisters; however, they did not show any clinical manifestation as has been reported in other cases [16], and c) a deletion involving the polymorphic sites. The presence of the deletion was confirmed by QM-PCR and densitometric analysis in the mother, the probanda and her sister,

by amplifying exons (12 and 17) which flank both polymorphisms (figure 3). These results allowed us, unequivocally, to establish the carrier status in each family member and to give accurate genetic counseling. Once these results were obtained, prenatal diagnosis was done in a fetus aged 14 weeks, leading to the diagnosis of a male affected with DMD (figure 4). We want to emphasize that in spite of adverse situations, such as the absence of living affected males, a careful molecular evaluation of all DMD families may lead to carrier detection and prenatal diagnosis.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Asociación Mexicana de Fibrosis Quística and CONACYT 30714-M for the financial support provided. Alcántara MA, thanks the financial grant provided by Direction for Postgraduate Studies of the National University of Mexico.

References

- [1] Abbs S., Bobrow M., Analysis of quantitative PCR for the diagnosis of deletion and duplication carriers in the dystrophin gene. *J. Med. Genet.* 29 (1992) 191–196.
- [2] Alcántara M.A., Villarreal M.T., Del Castillo V., Gutiérrez G., Saldaña Y., Maulén I., Lee R., Macías M., Orozco L., High frequency of *de novo* deletions in mexican Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. Implications for genetic counseling. *Clin. Genet.* 55 (1999) 376–380.
- [3] Álvarez L.M., Ortiz J.D.M., Narro J.A., Solís A.J.G., Morales A.A., Evaluación de la actividad de la creatinofosfocinasa (CPK) para la detección de portadoras de distrofia muscular tipo Duchenne en familias de la ciudad de Monterrey, México. *Rev. Invest. Clin.* 42 (1990) 39–45.
- [4] Banerjee M., Verma I.C., Are there ethnic differences in deletions in the dystrophin gene? *Am. J. Med. Genet.* 68 (1997) 152–157.
- [5] Beggs A.H., Koenig M., Boyce F.M., Kunkel L.M., Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum. Genet.* 86 (1990) 45–61.
- [6] Bonilla E., Schmidt B., Samitt C.E., Miranda A.F., Hays A.P., De Oliveira A.B.S., Chang H.W., Servidei S., Ricci E., Younger D.S., Dimauro S., Normal and dystrophin-deficient muscle fibers in carriers of the gene for Duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Pathol.* 133 (1988) 440–445.
- [7] Calvano S., Memeo E., Piemontese M.R., Melchionda S., Bisceglia L., Gasparini P., Zelante L., Detection of dystrophin deletion carriers using FISH analysis. *Clin. Genet.* 52 (1997) 17–22.
- [8] Chakraborty R., Zhong Y., De Andrade M., Clemens P.R., Fenwick R.G., Caskey C.T., Linkage disequilibrium among (CA)*n* polymorphisms in the human dystrophin gene and their implications in carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Genomics* 21 (1994) 567–570.
- [9] Hoffman E.P., Brown K.H., Kunkel L.M., Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51 (1987) 917–928.
- [10] Ivinson A.J., Taylor G.R., PCR in genetic diagnosis: Sex determination, in: McPherson M.J., Quirke P., Taylor G.R. (Eds.), PCR. A Practical Approach. The Practical Approach Series, IRL Press, Oxford University Press, New York, 1991, pp. 18–20.
- [11] Laing N.G., Molecular genetics and genetic counseling for Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Mol. Cell Biol. Hum. Dis. Ser. 3* (1993) 37–84.
- [12] Mansfield E.S., Robertson J.M., Lebo R.V., Lucero M.Y., Maynard P.E., Rappaport E., Parrella T., Sartore M., Surrey S., Fortina P., Duchenne/Becker muscular dystrophy carrier detection using quantitative PCR and fluorescence-based strategies. *Am. J. Hum. Genet.* 48 (1993) 200–208.
- [13] Oudet C., Hanauer A., Clemens P., Caskey C.T., Mandel J.L., Two hot spots of recombination in the DMD-gene correlate with the deletion prone regions. *Hum. Mol. Genet.* 1 (1992) 599–603.
- [14] Perlin M.W., Burks M.B., Hoop R.C., Hoffman E.P., Toward fully automated genotyping: allele assignment, pedigree construction, phase determination, and recombination detection in DMD. *Am. J. Hum. Genet.* 55 (1994) 777–787.
- [15] Prior T.W., Friedman K.J., Highsmith W.E., Perry T.R., Silvermann L.M., Molecular probe protocol for determining carrier status in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Clin. Chem.* 36 (1990) 441–445.
- [16] Quan F., Janas J., Toth-Fejel S., Johnson D.B., Wolford J.K., Popovich B.W., Uniparental disomy of the entire X chromosome in a female with Duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 60 (1997) 160–165.
- [17] Roberts R., Cole C., Hart K., Bobrow M., Rapid carrier and prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Nucleic Ac. Res.* 17 (1989) 811–817.
- [18] Roberts R.G., Barby T.F., Manners E., Bobrow M., Bentley D.R., Direct detection of dystrophin gene rearrangements by analysis of dystrophin mRNA in peripheral blood lymphocytes. *Am. J. Hum. Genet.* 49 (1991) 298–299.
- [19] Roberts R.G., Dystrophin, its gene, and the dystrophinopathies. *Adv. Genet.* 33 (1995) 177–231.
- [20] Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., Isolation of DNA from Mammalian Cells: Protocol 1. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd Edition. Book 2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 1989, pp. 9.14–9.19.
- [21] Sinha S., Mishra S., Singh V., Mittal R.D., Mittal B., High frequency of new mutations in North Indian Duchenne/Becker muscular dystrophy patients. *Clin. Genet.* 50 (1996) 327–331.

BIBLIOGRAFÍA

1. The X-linked muscular dystrophies. Worton RG. Part 19, Chap. 140. In: The metabolic and molecular bases of inherited disease. Scriver CHR, Beaudet AL, Sly WS (editors). (Vol.III). 7th. Ed. McGraw Hill Inc. 1995.
2. Berardinelli A, Gorni K, Orcesi S, Tagliabue A, Uggetti C, Lanzi G. Dystrophinopathies: peculiar clinical and laboratory aspects. *Funct Neurol.* 2001;16(4 Suppl): 255-62.
3. Bushby KMD. The muscular dystrophies. *Baillière's Clin. Neurol.* 1994; 3:407-430.
4. Finsterer J, Stollberger C. The heart in human dystrophinopathies. *Cardiology.* 2003; 99(1):1-19.
5. Mehler MF. Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000;32(1):277-307.
6. Vainzof M, Passos-Bueno MR, Takata RI, Pavanello Rde C, Zatz M. Intrafamilial variability in dystrophin abundance correlated with difference in the severity of the phenotype. *J Neurol Sci.* 1993 Oct;119(1):38-42.
7. Kakulas BA. The differential diagnosis of the human dystrophinopathies and related disorders. *Curr Opin Neurol.* 1996 Oct;9(5):380-8.
8. Jones KJ, North KN. Recent advances in diagnosis of the childhood muscular dystrophies. *J. Paediatr. Child Health.* 1997; 33:195-201.
9. Samaha FJ, Quinlan JG. Dystrophinopathies: Clarification and complication. *J. Child Neurol.* 1996; 11:13-20.
10. Holding C, Bentley D, Roberts R, Bobrow M, Mathew Ch. Development and validation of laboratory procedures for preimplantation diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. *J. Med. Genet.* 1993; 30:903-9.
11. Brook J, McCurrach M, Harley M. Molecular basis of myotonic dystrophy expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 1992; 68:799-808.
12. Voit T. Congenital muscular dystrophies: 1997 update. *Brain Dev.* 1998; 20:65-74.
13. Gilbert JR, Stajich JM, Wall S, Carter SC, Qui H, Vance JM, Stewart CS, Speer MC, Pufky J, Yamaoka LH, Rozear M, Samson F, Fardeau M, Roses AD, Pericak-Vance MA. Evidence for heterogeneity in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 1992; 2:26-32.
14. Hoffman EP, Clemens PR. HyperCKemic, proximal muscular dystrophies and the dystrophin membrane cytoskeleton, including dystrophinopathies, sarcoglycanopathies, and merosinopathies. *Curr Opin Rheumatol.* 1996 Nov;8(6):528-38.
15. Teijeira-Bautista S, Garcia-Garcia D, Teijeiro-Ferreira A, Fernandez-Hojas R, Fernandez-Rodriguez JM, Navarro-Fernandez-Balbuena C. Dystrophinopathies, congenital muscular dystrophy, limb-girdle dystrophies: updated classification. *Rev Neurol.* 1998 Jun;26(154):1021-6.
16. Angelini C, Fanin M, Freda MP, Duggan DJ, Siciliano G, Hoffman EP. The clinical spectrum of sarcoglycanopathies. *Neurology.* 1999 Jan 1;52(1):176-9.
17. Jones KJ, Kim SS, North KN. Abnormalities of dystrophin, the sarcoglycans, and laminina alpha2 in the muscular dystrophies. *J. Med. Genet.* 1998; 35:379-86.
18. Manole E. Immunohistochemistry in the diagnosis of dystrophinopathies. *Rom J Neurol Psychiatry.* 1995 Jan-Mar;33(1):51-5.
19. Navarro C. Western blotting in the diagnosis of dystrophinopathies. *Rev Neurol.* 1995;23 Suppl 3:S401-3.
20. Samaha FJ, Quinlan JG. Myalgia and cramps: Dystrophinopathy with wide-ranging laboratory findings. *J. Child Neurol.* 1996; 11:21-4.
21. Gospe SM, Lazaro RP, Lava NS. Familial X-linked myalgia and cramps: A non progressive myopathy associated with a deletion in the dystrophin gene. *Neurology* 1989; 39:1277-80.
22. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF (editors). *Thompson & Thompson Genetics in Medicine.* In: Genetic Variation in Individuals: Mutation and Polymorphism. Chap. 6. pp. 79-94. Prenatal Diagnosis. Chapt. 18. pp. 359-374. 6th. Ed. W.B. Saunders Company. 2001.
23. Haldane JBS. The rate of spontaneous mutation of a human gene. *J. Genet.* 1935; 31:317-26.
24. Towbin JA, Hejtmanick JF, Brink P, Gelb B, Zhu XM, Chamberlain JS, McCabe ER, Swift M. X-linked dilated cardiomyopathy. Molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus. *Circulation.* 1993 Jun;87(6):1854-65.
25. Bhattacharyya KB, Basu N, Ray TN, Maity B. Profile of electrocardiographic changes in Duchenne muscular dystrophy. *J. Indian Med. Assoc.* 1997; 95:40-2.
26. Sasaki K, Sakata K, Kachi E, Hirata S, Ishihara T, Ishikawa K. Sequential changes in cardiac structure and function in patients with Duchenne type muscular dystrophy: a two-dimensional echocardiographic study. *Am. Heart J.* 1998; 135 (6 Pt 1): 937-44.
27. Farrell PT. Anaesthesia-induced rhabdomyolysis causing cardiac arrest: case report and review of anaesthesia and the dystrophinopathies. *Anaesth Intensive Care.* 1994 Oct;22(5):597-601.
28. 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.
29. Martin JJ, Ceuterick C, Lubke U, Van Broeckhoven C. Duchenne muscular dystrophy immunohistochemistry of foetal muscles. *Acta Neurol Belg.* 1993;93(3):130-8.
30. Wilichowski E, Krawczak M, Seemanova E, Hanefeld F, Schmidtke J. Genetic linkage study between the loci for Duchenne and Becker muscular dystrophy and nine X-chromosomal DNA markers. *Hum Genet.* 1987 Jan;75(1):32-40.

31. Dorkins H, Junien C, Mandel JL, Wrogemann K, Moison JP, Martinez M, Old JM, Bunday S, Schwartz M, Carpenter N. Segregation analysis of a marker localised Xp21.2-Xp21.3 in Duchenne and Becker muscular dystrophy families. *Hum Genet.* 1985;71(2):103-7.
32. Fadda S, Mochi M, Roncuzzi L, Sangiorgi S, Sbarra D, Zatz M, Romeo G. Definitive localization of Becker muscular dystrophy in Xp by linkage to a cluster of DNA polymorphisms (DXS43 and DXS9). *Hum Genet.* 1985;71(1):33-6.
33. Mostacciuolo ML, Miorin M. Reappraisal of the incidence rate of Duchenne and Becker muscular dystrophies on the basis of molecular diagnosis. *Neuroepidemiology* 1993; 12(6):326-30.
34. Saito M, Kawai H, Akaike M, Adachi K, Nishida Y, Saito S. Cardiac dysfunction with Becker muscular dystrophy. *Am Heart J.* 1996 Sep;132(3):642-7.
35. Arikawa E, Hoffman EP, Kaido M. The frequency of patients with dystrophin abnormalities in a limb-girdle patient population. *Neurology* 1991; 41:1491-6.
36. Brooke MH, Fenichel GM, Griggs RC, Mendell JR, Moxley R, Miller JP, Province MA. Clinical investigation in Duchenne dystrophy: 2. Determination of the "power" of therapeutic trials based on the natural history. *Muscle Nerve* 1983; 6:91-103.
37. Marian AJ, Roberts R. Molecular basis of hypertrophic and dilated cardiomyopathy. *Tex Heart Inst J.* 1994;21(1):6-15.
38. Nagano A, Koga R, Ogawa M. Emerin deficiency at the nuclear membrane in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nature Genet.* 1996; 12:254-59.
39. Manilal S, Man N, Sewry C. The Emery-Dreifuss muscular dystrophy protein, emerin, is a nuclear membrane protein. *Hum. Molec. Genet.* 1996; 5:801-8.
40. Bione S, Small K, Aksmanovic VMA. Identification of new mutations in the Emery-Dreifuss muscular dystrophy gene and evidence for genetic heterogeneity in the disease. *Hum. Mol. Genet.* 1995, 1859-1863.
41. Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T, Meng G, Muller CR, Lindlof M, Kaariainen H. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet.* 1989 Oct;45(4):498-506.
42. Roberts RG. Dystrophin, its gene, and the dystrophinopathies. *Adv Genet.* 1995;33:177-231.
43. Emery AEH, Morton R. Genetic counselling in lethal X-linked disorders. *Acta Genet (Basel)* 1968; 18:534-42.
44. Caskey CT, Nussbaum RL, Cohan LC, Pollack L. Sporadic occurrence of Duchenne muscular dystrophy: evidence for new mutation. *Clin. Genet.* 1980; 18:329-41.
45. 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.
46. 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(5): 376-80.
47. Nicholson LVB, Johnson MA, Bushby KMD, Gardner-Medwin D, Curtis A, Ginjaar HB, Den Dunnen JT, Welch JL, Butler TJ, Bakker E, Van Ommen GJB, Harris JB. Integrated study of 100 patients with Xp21 linked muscular dystrophy using clinical, genetic, immunochemical, and histopathological data. I. Trends across the clinical groups. *J. Med. Genet.* 1993; 30:728-736.
48. Nicholson LVB, Johnson MA, Bushby KMD, Gardner-Medwin D, Curtis A, Ginjaar HB, Den Dunnen JT, Welch JL, Butler TJ, Bakker E, Van Ommen GJB, Harris JB. Integrated study of 100 patients with Xp21 linked muscular dystrophy using clinical, genetic, immunochemical, and histopathological data. II. Correlations within individual patients. *J. Med. Genet.* 1993; 30:737-744.
49. Voit T, Neuen-Jacob E, Mahler V, Jauch A, Cremer M. Somatic mosaicism for a deletion of the dystrophin gene in a carrier of Becker muscular dystrophy. *Eur J Pediatr.* 1992 Feb;151(2):112-6.
50. Bunyan DJ, Robinson DO, Collins AL, Cockwell AE, Bullman HM, Whittaker PA. Germline and somatic mosaicism in a female carrier of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet.* 1994 May;93(5):541-4.
51. Bunyan DJ, Crolla JA, Collins AL, Robinson DO. Fluorescence in situ hybridisation studies provide evidence for somatic mosaicism in *de novo* dystrophin gene deletions. *Hum. Genet.* 1995; 95:43-5.
52. Covone AE, Lerone M, Romeo G. Genotype-phenotype correlation and germline mosaicism in DMD/BMD patients with deletions of the dystrophin gene. *Hum Genet.* 1991 Jul;87(3):353-60.
53. Melis MA, Cau M, Congiu R, Puddu, Muntoni F, Cao A. Germinal mosaicism in a Duchenne muscular dystrophy family: implications for genetic counselling. *Clin. Genet.* 1993; 43:247-9.
54. Passos-Bueno MR, Bakker E, Kneppers ALJ, Takata RI, Rapaport D, Den Dunnen JT, Zatz M, Van Ommen GJB. Different mosaicism frequencies for proximal and distal Duchenne muscular dystrophy (DMD) mutations indicate difference in etiology and recurrence risk. *Am. J. Hum. Genet.* 1992; 51:1150-1155.
55. Bakker E, Van Broeckhoven C, Bonten EJ, Van De Vooren MJ, Veenema H, Van Hul W, Van Ommen GJB, Vandenberghe A, Pearson PL. Germline Mosaicism and Duchenne Muscular Dystrophy mutations. *Nature* 1987; 329:554-556.
56. Bakker E, Veenema H, Den Dunnen JT, Van Broeckhoven C, Grootsholten PM, Bonten EJ, Van Ommen GJB, Pearson PL. Germinal mosaicism increases the recurrence risk for "new" Duchenne muscular dystrophy mutations. *J. Med. Genet.* 1989; 26:553-559.
57. Wilton, S.D., Chandler, D.C., Kakulas, B.A., and Laing, N.G. (1994). Identification of a point mutation and germinal mosaicism in a Duchenne muscular dystrophy family. *Hum. Mutat.* 3:133-140.
58. Van Essen AJ, Abbs S, Baiget M, Bakker E, Boiteau C, Van Broeckhoven C, Bushby KMD, Clarke A, Claustres M, Covone AE, Ferrari M, Ferlini A, Galluzzi G, Grimm T, Grubben C, Jeanpierre M, Kaariainen H, Liechti-Gallati S, Melis

- MA, Van Ommen GJB, Poncin JE, Scheffer H, Schwartz M, Speer A, Stuhmann M, Verellen-Dumoulin C, Wilcox DE, Ten Kate LP. Parental origin and germline mosaicism of deletions and duplications of the dystrophin gene: a European study. *Hum. Genet.* 1992; 88:249-257.
59. Hausmanowa-Petrusewicz I, Fidzianska A, Niebroj-Dobosz I, Dorobek M, Bojakowski J. Dystrophinopathies in females. *Folia Neuropathol.* 2000;38(1):7-12.
 60. Bjerglund Nielsen L, Nielsen IM. Turner's syndrome and Duchenne muscular dystrophy in a girl with an X; autosome translocation. *Ann Genet.* 1984;27(3):173-7.
 61. Glass IA, Nicholson LV, Watkiss E, Johnson MA, Roberts RG, Abbs S, Brittain-Jones S, Boddie HG. Investigation of a female manifesting Becker muscular dystrophy. *J Med Genet.* 1992 Aug;29(8):578-82.
 62. Bodrug SE, Ray PN, Gonzalez IL, Schmickel RD, Sylvester JE, Worton RG. Molecular analysis of a constitutional X-autosome translocation in a female with muscular dystrophy. *Science.* 1987 Sep 25;237(4822):1620-4.
 63. Bodrug SE, Holden JJA, Ray PN, Worton RG. Molecular analysis of X-autosome translocations in females with Duchenne muscular dystrophy. *EMBO J.* 1991; 10:3931-9.
 64. Gomez MR, Engel AG, Dewald G, Peterson HA. Failure of inactivation of Duchenne dystrophy X-chromosome in one of female identical twins. *Neurology* 1977; 27:537-42.
 65. Azofeifa J, Voit T, Hubner C, Cremer M. X-chromosome methylation in manifesting and healthy carriers of dystrophinopathies: concordance of activation ratios among first degree female relatives and skewed inactivation as cause of the affected phenotypes. *Hum Genet.* 1995 Aug;96(2):167-76.
 66. Yoshioka M, Yorifuji T, Mituyoshi I. Skewed X inactivation in manifesting carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Clin. Genet.* 1998; 52:102-7.
 67. Quan F, Janas J, Toth-Fejel S, Johnson DB, Wolford JK, Popovich BW. Uniparental disomy of the entire X chromosome in a female with Duchenne Muscular dystrophy. *Am.J.Hum.Genet.* 1997; 60:160-5.
 68. Lupski JR, Garcia CA, Zoghbi HY, Hoffman EP, Fenwick RG. Discordance of muscular dystrophy in monozygotic female twins: evidence supporting asymmetric splitting of the inner cell mass in a manifesting carrier of Duchenne dystrophy. *Am J Med Genet.* 1991 Sep 1;40(3):354-64.
 69. Malapert D, Recan D, Leturcq F, Degos JD, Gherardi RK. Sporadic lower limb hypertrophy and exercise induced myalgia in a woman with dystrophin gene deletion. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1995 Nov;59(5):552-4.
 70. Bonilla E, Schmidt B, Samitt CE, Miranda AF, Hays AP, de Oliveira ABS, Chang HW, Servidei S, Ricci E, Younger DS, Dimauro S. Normal and dystrophin-deficient muscle fibers in carriers of the gene for Duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Pathol.* 1988; 133:440-445.
 71. Bushby K, Goodship JA, Nicholson LVB. Variability in clinical, genetic and protein abnormalities in manifesting carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscular Disord.* 1993; 3:57-64.
 72. Swery C, Sansome A, Clerk A. Manifesting carriers of Xp21 muscular dystrophy: lack of correlation between dystrophin expression and clinical weakness. *Neuromusc. Disord.* 1993; 3:65-70.
 73. Chevron MP, Tuffery S, Echenne B, Demaille J, Claustres M. Becker muscular dystrophy: demonstration of the carrier status of a female by immunoblotting and immunostaining. *Neuromusc. Disord.* 1992; 2:47-50.
 74. 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.
 75. Politano L, Nigro V, Nigro G, Petretta VR, Passamano L, Papparella S, Di Somma S, Comi LI. Development of cardiomyopathy in female carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophies. *JAMA.* 1996 May 1;275(17):1335-8.
 76. Hoogerwaard EM, van der Wouw PA, Wilde AA, Bakker E, Ippel PF, Oosterwijk JC, Majoor-Krakauer DF, van Essen AJ, Leschot NJ, de Visser M. Cardiac involvement in carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 1999 Jul;9(5):347-51.
 77. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell.* 1987 Jul 31;50(3):509-17.
 78. Darras BT, Koenig M, Kunkel LM, Francke U. Direct method for prenatal diagnosis and carrier detection in Duchenne/Becker muscular dystrophy using the entire dystrophin cDNA. *Am J Med Genet.* 1988 Mar;29(3):713-26.
 79. Monaco AP, Kunkel LM. Cloning of the Duchenne/Becker muscular dystrophy locus. *Adv Hum Genet.* 1988;17:61-98.
 80. Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM. Dystrophin, the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987; 51:919-928.
 81. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell.* 1988 Apr 22;53(2):219-26.
 82. Miller G, Wessel HB. Diagnosis of dystrophinopathies: review for the clinician. *Pediatr Neurol.* 1993 Jan-Feb;9(1):3-9.
 83. Jacobs PA, Hunt PA, Mayer M, Bart RD. Duchenne muscular dystrophy (DMD) in a female with an X/autosome translocation: further evidence that the DMD locus is at Xp21. *Am J Hum Genet.* 1981 Jul;33(4):513-8.
 84. Emanuel BS, Zackai EH, Tucker SH. Further evidence for Xp21 location of Duchenne muscular dystrophy (DMD) locus: X;9 translocation in a female with DMD. *J Med Genet.* 1983 Dec;20(6):461-3.
 85. Verellen-Dumoulin C, Freund M, De Meyer R, Laterre C, Frederic J, Thompson MW, Markovic VD, Worton RG. Expression of an X-linked muscular dystrophy in a female due to translocation involving Xp21 and non-random inactivation of the normal X chromosome. *Hum Genet.* 1984;67(1):115-9.

86. 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; 23:538-47.
87. 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.
88. den Dunnen JT. Reconstruction of the 2.4 Mb human DMD gene by homologous YAC recombination. *Hum. Mol. Genet.* 1992; 12:474-82.
89. Monaco AP, Walker AP, Millwood I, Larin Z, Lehrach H. A yeast artificial chromosome contig containing the complete Duchenne muscular dystrophy gene. *Genomics.* 1992;12(3):465-73.
90. 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; 10:193-205.
91. 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.
92. 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.
93. Bamea E, Zuk D, Simantov R, Nudel U, Yaffe D. Specificity of expression of the muscle and brain dystrophin gene promoters in muscle and brain cells. *Neuron* 1990; 5:881-888.
94. Holder, E., Maeda, M., and Bies, R.D. (1996). Expression and regulation of the dystrophin Purkinje promoter in human skeletal muscle, heart, and brain. *Hum. Genet.* 97:232-239.
95. Sarig R, Mezger-Lallemand V, Gitelman I, Davis C, Fuchs O, Yaffe D, Nudel U. Targeted inactivation of Dp71, the major non-muscle product of the DMD gene: differential activity of the Dp71 promoter during development. *Hum Mol Genet.* 1999 Jan;8(1):1-10.
96. Moizard MP, Billard C, Toutain A, Berret F, Marmin N, Moraine C. Are Dp71 and Dp140 brain dystrophin isoforms related to cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy?. *Am J Med Genet.* 1998 Oct 30;80(1):32-41.
97. Napierala D, Slomski R. Regulation of human DMD gene expression. An example of multiple utilization of genetic information. *Postepy Biochem.* 1998;44(1):48-55.
98. D'Souza VN, Nguyen TM, Morris GE, Karges W, Pillers DA, Ray PN. A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Hum Mol Genet.* 1995 May;4(5):837-42.
99. Roberts RG, Coffey AJ, Bobrow M, Bentley DR. Exon structure of the human dystrophin gene. *Genomics* 1993; 16:536-538.
100. Nobile C, Marchi J, Nigro V, Roberts RG, Danieli GA. Exon-intron organization of the human dystrophin gene. *Genomics* 1997;45(2):421-4.
101. Tennyson CN, Klamut HJ, Worton RG. The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced. *Nat. Genet.* 1995; 9:184-190.
102. Small JV, Fürst DO, Thomell LE. The cytoskeletal lattice of muscle cells. *Eur. J. Biochem.* 1992; 208:559-72.
103. Roberts RG. Dystrophins and dystrobrevins. *Genome Biol.* 2001; 2(4) reviews3006.1-7.
104. Ervasti JM, Campbell KP. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as transmembrane linker between laminin and actin. *J. Cell Biol.* 1993; 122:809-823.
105. Roberts RG, Bobrow M. Dystrophins in vertebrates and invertebrates. *Hum Mol Genet.* 1998 Apr;7(4):589-95.
106. Khurana TS, Hoffman EP, Kunkel LM. Identification of a chromosome 6-encoded dystrophin-related protein. *J Biol Chem.* 1990; 265(28):16717-20.
107. Minetti C, Beltrame F, Marcenaro G, Bonilla E. Dystrophin at the plasma membrane of human muscle fibers shows a costameric localization. *Neuromusc. Disord.* 1992; 2:99-109.
108. Campbell KP. Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 1995; 80:675-679.
109. Brown RH. Dystrophin-associated proteins and the muscular dystrophies. *Ann. Rev. Biomed. Reviews.* 1997; 48:457-66.
110. Venema VJ, Ju H, Zou R, Venema RC. Interaction of neuronal nitric oxide synthase with caveolin-3 in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 1997; 45:28187-28190.
111. Worton RG. Muscular dystrophies: diseases of the dystrophin-glycoprotein complex. *Science* 1995; 270:755-756.
112. Vainzof M, Passos-Bueno MR, Canovas M, Moreira ES, Pavanello RCM, Marie SK, Anderson LVB, Bonnemann CG, McNally EM, Nigro V, Kunkel LM, Zatz M. The sarcoglycan complex in the six autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Hum. Mol. Genet.* 1996; 5:1963-1969.
113. van Der Kooij AJ, Barth PG, Busch HFM, De Haan R, Ginjaar HB, Van Essen AJ, Van Hooff LJMA, Howeler CJ, Jennekens FGI, Jongen P, Oosterhuis HJGH, Padberg GWAM, Spaans F, Wintzen A, Wokke JHJ, Bakker E, Van Ommen GJB, Bolhuis PA, De Visser M. The clinical spectrum of Limb Girdle Muscular Dystrophy: a survey in the Netherlands. *Brain* 1996; 119:1471-1480.
114. Duggan DJ, Gorospe JR, Fanin M, Hoffman EP, Angelini C. Mutations in the sarcoglycan genes in patients with myopathy. *N. Engl. J. Med.* 1997; 336:618-624.
115. Ozawa E, Noguchi S, Mizuno Y, Hagiwara Y, Yoshida M. From dystrophinopathy to sarcoglycanopathy: evolution of a concept of muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 1998; 21:421-38.
116. McNally EM, Sá Moreira E, Duggan DJ, Bönnemann CG, Lisanti MP, Lidov HGW, Vainzof M, Passos-Bueno MR, Hoffman EP, Zatz M, Kunkel LM. Caveolin-3 in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 1998; 7:871-7.
117. Petrof BJ. The molecular basis of activity-induced muscle injury in Duchenne muscular dystrophy. *Mol. Cell Biochem.* 1998; 179:111-23.

118. Yamazaki M, Minota S, Sakurai H, Miyazono K, Yamada A, Kanazawa I, Kawai M. Expression of transforming growth factor- β 1 and its relation to endomysial fibrosis in progressive muscular dystrophy. *Am. J. Pathol.* 1994; 144:221-6.
119. Bulman DE, Gordon ME, Zubrzycka-Gaarn EE, Worton RG, Ray PN. Differentiation of Duchenne and Becker muscular dystrophy phenotypes with amino- and carboxy-terminal antisera specific for dystrophin. *Am. J. Hum. Genet.* 1991; 48:295-304.
120. Vainzof M, Takata RI, Passos-Bueno MR, Pavanello RCM, Zatz M. Is the maintenance of the C-terminus domain of dystrophin enough to ensure a milder Becker muscular dystrophy phenotype? *Hum. Mol. Genet.* 1993; 2:39-42.
121. Voit, T., Stuetzgen, P., Cremer, M., and Goebel, H.H. (1991). Dystrophin as a diagnostic marker in Duchenne and Becker muscular dystrophy. Correlation of immunofluorescence and Western blot. *Neuropediatr.* 22:152-162.
122. Nicholson LV, Johnson MA, Gardner MD, Bhattacharya S, Harris JB. Heterogeneity of dystrophin expression in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Acta Neuropathol.* 1990; 80:239-52.
123. Takeshima Y, Nishio H, Narita N, Wada MD, Ishikawa Y, Ishikawa Y, Minami R, Nakamura H, Matsuo M. Amino-terminal deletion of 53% of dystrophin results in an intermediate Duchenne-Becker muscular dystrophy phenotype. *Neurology* 1994; 44:1648-51.
124. Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 1988; 2:90-95.
125. Chelly J, Gilgenkrantz H, Lambert M, Hamard G, Chafey P, Recan D, Katz P, De la Chapelle A, Koenig M, Ginjaar HB, Fardeau M, Tome F, Kahn A, Kaplan JC. Effect of dystrophin gene deletions on mRNA levels and processing in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Cell* 1990; 63:1239-1248.
126. Roberts RG, Barby TFM, Manners E, Bobrow M, Bentley DR. Direct detection of dystrophin gene rearrangements by analysis of dystrophin mRNA in peripheral blood lymphocytes. *Am. J. Hum. Genet.* 1991; 49:298-310.
127. Winnard AV, Klein ChJ, Coover 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.
128. Chelly J, Gilgenkrantz H, Hugnot JP, Hamard G, Lambert M, Récan D, Akli S, Cometto M, Kahn A, Kaplan JC. Illegitimate transcription. Application to the analysis of truncated transcripts of the dystrophin gene in nonmuscle cultured cells from Duchenne and Becker patients. *J. Clin. Invest.* 1991; 88:1161-6.
129. Prior TW, Bartolo C, Papp AC, Snyder PJ, Sedra MS, Burghes AHM, Kissel JT, Luquette MH, Tsao CY, Mendell JR. Dystrophin expression in a Duchenne muscular dystrophy patient with a frame shift deletion. *Neurology* 1997; 48:486-8.
130. Uchino M, Miike T, Iwashita H, Uyama E, Yoshioka K, Sugino S, Ando M. PCR and immunoblot analyses of dystrophin in Becker muscular dystrophy. *J. Neurol. Sci.* 1994; 124:225-9.
131. England SB, Nicholson LVB, Johnson MA, Forrest SM, Love DR, Zubrzycka-Gaarn EE, Bulman DE, Harris JB, Davies KE. Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin. *Nature* 1990; 343:180-182.
132. Mirabella M, Galluzi G, Manfredi G, Bertini E, Ricci E, De Leo R, Tonali P, Servidei S. Giant dystrophin deletion associated with congenital cataract and mild muscular dystrophy. *Neurology* 1998; 51:592-5.
133. Fanin M, Duggan DJ, Mostacciuolo ML, Martinello F, Freda MP, Soraru G, Trevisan CP, Hoffman EP, Angelini C. Genetic epidemiology of muscular dystrophies resulting from sarcoglycan gene mutations. *J. Med. Genet.* 1997; 34:973-7.
134. McNally EM, Duggan D, Gorospe JR, Bonnemann CG, Fanin M, Pegoraro E, Lidov HGW, Noguchi S, Ozawa E, Finkel RS, Cruse RP, Angelini C, Kunkel LM, Hoffman EP. Mutations that disrupt the carboxyl terminus of gamma-sarcoglycan cause muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 1996; 5:1841-1847.
135. McNally EM, Passos-Bueno MR, Bonnemann CG, Vainzof M, Moreira ES, Lidov HGW, Ben Othmane K, Denton PH, Vance JM, Zatz M, Kunkel LM. Mild and severe muscular dystrophy caused by a single gamma-sarcoglycan mutation. *Am. J. Hum. Genet.* 1996; 59:1040-1047.
136. Passos-Bueno MR, Moreira ES, Vainzof M, Chamberlain J, Marie SK, Pereira L, Akiyama J, Roberds SL, Campbell KP, Zatz M. A common missense mutation in the adhalin gene in three unrelated Brazilian families with a relatively mild form of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 1995; 4:1163-1167.
137. Piccolo F, Roberds SL, Jeanpierre M, Leturcq F, Azibi K, Beldjord C, Carrie A, Recan D, Chaouch M, Reghis A, El Kerch F, Sefiani A, Voit T, Merlini L, Collin H, Eymard B, Beckmann JS, Romero NB, Tome FMS, Fardeau M, Campbell KP, Kaplan JC. Primary adhalinopathy: a common cause of autosomal recessive muscular dystrophy of variable severity. *Nat. Genet.* 1995; 10:243-5.
138. Allamand V, Sunada Y, Salih MAM, Straub V, Ozo CO, Al-Turaiqi MHS, Akbar M, Kolo T, Colognato H, Zhang X, Soroki LM, Yurchenco PD, Tryggvason K, Campbell KP. Mild congenital muscular dystrophy in two patients with an internally deleted laminin α 2-chain. *Hum. Mol. Genet.* 1997; 6:747-52.
139. Banerjee M, Verma IC. Are there ethnic differences in deletions in the dystrophin gene? *Am. J. Med. Genet.* 1997; 68:152-7.
140. den Dunnen TJ, Grootsholten PM, Bakker E, Blonden LA, Ginjaar HB, Wapenaar MC, van Paassen HM, van Broeckhoven C, Pearson PL, van Ommen GJ. Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *Am. J. Hum. Genet.* 1989; 45:835-47.
141. Prior TW, Bartolo C, Pearl DK, Papp AC, Snyder PJ, Sedra MS, Burghes AH, Mendell JR. Spectrum of small mutations in the dystrophin coding region. *Am. J. Hum. Genet.* 1995; 57:22-33.

142. McCabe ERB, Towbin J, Chamberlain JS, Baumbach LA, Selzer WK, Van Ommen GJB, Kunkel LM, Witkowski J. cDNA probes for the Duchenne muscular dystrophy locus demonstrate a previously undetectable deletion in a patient with dystrophic myopathy, glycerol kinase deficiency and congenital adrenal hypoplasia. *J. Clin. Invest.* 1989; 83:95-99.
143. Cole DE, Clarke LA, Riddell DC, Samson KA, Seltzer WK, Salisbury S. Congenital adrenal hypoplasia, Duchenne muscular dystrophy, and glycerol kinase deficiency: importance of laboratory investigations in delineating a contiguous gene deletion syndrome. *Clin Chem.* 1994;40(11 Pt 1):2099-103.
144. Oudet C, Hanauer A, Clemens P, Caskey CT, Mandel JL. Two hot spots of recombination in the DMD-gene correlate with the deletion prone regions. *Hum. Mol. Genet.* 1992; 1:599-603.
145. Abbs S, Yau SC, Mathew CG, Bobrow M. A convenient multiplex PCR system for the detection of dystrophin gene deletions: a comparative analysis with cDNA hybridisation shows mistypings by both methods. *J. Med. Genet.* 1991; 28:304-311.
146. Pembrey ME. Does unequal crossing over contribute to the mutation rate in Duchenne Muscular Dystrophy? *Am. J. Med. Genet.* 1982; 12:437-441.
147. Tihy F, Fetni R, Malfoy B, Vogt N, Dutrillaux B, Lemieux N. Non-uniform chromatin condensation on chromosomes: comparison of different loci by two-color FISH. *Am. J. Hum. Genet.* 1995; 55:A120.
148. Grimm T, Meng G, Liechti-Gallati S, Bettecken T, Muller CR, Muller B. On the origin of deletions and point mutations in DMD: most deletions arise in oogenesis and most point mutations result from events in spermatogenesis. *J. Med. Genet.* 1994; 31:183-6.
149. Mcnaughton JC, Hughes G, Jones WA, Stockwell PA, Klamut HJ, Petersen GB. The evolution of an intron: analysis of a long, deletion prone intron in the human dystrophin gene. *Genomics* 1997; 40:294-304.
150. Pizzuti A, Pieretti M, Fenwick RG, Gibbs RA, Caskey CT. A transposon-like element in the deletion-prone region of the dystrophin gene. *Genomics* 1992; 13:594-600.
151. Hu XY, Burghes AH, Ray PN, Thompson MW, Murphy EG, Worton RG. Partial gene duplication in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *J Med Genet.* 1988;25(6):369-76.
152. Hu X, Ray PN, Worton RG. Mechanisms of tandem duplication in the Duchenne muscular dystrophy gene include both homologous and nonhomologous intrachromosomal recombination. *EMBO J.* 1991; 10:2471-2477.
153. Roest PAM, Bout M, van der Tuijn AC, Ginjaar IB, Bakker E, Hogervorst FBL, van Ommen GJB, den Dunnen JT. Splicing mutations in DMD/BMD detected by RT-PCR/PTT: detection of a 19 aa insertion in the cysteine rich domain of dystrophin compatible with BMD. *J. Med. Genet.* 1996; 33:935-9.
154. Todorova A, Danielli GA. Large majority of single-nucleotide mutations along the dystrophin gene can be explained by more than one mechanism of mutagenesis. *Hum. Mutat.* 1997; 9:537-47.
155. Roberts RG, Bobrow M, Bentley DR. Point mutations in the dystrophin gene. *PNAS USA* 1992; 89:2331-5.
156. Gardner RJ, Bobrow M, Roberts RG. The identification of point mutations in Duchenne muscular dystrophy patients by using reverse-transcription PCR and the protein truncations test. *Am. J. Hum. Genet.* 1995; 57:311-20.
157. 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.
158. Shashi V, Golden WL, Allinson PS, Blanton SH, von Kap-Herr CH, Kelly TE. Molecular analysis of recombination in a family with Duchenne muscular dystrophy and a large pericentric X chromosome inversion. *Am. J. Hum. Genet.* 1996;58:1231-8.
159. Baxter PS, Maltby EL, Quarrell O. Xp21 muscular dystrophy due to X chromosome inversion. *Neurology* 1997; 49:260.
160. Piccolo F, Jeanpierre M, Leturcq F, Dod C, Azibi K, Toutain A, Merlini L, Jarre L, Navarro C, Krishnamoorthy R, Tom FMS, Urtizberea JA, Beckmann JS, Campbell KP, Kaplan JC. A founder mutation in the gamma-sarcoglycan gene of Gypsies possibly predating their migration out of India. *Hum. Mol. Genet.* 1996; 5:2019-2022.
161. Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics.* 1988;2(1):90-5.
162. Hoffman EP, Kunkel LM, Angelini C, Clarke A, Johnson M, Harris JB. Improved diagnosis of Becker muscular dystrophy by dystrophin testing. *Neurology* 1989; 39:1011-1017.
163. Matsumura K, Nonaka I, Tomé FMS, Arahata K, Collin H, Leturcq F, Récan D, Kaplan JC, Fardeu M, Campbell KP. Mild deficiency of dystrophin-associated proteins in Becker Muscular dystrophy patients having in-frame deletions in the rod domain of dystrophin. *Am J. Hum. Genet.* 1995; 53:409-16.
164. 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.
165. Kunkel LM, Monaco AP, Bertelson CJ, Middlesworth W, Colletti CA, Aldrige J, Fischbeck KH, Bartlett D. Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 1986; 322:73-85.
166. Monaco AP, Bertelson CJ, Middlesworth W, Colletti CA, Aldrige J, Fischbeck KH, Bartlett D, Kunkel LM. Detection of deletions spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA segment. *Nature* 1985; 316:842-8.
167. 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.

168. Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM. Detection of 98% MD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum. Genet.* 1990; 86:45-48.
169. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (editors). PCR protocols: 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.
170. Barbieri AM, Soriani N, Ferlini A, Michelato A, Ferrari M, Carrera P. Seven novel additional small mutations and a new alternative splicing in the human dystrophin gene detected by heteroduplex analysis and restricted RT-PCR heteroduplex analysis of illegitimate transcripts. *Eur. J. Hum. Genet.* 1996; 4:183-187.
171. Roberts RG, Barby TF, Manners E, Bobrow M, Bentley DR. Direct detection of dystrophin gene rearrangements by analysis of dystrophin mRNA in peripheral blood lymphocytes. *Am. J. Hum. Genet.* 1991; 49:298-7.
172. Roberts RG, Bentley DR, Barby TFM, Manners E, Bobrow M. Direct diagnosis of carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy by amplification of lymphocyte RNA. *Lancet* 1990; 336:1523-1526.
173. Lenk U, Demuth S, Kraft U, Hanke R, Speer A. Alternative splicing of dystrophin mRNA complicates carrier determination: report a DMD family. *J. Med. Genet.* 1993; 30:206-9.
174. Prior TW. Perspectives and molecular diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Clin. Lab. Med.* 1995; 15(4):927-41.
175. Laing NG. Molecular genetics and genetic counseling for Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Mol. Cell Biol. Hum. Dis. Ser.* 1993;3:37-84.
176. Gruemer HD, Miller WG, Chinchilli VM. Are reference limits for serum creatine kinase valid in detection of the carrier state for Duchenne muscular dystrophy? *Clin. Chem.* 1984; 30:724-30.
177. Hoffman EP, Pegoraro E, Scacheri P, Burns RG, Taber JW, Weiss L, Blattner P. Genetic counseling of isolated carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Med. Genet.* 1996; 63:573-80.
178. Coral-Vázquez R, Arenas D, Cisneros B, Peñaloza L, Salamanca F, Kofman S, Mercado R, Montañez C. Pattern of deletions of the dystrophin gene in mexican Duchenne/Becker muscular dystrophy patients: the use of new designed primers for the analysis of the major deletion "hot spot" region. *Am. J. Med. Genet.* 1997; 70:240-6.
179. Nigro G, Di Somma S, Comi LI, Politano L, Papparella S, Restucci B, Petretta VR, Guigliano MA, Carotenuto A, Limongelli FM. Structural basis of cardiomyopathy in Duchenne/Becker carriers. *Endomyocardial biopsy evaluation. Ann. NY Acad. Sci.* 1995; 752:108-10.
180. Roberts R, Cole C, Hart K, Bobrow M. Rapid carrier and prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Nucleic Ac. Res.* 1989; 17:811-7.
181. Chakraborty R, Zhong Y, de Andrade M, Clemens PR, Fenwick RG, Caskey CT. Linkage disequilibria among (CA)_n polymorphisms in the human dystrophin gene and their implications in carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Genomics* 1994; 21:567-70.
182. Clemens PR, Fenwick RG, Chamberlain JS, Gibbs RA, De Andrade M, Chakraborty R, Caskey CT. Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy families, using dinucleotide repeat polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 1991; 49:951-960.
183. Oudet C, Heilig R, Hanauer A, Mandel JL. Nonradioactive assay for new microsatellite polymorphisms at the 5' end of the dystrophin gene, and estimation of intragenic recombination. *Am. J. Hum. Genet.* 1991; 49:311-319.
184. Abbs S, Roberts RG, Mathew CG, Bentley DR, Bobrow M. Accurate assessment of intragenic recombination frequency within the Duchenne muscular dystrophy gene. *Genomics* 1990; 7:602-606.
185. Perlin MW, Burks MB, Hoop RC, Hoffman EP. Toward fully automated genotyping: allele assignment, pedigree construction, phase determination, and recombination detection in DMD. *Am. J. Hum. Genet.* 1994; 55:777-87.
186. Prior TW, Friedman KJ, Highsmith WE, Perry TR, Silvermann LM. Molecular probe protocol for determining carrier status in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Clin. Chem.* 1990; 36:441-5.
187. Abbs S, Bobrow M. Analysis of quantitative PCR for the diagnosis of deletion and duplication carriers in the dystrophin gene. *J. Med. Genet.* 1992; 29:191-6.
188. Yau SC, Bobrow M, Mathew CG, Abbs S. Accurate diagnosis of carriers of deletions and duplications in Duchenne/Becker muscular dystrophy by fluorescent dosage analysis. *J Med Genet* 1996; 33:550-558.
189. Mansfield ES, Robertson JM, Lebo RV, Lucero MY, Maynard PE, Rappaport E, Parrella T, Sartore M, Surrey S, Fortina P. Duchenne/Becker muscular dystrophy carrier detection using quantitative PCR and fluorescence-based strategies. *Am. J. Hum. Genet.* 1993; 48:200-8.
190. Pastore L, Caporaso MG, Frissio G, Orsini A, Santoro L, Sacchetti L, Salvatore F. A quantitative polymerase chain reaction (PCR) assay completely discriminates between Duchenne and Becker muscular dystrophy deletion carriers and normal females. *Mol. Cell. Probes* 1996; 10:129-37.
191. Allingham-Hawkins DJ, McGlynn-Steele LK, Brown CA, Sutherland J, Ray PN. Impact of carrier status determination for Duchenne/Becker muscular dystrophy by computer-assisted laser densitometry. *Am. J. Med. Genet.* 75:171-5.
192. Voskova-Goldman A, Peier A, Caskey CT, Richards CS, Shaffer LG. DMD-specific FISH probes are diagnostically useful in the detection of female carriers of DMD gene deletions. *Neurology* 1997; 48:1633-8.
193. Calvano S, Memeo E, Piemontese MR, Melchionda S, Bisceglia L, Gasparini P, Zelante L. Detection of dystrophin deletion carriers using FISH analysis. *Clin. Genet.* 1997; 52:17-22.
194. Ried T, Mahler V, Vogt P, Blonden L, van Ommen GJ, Cremer T, Cremer M. Direct carrier detection by in situ suppression hybridization with cosmid clones of the Duchenne/Becker muscular dystrophy locus. *Hum Genet.* 1990; 85(6):581-6.

195. Bronzova J, Todorova A, Kalaydjieva L. Detection of carriers of deletions in the dystrophin gene in Bulgarian DMD/BMD families. *Hum. Genet.* 1994; 93:170-4.
196. Grompe M. The rapid detection of unknown mutation in nucleic acids. *Nature Genetics* 1993; 5:111-7.
197. Mullis K (editor). The polymerase chain reaction. In: quantitative PCR. Oxford University Press, 1994.
198. Pegoraro E, Schimke RN, Arahata K, Hayashi Y, Stern H, Marks H, Glasberg MR, Carroll JE, Taber JW, Wessel HB, Bauserman SC, Toriello HV, Appleton S, Schwartz LS, Garcia CA, Hoffman EP. Dystrophinopathy in females: Paternal inheritance and genetic counselling. *Am. J. Hum. Genet.* 1994; 54:989-1003.
199. Zatz M, Sumita D, Campioto S, Canovas M, Cerqueira A, Vanizof M, Passos-Bueno MR. Paternal inheritance or different mutations in maternally related patients occur in about 3% of Duchenne familial cases. *Am. J. Med. Genet.* 1998; 78:361-5.
200. Alvarez LM, Ortiz JDM, Narro JA, Solís AJG, Morales AA. Evaluación de la actividad de la creatinofosfocinasa (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.
201. Arenas D, Coral R, Cisneros B, Peñaloza L, Salamanca F, Kofman S, Mercado R, Méndez J, Martínez C, Montañez C. Carrier detection in Duchenne and Becker Muscular dystrophy using dinucleotide repeat polymorphisms. A study in Mexican families. *Arch. Med. Res.* 1996; 27(2):151-6.
202. Roberts RG, Montadon AJ, Bobrow M, Bentley DR. Detection of a novel markers by mismatch analysis. *Nucl. Ac. Res.* 1989; 17:5961-71.
203. Iverson AJ, Taylor GR. PCR in genetic diagnosis: Sex determination. pp. 18-20. Chapt. 2. In: PCR. A practical Approach. edited by McPherson MJ, Quircke P, Taylor GR. The Practical Approach Series. IRL Press, Oxford University Press, New York, 1991.
204. Budowle B, Allen RC. Analysis of amplified fragment-length polymorphisms (VNTR/STR Loci) for Human Identity Testing. pp. 155-171. In: Forensic DNA Profiling Protocols. Edited by Lincoln PJ & Thomson J. Methods in Molecular Biology (Vol.98). Humana Press, New Jersey, 1998.
205. Alcantara M.A., Garcia-Cavazos R., Hernández-U E., Gonzalez-del Angel A., Carnevale A., Orozco L. Carrier detection and prenatal molecular diagnosis in a Duchenne muscular dystrophy family without any affected relative available. *Ann Genet* 2001; 44: 149-153.
206. Chong SS, Kristjansson K, Cota J, Handyside AH, Hughes MR. Preimplantation prevention of X-linked disease: reliable and rapid sex determination of single human cells by restriction analysis of simultaneously amplified ZFX and ZFY sequences. *Hum. Mol. Genet.* 1993; 2:1187-91.
207. Kristjansson K, Chong SS, Van den Veyver IB, Subramanian S, Snabes MC, Hughes, MR. Preimplantation single cell analyses of dystrophin gene deletions using whole genome amplification. *Nat. Genet.* 1994; 6:19-23.
208. Corrado K, Rafael JA, Millis PL, Cole NM, Faulkner JA, Wang KC. Transgenic mice expressing dystrophin with a deletion in the actin-binding domain display a mild Becker phenotype. *J Cell Biol* 134: 873, 1996.
209. Cerletti M, Negri T, Cozzi F, Colpo R, Andreetta F, Croci D, Davies KE, Cornelio F, Pozza O, Karpati G, Gilbert R, Mora M. Dystrophic phenotype of canine X-linked muscular dystrophy is mitigated by adenovirus-mediated utrophin gene transfer. *Gene Ther.* 2003 ; 10(9):750-7.
210. Fassati A, Bresolin N. Retroviral vectors for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Neurol Sci.* 2000;21(5 Suppl):S925-7.
211. Wang B, Li J, Xiao X. Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(25):13714-9.
212. Gregorevic P, Chamberlain JS. Gene therapy for muscular dystrophy - a review of promising progress. *Expert Opin Biol Ther.* 2003; 3(5):803-14.
213. Clemens PR, Duncan FJ. Progress in gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2001;1(1):89-96.
214. Walter MC, Lochmuller H. Novel approaches to treat muscular dystrophies. *Expert Opin Investig Drugs.* 2001;10(4):695-707.
215. Karpati G, Gilbert R, Petrof BJ, Nalbantoglu J. Gene therapy research for Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Curr. Opin. Neurol.* 1997; 10:430-5.
216. www.dmd.nl/exonprim.htm. Página web de la Universidad de Leyden, Holanda.
217. Sherrat TG, Valhamy T, Dubowitz V, Sewry CA, Strong PN. Exon skipping and tras in patients with frameshift deletions in the dystrophin gene. *Am J Hum Genet* 1993; 53:1007-15.
218. Winnard AV, Mendell JR, Prior TW, Florence J, Burghes AH. Frameshift deletions of exons 3-7 and revertant ribers in Duchenne muscular dystrophy: Mechanism of dystrophin production. *Am J Hum Genet* 1995; 56:158-66.
219. Perkins KJ, Davies KE. The role of utrophin in the potential therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 2002;12 Suppl 1:S78-89.
220. Deconinck AE, Rafael JA, Skinner JA, Brown SC, Potter AC, Metzinger L, Watt DJ, Dickson JG, Tinsley JM, Davies KE. Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell.* 1997; 90(4):717-27.
221. Grady RM, Teng H, Nichol MC, Cunningham JC, Wilkinson RS, Sanes JR. Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell.* 1997; 90(4):729-38.
222. Medori R, Brooke MH, Waterston RH. Two dissimilar brothers with Becker's dystrophy have an identical genetic defect. *Neurology.* 1989; 39(11):1493-6.
223. Kinoshita H, Goto Y, Ishikawa M, Uemura T, Matsumoto K, Hayashi YK, Arahata K, Nonaka I. A carrier of Duchenne muscular dystrophy with dilated cardiomyopathy but no skeletal muscle symptom. *Brain Dev.* 1995; 17(3):202-5.

224. Muntoni F, Melis MA, Ganau A, Dubowitz V. Transcription of the dystrophin gene in normal tissues and in skeletal muscle of a family with X-linked dilated cardiomyopathy. *Am J Hum Genet.* 1995; 56(1):151-7.
225. Oldfors A, Eriksson BO, Kyllerman M, Martinsson T, Wahlstrom J. Dilated cardiomyopathy and the dystrophin gene: an illustrated review. *Br Heart J.* 1994; 72(4):344-8.
226. Milasin J, Muntoni F, Severini GM, Bartoloni L, Vatta M, Krajcinovic M, Mateddu A, Angelini C, Camerini F, Falaschi A, Mestroni L, Giacca M. A point mutation in the 5' splice site of the dystrophin gene first intron responsible for X-linked dilated cardiomyopathy. *Hum Mol Genet.* 1996; 5(1):73-9.
227. Franz WM, Cremer M, Herrmann R, Grunig E, Fogel W, Scheffold T, Goebel HH, Kircheisen R, Kubler W, Voit T. X-linked dilated cardiomyopathy. Novel mutation of the dystrophin gene. *Ann N Y Acad Sci.* 1995; 752:470-91.
228. Yoshida K, Nakamura A, Yazaki M, Ikeda S, Takeda S. Insertional mutation by transposable element, L1, in the DMD gene results in X-linked dilated cardiomyopathy. *Hum Mol Genet.* 1998; 7(7):1129-32.
229. Zeng YT, Chen MJ, Ren ZR, Qiu XK, Huang SZ. Analysis of RFLPs and DNA deletions in the Chinese Duchenne muscular dystrophy gene. *J. Med. Genet.* 1991; 28:167-170.
230. Norman AM, Upadhyaya M, Thomas NST, Roberts K, Harper PS. Duchenne muscular dystrophy in Wales: impact of DNA linkage analysis and cDNA deletion screening. *J. Med. Genet.* 1989; 26:565-71.
231. Sugino S, Fujishita S, Kamimura N, Matsumoto T, Wapenaar C, Deng HX, Shibuya N, Miike T, Nikawa N. Molecular-genetic study on Duchenne and Becker muscular dystrophies: Deletion analyses on 45 Japanese patients and segregation analyses in their families with RFLPs based on the data from normal Japanese females.
232. Papiha SS, Roberts DF, Clarke A, Burn J, Gardner-Medwin D, Bhattacharya SS. Population frequencies of three DNA alleles linked to the Duchenne muscular dystrophy gene. *J. Med. Genet.* 1989; 26:390-2.
233. Pearson PI, Kidd KK, Willard HF. Report of the committee on human genetic mapping by recombinant DNA techniques. *Cytogenet. Cell Genet.* 1987; 46:390-566.
234. Gokgoz N, Kuseyni F, Topaloglu H, Yuksel-Apak M, Kirdar B. Screening of deletions and RFLP analysis in Turkish DMD/BMD families by PCR. *Clin. Genet.* 1993; 43:261-6.
235. Restagno G, Ferrone M, Doriguzzi C, Palmucci L, Mongini T, Carbonara A. Carrier detection of Duchenne muscular dystrophy through analysis of DNA from deciduous teeth of a dead affected child. *Prenat Diagn.* 1995;15(7):672-4.
236. McCabe ER, Huang Y, Descartes M, Zhang YH, Fenwick RG. DNA from Guthrie spots for diagnosis of DMD by multiplex PCR. *Biochem Med Metab Biol.* 1990; 44(3):294-5.