

00381
1
2ej



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

“ANALISIS MOLECULAR DEL GEN DE LA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS (BIOLOGIA)
P R E S E N T A
M. en C. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA

DIRECTORA DE TESIS
DRA. SILVIA CECILIA IRENE MONTAÑEZ OJEDA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1996.



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.

"ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN DE LA DISTROFIA MUSCULAR DE
DUCHENNE."

DOCTORADO EN CIENCIAS (GENÉTICA).

EN EN C DIEGO JULIO ARENAS ARANDA.

"ANALISIS MOLECULAR DEL GEN DE LA Distrofia Muscular de
Duchenne."

DOCTORADO EN CIENCIAS (BIOLOGIA).

EN C DIEGO JULIO ARENAS ARANDA.

DRA. SILVIA CECILIA-IRENE MONTAÑEZ OJEDA.

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO 4 DEL
DEPARTAMENTO DE GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DEL
CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL IPN,
BAJO LA DIRECCION DE LA DRA. CECILIA MONTAÑEZ OJEDA Y EL
DR. BULMARO CISNEROS VEGA.**

ELIMINADO

CLASE

INDETERMINADO

INDETERMINADO

**EL PRESENTE TRABAJO FUE
PARCIALMENTE APOYADO POR PADEP-
UNAM Y LA COMUNIDAD EUROPEA,
CONTRATO NO. CI1-CT93-0098.**

DEDICATORIA.

A CELINA.

A DIEGO MIGUEL.

A GABRIEL ALEJANDRO.

A CELINA BERENICE.

AGRADECIMIENTOS.

- A mi esposa por su amor, su estímulo constante y por acompañarme en este maravilloso viaje que es la Ciencia.
- A mis hijos por su amor y su motivación constante.
- A mis padres y abuelita por su ejemplo y apoyo.
- A mis hermanos por su apoyo y su interés en mi persona.
- A la Dra. Cecilia Montañez por permitirme realizar el trabajo experimental en su laboratorio y por la dirección del presente trabajo, sus enseñanzas y su amistad.
- Al Dr. Bulmaro Cisneros por la dirección del presente trabajo, sus enseñanzas y amistad.
- Al Dr. Fabio Salamanca por su amistad y por ofrecerme la oportunidad de continuar mi desarrollo profesional.
- Al M en C Sergio Vaca por sus comentarios siempre atinados y por mostrarme el camino.
- A la Dra. Laura Peñaloza por permitirme analizar a los pacientes a su cargo y por su confianza.
- A la ENEP Iztacala UNAM por su autorización para realizar el

trabajo experimental en el CINVESTAV.

- A mis compañeros y amigos del CINVESTAV, ENEP Iztacala y Centro Médico, por la agradable convivencia.

- A la Dra. Susana Kofman, Dr. Alejandro García, Dr. Arturo Panduro, Dra. Alessandra Carnevale y Dra. Sara Frias, por la revisión crítica del presente trabajo.

- A los individuos afectados por la Distrofia Muscular de Duchenne y sus familiares, sin los cuales este trabajo no se hubiera podido realizar y esperando que en un futuro el desarrollo científico permita ofrecerles una mejor calidad de vida.

LA VIDA.

UNA LOCURA PASAJERA, UNA EXTRAVAGANCIA, UNA FANTASIA

DE LOS ELEMENTOS, UN CAPRICHIO DE LA MATERIA.

CIORAN È (1979). ECARTELEMENT. GALLIMARD.

RESUMEN.

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es la miopatía hereditaria más frecuente en la población humana y afecta aproximadamente 1/3500 hombres. La DMD y su forma alélica menos severa, la distrofia muscular de Becker (DMB), se heredan de manera recesiva ligada al sexo. La principal causa mutacional relacionada con esta enfermedad es la delección de diversas regiones del gen. Aproximadamente el 70% de los afectados la presentan.

En el presente trabajo se analizó la frecuencia y patrón de delecciones intragénicas en 61 enfermos de DMD/DMB y se identificaron portadoras en 5 familias con antecedentes para esta enfermedad.

Mediante la amplificación múltiple reportada por Chamberlain et al y Beggs et al se analizaron 15 regiones diferentes del gen DMD de los afectados. El porcentaje de delecciones fue del 51% y la mayoría de éstas se localizaron entre los exones 44-52. En 16 de los afectados se encontró correlación entre los datos clínicos y moleculares.

Con la finalidad de mejorar el diagnóstico de portadoras para esta enfermedad, se amplificaron por PCR las secuencias repetidas de dinucleótidos de CA de los intrones 44, 45, 49, 50 y de dos regiones en los extremos 5' y 3' del gen DMD. De las 21 mujeres en riesgo pertenecientes a las 5 familias analizadas, 8 fueron portadoras de DMD/DMB, con al menos un marcador. También fue posible identificar un evento de recombinación en el gen DMD de una familia y mosaico gonadal en otra.

ABSTRACT.

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most common lethal neuromuscular genetic disease, affecting approximately 1/3500 males. DMD and the allelic, milder and less common Becker muscular dystrophy (BMD) are inherited as x-linked recessive disorders. The most frequent mutations in DMD gene are deletions, affecting approximately 70% of the patients.

The aims of the present study were to analyze the frequency and pattern of DMD gene deletion present in Mexican patients and to identify the carrier status in females of the five DMD/BMD Mexican families.

Sixty one unrelated Mexican patients with DMD/BMD were analyzed for intragenic DMD gene deletions, using the multiplex amplification of 15 deletion-prone exons described by Chamberlain et al and Beggs et al. The percentage of the deletions was 51%, and the majority of them were located in exons 44-52. In 16 patients were correlation between clinical and molecular data.

In order to improve carrier detection of Duchenne and Becker muscular dystrophy dinucleotide sequences repeats (CA) of the introns 44, 45, 49, 50 were used as well as two markers located at the 5' and 3' ends of the DMD gene. Twenty one females were studied, 8 of whom were at-risk STR haplotype. Furthermore, it was possible to identify a recombination event in the DMD gene in one family, and a gonadal mosaicism was found in another family.

INDICE.

1. ENFERMEDADES GENETICAS-----	1.
2. LAS DISTROFIAS MUSCULARES-----	2.
3. LA DISTROFIA MUSCULAR DUCHENNE/BECKER (DMD)-----	5.
1. ASPECTOS CLINICOS Y GENETICA CLASICA DE LA DMD-----	5.
2. GENETICA MOLECULAR DE LA DMD-----	8.
3. CARACTERISTICAS GENERALES DEL GEN DMD-----	12.
4. DISTROFINA EL PRODUCTO DEL GEN-----	13.
5. ANALISIS MUTACIONAL DEL GEN DMD Y NIVELES DE DISTROFINA EN ENFERMOS DE DMD/DMB-----	16.
6. APLICACIONES CLINICAS-----	20.
4. OBJETIVOS-----	27.
1. OBJETIVOS GENERALES-----	27.
2. OBJETIVOS PARTICULARES-----	27.
5. JUSTIFICACION-----	28.
6. METODOS-----	28.
1. DIAGNOSTICO CLINICO DE LA DMD/DMB Y CLASIFICACION CLINICA DE ESTA ENFERMEDAD, EN LOS INDIVIDUOS AFECTADOS-----	28.
2. METODO PARA EXTRAER DNA A PARTIR DE SANGRE PERIFERICA USANDO SDS Y CLORURO DE SODIO-----	29.
3. METODO PARA EXTRAER DNA PLASMIDICO-----	31.
4. DIGESTION DE DNA PLASMIDICO CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCION- -----	33.

5. RESTRICCION DE DNA GENOMICO DE ALTO PESO MOLECULAR	--33.
6. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA	-----34.
7. ELECTROFORESIS EN GELES DESNATURALIZANTES DE POLIACRILAMIDA- UREA AL 6%	-----35.
8. DETERMINACION DE DELECCIONES GENETICAS EN EL GEN DMD MEDIANTE LA AMPLIFICACION MULTIPLE 9 PLEX, DE DNA GENOMICO DE ENFERMOS DE DMD/DMB	-----37.
9. DETERMINACION DE DELECCIONES GENETICAS EN EL GEN DMD MEDIANTE LA AMPLIFICACION MULTIPLE 5 PLEX, DE DNA GENOMICO DE ENFERMOS DE DMD/DMB	-----39.
10. DETECCION DE PORTADORAS PARA LA DMD/DMB MEDIANTE PCR, USANDO REPETIDOS VARIABLES DE CA DE LOS INTRONES 44, 45, 49 Y 50 DEL GEN DMD	-----40.
11. DETECCION DE PORTADORAS PARA LA DMD/DMB MEDIANTE PCR, USANDO REPETIDOS VARIABLES DE CA DE LA REGION 5' DEL GEN DMD.	-----42.
12. DETECCION DE PORTADORAS PARA LA DMD/DMB MEDIANTE PCR, USANDO REPETIDOS VARIABLES DE CA DE LA REGION 3' DEL GEN DMD.	-----43.
13. ORIGEN DE LAS SONDAS DE cDNA	-----44.
14. AISLAMIENTO DE INSERTOS DE cDNA	-----45.
15. MARCAJE DE SONDAS DE cDNA	-----46.
16. DETERMINACION DE LA INCORPORACION Y LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LAS SONDAS MARCADAS	-----46.
17. ANALISIS DE DNA GENOMICO DE ENFERMOS DE DMD MEDIANTE HIBRIDACIONES TIPO SOUTHERN	-----48.
7. RESULTADOS	-----51.

1. OBTENCION DE UN BANCO DE DNA GENOMICO A PARTIR DE INDIVIDUOS AFECTADOS CON DMD/DMB Y SUS FAMILIARES-----51.
2. LOCALIZACION DE DELECCIONES GENETICAS EN ENFERMOS DE DMD/DMB, MEDIANTE AMPLIFICACION MULTIPLE 9 Y 5 PLEX-----51.
3. EXTENSION DE LAS DELECCIONES GENETICAS EN EL PUNTO CALIENTE MAYOR DEL GEN DMD, EN LOS INDIVIDUOS AFECTADOS POR DMD/DMB.
-----52.
4. PREDICION DEL MARCO DE LECTURA EN LOS ENFERMOS DMD/DMB CON DELECCIONES GENETICAS EN EL PUNTO CALIENTE MAYOR. CORRELACION ENTRE LAS CARACTERISTICAS CLINICAS Y EL ANALISIS MOLECULAR DE LAS DELECCIONES, EN ESTOS ENFERMOS-----70.
- 5: DIAGNOSTICO DE PORTADORAS PARA LA DMD/DMB, MEDIANTE PCR, USANDO REPETIDOS VARIABLES DE CA, DE LOS INTRONES 44, 45, 49, 50 Y DE LOS EXTREMOS 5' Y 3', DEL GEN DMD-----74.
8. DISCUSION-----86.
9. REFERENCIAS-----95.

INTRODUCCION.

1. ENFERMEDADES GENETICAS.

La herencia de los rasgos físicos y de enfermedades se conoce desde la antigüedad; Hipócrates señaló que algunas enfermedades como la epilepsia se transmitían, en ciertas familias, de manera similar a otros rasgos como el color de ojos (115). Sin embargo el concepto de herencia que se tenía antes del siglo XX era diferente al que se maneja en la actualidad, ya que se creía que las características hereditarias se mezclaban. Esta idea cambió con el redescubrimiento de las leyes de Mendel, que establecen que las características hereditarias son entidades independientes incapaces de mezclarse. Posteriormente gracias a una serie de trabajos se demostró que estas entidades se sitúan en los cromosomas y se llaman genes (25, 148).

Las enfermedades genéticas que afectan a los humanos se clasifican en cuatro grupos de acuerdo a como se heredan.

- a) Enfermedades genéticas por mutación génica simple (mendeliana o monogénica). Estas alteraciones se pueden heredar de manera dominante, recesiva, ligada al sexo u holándrica.
- b) Enfermedades genéticas por aberraciones cromosómicas.
- c) Enfermedades genéticas determinadas por mutaciones en el DNA mitocondrial.
- d) Enfermedades genéticas determinadas por desordenes poligénicos y multifactoriales (15, 115).

Las enfermedades genéticas monogénicas, que son resultado de la presencia de un gen anormal en el patrimonio genético de una línea familiar y que se heredan de acuerdo a las leyes de Mendel, tienen una incidencia de aproximadamente 5×10^5 nacimientos/año en el mundo (148).

Debido a la falta de terapia efectiva y los problemas que causan estos padecimientos en las familias afectadas, se han desarrollado enfoques alternativos, como el diagnóstico de individuos o fetos afectados, mediante determinaciones bioquímicas. Mediante esta técnica se ha logrado diagnosticar más de 40 enfermedades genéticas heredables (44, 148). Gracias al desarrollo de la tecnología del DNA recombinante, el análisis del DNA sirve para detectar anomalías genéticas utilizando secuencias situadas cerca o dentro de un gen relacionado con este tipo de enfermedades (44, 62, 103, 149, 151, 153). Actualmente es posible diagnosticar poco más de 300 enfermedades monogénicas de humanos (29). Numerosos grupos de investigación están desarrollando nuevas metodologías que permitirán corregir algunas enfermedades hereditarias, implantando genes normales en las células de los enfermos mediante la terapia génica (3, 48, 56, 121, 122, 130, 145, 155).

2. LAS DISTROFIAS MUSCULARES.

Las distrofias musculares son enfermedades determinadas genéticamente, cuya manifestación clínica principal es un debilitamiento muscular progresivo con una degeneración muscular

evidente por examinación bioquímica, histológica y electromiográfica. Existen tres grupos de distrofias musculares, de acuerdo a su patrón de herencia; distrofias musculares ligadas al sexo, distrofias musculares autosómicas dominantes y distrofias musculares autosómicas recesivas (tabla 1) (5).

TABLA 1.

CLASIFICACION DE LAS DISTROFIAS DE ACUERDO A SU PATRON DE HERENCIA.

LIGADAS AL SEXO	AUTOSOMICA DOMINANTE	AUTOSOMICA RECESIVA.
a. Distrofia muscular de Duchenne-Becker.	a. Distrofia muscular facioescapulohumoral.	a. Distrofia muscular de cintura.
b. Distrofia Emery-Dreifuss.	b. Distrofia Miotónica.	
	c. Distrofia muscular distal.	
	d. Distrofia muscular ocular.	
	e. Distrofia muscular oculofaringea.	

Las distrofias se clasifican también de acuerdo a la edad de aparición de los síntomas en los afectados, el grupo de músculos involucrados, el grado de progresión y el curso clínico (tabla 2)

(5).

TABLA 2.
DIFERENCIAS ENTRE LAS DISTROFIAS.

DISTROFIA	MODO DE HERENCIA.	EDAD DE APARICION.	REGIONES AFECTADAS.	PROGRESION	RETARDO MENTAL.
DUCHENNE.	LIGADO AL SEXO.	3 AÑOS.	CADERA Y HOMBROS.	RAPIDA.	FRECUENTE
FACIOES-CAPULOHUM.	DOMINANTE	1-2 DECADA	HOMBROS, CINTURA, CARA.	MODERADA.	RARO.
DE CINTURA	RECESIVA.	VARIABLE.	CINTURA PELVICA Y HOMBROS.	VARIABLE.	VARIABLE
OCULOFA-RINGEA.	DOMINANTE	1-2 DECADA	OCULAR, FARINGE, CUELLO Y PELVIS.	LENTA	NO.
MIOTONICA	DOMINANTE	VARIABLE.	PARPADO, FARINGE, CUELLO, PELVIS, MANOS.	VARIABLE.	FRECUENTE

3. LA DISTROFIA MUSCULAR DUCHENNE-BECKER (DMD).

1. ASPECTOS CLINICOS Y GENETICA CLASICA DE LA DMD.

La DMD es, de todas las distrofias musculares, la mejor conocida desde el punto de vista clínico y genético (5, 157).

La descripción inicial de la DMD se remonta al siglo pasado (1860) y fue dada por el fisiólogo francés G. Duchenne, describiendola como una enfermedad donde se presenta un debilitamiento muscular progresivo, que afecta a niños (74, 76, 99).

Esta enfermedad es la más común y grave de las distrofias. Aunque las anormalidades histopatológicas del músculo esquelético se han detectado en los estados iniciales del desarrollo del feto, la enfermedad aparece entre los 3-5 años de edad (84). Se presenta como una degeneración muscular y una proliferación de tejido conectivo y adiposo en el músculo (fibrosis endomisial), que provoca una debilidad muscular progresiva, afectando también músculo cardíaco y músculo liso del tracto gastrointestinal (84, 99).

El 97% de los niños con DMD no puede caminar a la edad de 12 años y la mayoría de éstos mueren a finales de la segunda década de su vida por neumonía o falla cardiaca, debido a un debilitamiento progresivo de los músculos respiratorios o cardíacos (99).

Aproximadamente el 30% de los niños afectados presenta retraso mental, el cual no es progresivo ni está correlacionado con la gravedad de la enfermedad (5, 99).

Los enfermos de DMD presentan niveles elevados de varias enzimas en su suero, como la adolasa (ALD), la transaminasa oxalacética glutámica del suero (SGOT), la deshidrogenasa láctica (LDH) y la creatinina fosfocinasa (CPK). Esta última enzima se presenta en concentraciones de al menos 2 órdenes de magnitud mayores respecto al normal, en el suero de varones afectados en etapas preclínicas o clínicas iniciales (5, 157), por lo cual es una de las pruebas más utilizadas para el diagnóstico de la enfermedad (76). El uso de la determinación de los niveles de CPK como prueba en el diagnóstico prenatal no es recomendable debido a la alta frecuencia de falsos negativos (5). Los niveles de esta enzima también se encuentran elevados en aproximadamente el 70-75% de las mujeres portadoras, sin embargo no es concluyente utilizar este parámetro para la determinación de portadoras ya que sus niveles pueden variar en un misma mujer, a diferentes tiempos, por otro lado, los niveles de CPK se sobreponen entre portadoras y no portadoras (9, 138, 157).

La distrofia muscular de Becker (DMB) se presenta como una forma benigna de la DMD, caracterizada por un debilitamiento muscular menos grave que la DMD y un desarrollo de la enfermedad más lento. La incapacidad para caminar a los 12 años, se ha usado como uno de los criterios para diferenciar a las dos distrofias, sin embargo la DMB es más heterogénea que la DMD de tal forma que algunos enfermos con DMB presentan síntomas de la enfermedad en la primera década de su vida y otros hasta la tercera o cuarta década (99). Los enfermos

de esta distrofia raramente presentan retraso mental, y suelen ser confundidos con otros tipos de distrofias musculares. En algunos casos solo examinando la alteración mutacional en el gen se puede aclarar el diagnóstico (6, 58, 99).

La DMD se hereda en forma recesiva ligada al cromosoma X y es transmitida por mujeres portadoras (5, 99). La DMB es alélica a la DMD (20, 83, 84) ambas enfermedades son causadas por mutaciones en el mismo gen (157).

Debido a la inactivación al azar del cromosoma X en las mujeres portadoras se ha estimado que aproximadamente el 8% de éstas tienen alguna manifestación clínica de la enfermedad (157).

La mayoría de las estimaciones de la incidencia de la DMD en la población humana van de un rango de $2.7-2.9 \times 10^{-4}$ (1/3300-1/3700) nacimientos de hombres vivos, con pequeñas variaciones étnicas (156). La incidencia estimada para la DMB es de aproximadamente 1/30000 hombres nacidos vivos (58).

El rango de mutación calculado para el gen, es de aproximadamente 1×10^{-4} , el cual es uno de los más altos conocidos. Esto posiblemente se deba al gran tamaño del gen (86, 157).

Se ha estimado que 1/3 de los casos de DMD se debe a nuevas mutaciones en el afectado, 1/3 a la herencia de nuevas mutaciones del gen de la DMD en la madre afectada y 1/3 por la herencia de mutaciones en el gen de la DMD presentes en generaciones anteriores

(157).

Para el tratamiento de la DMD/DMB se han probado un buen número de drogas que incluyen esteroides, vitaminas y minerales. Actualmente el glucocorticoide alfa metilprednisolone ha resultado ser una posible alternativa en el tratamiento de esta distrofia, debido a sus propiedades miogénicas en mioblastos en cultivo (53, 65, 104, 123). Otras metodologías que podrán ser importantes en el tratamiento de esta distrofia son, el trasplante de mioblastos (121, 122), la inyección de DNA directamente en la fibra muscular (3, 155) y la terapia génica usando vectores virales (48, 130).

Existen varios modelos animales de la DMD/DMB; ratones mdx, ratones mdx^{3cv}, perros cxmd y gatos deficientes en distrofina. Los ratones mdx son más usados, a pesar de que la fibrosis endomisial y la pérdida gradual de fibras musculares no se presenta en estos animales (31, 28, 92, 139, 140).

2. GENETICA MOLECULAR DE LA DMD/DMB.

El desarrollo de la Biología Molecular en los dos últimos decenios ha facilitado aislar genes a partir de secuencias de DNA clonadas, sin necesidad de conocer el producto del gen. Esta técnica conocida como clonaje posicional (110) permitió localizar el gen responsable de la DMD/DMB en la banda Xp21 del brazo corto del cromosoma X, utilizando las tres estrategias siguientes (157):

a) Puntos de intercambio de translocaciones en mujeres con DMD/DMB.

La primeras translocaciones en niñas afectadas con DMD/DMB fueron descritas a finales de los 70's y principios de los 80's (50, 79, 96, 144, 159). Ellas presentaban translocaciones autosómicas de novo con puntos de rompimiento en la banda Xp21. Estas niñas presentaron translocaciones en uno de sus cromosomas X, el por qué presentaban DMD/DMB, a pesar de tener dos cromosomas X, posiblemente se debió a que por el tipo de rearme presentaban una inactivación selectiva del cromosoma X normal (100, 132, 157). Por análisis de bandeado de alta resolución se encontró que existía una distribución heterogénea de los puntos de intercambio de las traslocaciones en la banda Xp21, encontrándose la mayoría en Xp21.2 (157).

b) Estudios en familias con antecedentes de DMD/DMB usando sondas de DNA que detectan fragmentos de restricción polimórficos en tamaño (RFLP's) (153) en el cromosoma humano X.

Las primeras sondas que sirvieron para detectar RFLP's ligados a la DMD/DMB fueron RC8 (112) y L1.28 (43). Ambos fragmentos flanquean al gen DMD, a 20 centimorgans (cM) de éste (157). Se han descrito otras sondas cercanas al gen siendo las C7 y 754 las mas cercanas (47, 75). En 1985 con el uso de sondas que reconocían secuencias de DNA localizadas dentro del gen DMD, se demostró que la DMB es alélica a la DMD (83).

c) Enfermos con fenotipo complejo que incluían a la DMD/DMB. La tercera línea de evidencia que mostró que el gen DMD está en la

banda Xp21 provino en 1985 de enfermos con fenotipo complejo, que aparte de tener DMD/DMB, tenían enfermedad granulomatosa crónica (CGD), fenotipo McLeod (XK) y retinitis pigmentosa (RP). Por análisis citogenético de alta resolución se encontró que la alteración correspondía a una pequeña delección en las bandas Xp21.1 y Xp21.2 (delección BB) (55).

Una vez localizada la posición del gen DMD, se clonaron segmentos de DNA del locus DMD, mediante dos estrategias (157).

a) Clonaje mediante la técnica de reasociación mejorada con fenol (pERT). En esta técnica se seleccionaron fragmentos de DNA que estaban ausentes en enfermos de DMD/DMB (delección BB). Las muestras de DNA usadas en esta técnica provinieron de enfermos con DMD/DMB (delección BB) y DNA aislado de una línea de células linfoides humanas 49 (XXXXY) y cortado con la enzima MboI.

Se analizó si las clonas obtenidas mapeaban dentro de la delección BB y se seleccionaron ocho que no hibridaron con el ADN BB en hibridaciones tipo Southern (clonas pERT). De éstas, la clona PERT87 no se encontró en 5/57 enfermos de DMD y sí en personas sin DMD/DMB (90, 106). Con la técnica de "caminando sobre el cromosoma X" normal en sentido bidireccional, se construyó un fragmento de 220 kb, a partir de la clona PERT87, nombrándose locus DXS164 (90, 108). Durante el desarrollo de esta técnica se obtuvieron varios fragmentos que fueron repartidos en varios laboratorios del mundo, para analizar el DNA de enfermos con DMD/DMB y se encontró que de 1346 enfermos de DMD/DMB analizados, 884 tuvieron delecciones, las

cuales se extendían en diferentes direcciones. Estos datos también mostraron que existe una parte del gen DMD en el locus DXS164 y se confirmó que la DMB es alélica a la DMD (91, 108).

b) Clonación de translocaciones del gen DMD unidas a genes RNAr. Esta metodología se aprovechó de la identificación de una mujer con DMD que tenía una translocación de la zona Xp21.1, a una zona del cromosoma 21 que tiene genes en tándem, que codifican para los RNA 18s y 28s (144, 156). La metodología consistió en hibridar sondas de RNAr contra el sector translocado, una vez localizado el fragmento, se clonó (129). El segmento clonado se seleccionó en células somáticas híbridas de ratón, de tal manera que solo hubiera una sola fuente de RNAr (157). La clona obtenida se denominó XJ1 y contenía 620 pb de RNAr, en un extremo, y cerca de 11 kpb del cromosoma X, en el otro extremo. Esta clona se usó para producir el locus DXS206, por la técnica de caminando sobre el cromosoma X normal (157).

Una vez que se tuvieron localizados los loci DXS164 y DXS206 y que existía cierta seguridad de que ambos estaban dentro del gen DMD, se usaron ambos para localizar exones dentro de éste. La estrategia consistió en hibridar subclonas genómicas individuales con secuencias expresadas (RNA o cDNA) de músculo y/o probar con secuencias conservadas de varias especies (23, 157). Los primeros exones se reportaron en 1986 (107).

3. CARACTERISTICAS GENERALES DEL GEN DMD.

El gen normal de DMD es el locus más grande conocido, contiene al menos 79 exones distribuidos sobre aproximadamente 2.4×10^6 pb del cromosoma X humano y ocupa el 1% del DNA de este cromosoma (23, 62, 86, 135). Se considera que este gen está altamente conservado en la evolución, posiblemente debido a su gran tamaño y alto número de exones (68). Los intrones suman aproximadamente 2 megapares de bases, siendo algunos de ellos enormes, como el intron 1 de la distrofina cerebral cuya longitud es de 400 kpb (19, 92).

El gen de la DMD presenta una alta tasa de mutación posiblemente por su gran tamaño (4, 111).

Hasta el momento se han reportado 5 promotores diferentes en el gen DMD. Tres de ellos se encuentran en el extremo 5' del gen, los productos que se transcriben a partir de cada uno de éstos se diferencian por el primer exon y por el tejido donde se expresa su proteína. Los otros dos promotores se encuentran hacia el extremo 3' del gen DMD: uno entre los exones 55-56 (promotor de Dp 116) y otro entre los exones 62-63 (promotor de Dp 71) (19, 24, 60, 84, 93). Recientemente se reportó una nueva proteína codificada por el gen DMD. Esta se denomina Dp140 y el promotor que la produce posiblemente se encuentre en el intron 44 (95).

A partir de estos promotores se transcriben 6 RNAm's diferentes, los cuales son traducidos en 5 proteínas pertenecientes a la familia de las proteínas relacionadas con la distrofina (ver mas

adelante) (16). El transcrito mejor conocido de este gen es el muscular que fue detectado por hibridaciones tipo "Northern", a partir de RNAm total de músculo esquelético de fetos y adultos humanos (68, 107). La cantidad en músculo esquelético va de 0.02-0.1% del total de RNAm y también se encuentra en músculo liso y tejido cerebral a unos porcentajes del 5% y 1% respecto a los niveles en músculo esquelético (33, 36, 116, 117). Un transcrito similar se ha detectado en músculo esquelético de ratón normal (33, 68), el cual tiene una similitud del 90% con el transcrito humano, en las porciones comparadas (68, 86).

Se sabe que la transcripción del gen DMD que produce la distrofina muscular, da inicio cuando los mioblastos empiezan a diferenciarse en fibras musculares multinucleadas, de una forma similar a lo que se da en otros genes músculo específicos (84, 94, 116). Sin embargo se ha demostrado por transcripción ilegítima que este gen se transcribe a un nivel basal en diversas líneas celulares no musculares (36, 37).

4. DISTROFINA; EL PRODUCTO DEL GEN DMD.

La proteína producida por el gen DMD se identificó en músculo esquelético de humanos y ratones por inmunotransferencia, utilizando anticuerpos policlonales dirigidos contra una proteína de fusión en la cual se encontraba expresada una región del gen DMD (69, 99). La proteína denominada distrofina, se encuentra principalmente en músculo esquelético, cardíaco y liso de humanos

y ratones, a niveles equivalentes tanto en tejido de adultos como de fetos (69, 72). En contraste con los diferentes niveles del RNAM del gen DMD en los diversos tejidos musculares estudiados, se ha reportado que los niveles de distrofina son similares en éstos (72, 94). Esta proteína también se encuentra, en bajos niveles, en células de la corteza cerebral y médula espinal (84).

A partir de la secuencia de nucleótidos del cDNA del gen DMD que fue publicada en 1988 (87), se propuso la secuencia de aminoácidos para la distrofina. Esta proteína está formada de 3688 aminoácidos, dispuestos en 4 dominios: a) El dominio amino está formado de 240 aminoácidos y es similar en secuencia y función a la alfa actinina, una proteína de unión a los filamentos de actina (64, 97, 105). b) El segundo dominio tiene 2700 aminoácidos dispuestos en 24 repetidos homólogos, cada uno con 109 aminoácidos en promedio, dispuestos a manera de triples alfa hélices. Este dominio es similar a la espectrina, un componente del citoesqueleto de los eritrocitos y posiblemente forme hileras largas y flexibles (4, 87). c) El tercer dominio con 150 aminoácidos es rico en cisteína y se parece al tercer dominio de la alfa actinina de Dictyostelium discoideum. d) El cuarto dominio, el carboxilo terminal, con 420 aminoácidos presenta homología solamente con la utrofina, una proteína producida por un gen localizado en el cromosoma 6q24 humano, e interactúa con varias proteínas transmembranales, donde forma los complejos distroglicano y sarcoglicano (4, 16, 92, 97, 158).

Mediante Inmunofluorecencia se ha establecido que la distrofina se encuentra en las membranas plasmáticas de todos los músculos, probablemente en la bicapa lipídica (4, 17, 70, 83, 147).

Debido a que la distrofina se encuentra en diversas membranas de células especializadas posiblemente sea una molécula multifuncional. Algunas de las funciones que se han sugerido para esta proteína son: a) Estabilidad de la membrana: la distrofina puede estabilizar la membrana durante los procesos de contracción muscular. b) Transducción de fuerza: la distrofina puede ser el vínculo entre la fuerza contráctil producida en el dominio intracelular con el ambiente extracelular. c) Organización en membranas especializadas: La distrofina podría en tejidos no contráctiles organizar la topología de la membrana o mantener las concentraciones de los componentes de la membrana (4, 73, 92).

En la tabla 3 se muestran los nombres de las diversas proteínas de la familia de la distrofina, sus pesos moleculares, en que tejido se producen y a partir de que RNAm se traducen.

TABLA 3.
 PROTEINAS DE LA FAMILIA DE LAS DISTROFINAS.

NOMBRE.	RNA _m .	PM.	TEJIDO.
Distrofina muscular. cardíaco y	14kb.	427kD.	Músculo estriado, liso.
Distrofina cerebral.	14kb.	427kD.	Neuronas corticales.
Distrofina de células de Purkinje.	14kb.	ND.	Células cerebrales de Purkinje.
Dp 116.	5.2kb.	116kD.	Células Schwann.
Dp 71.	4.8Kb.	70-80kD.	Cerebro, células no musculares y células Stem.
Dp 140.	7.5Kb.	140kD.	Sistema nervioso central.

5. ANÁLISIS MUTACIONAL DEL GEN DMD Y NIVELES DE DISTROFINA, EN ENFERMOS DE DMD/DMB.

Aproximadamente del 60-70% de los enfermos de DMD tienen deleciones en el locus DMD (46, 92, 93, 99). Estas son heterogéneas en extensión y posición, sin embargo existen al menos dos puntos calientes de inicio de deleciones en intrones, denominados "punto

caliente mayor" y "punto caliente menor" (45, 54, 86). El mayor se encuentra en el intron 44. La mayoría de las deleciones empiezan en este intron cuyo tamaño es muy grande (46, 87, 120). El punto caliente menor se encuentra en el intron 7 (46, 87, 135).

Estas dos zonas de origen de deleciones tienen otras diferencias como: a) Las deleciones se extienden en dirección 5' y 3', en el punto caliente menor, en cambio en el mayor solo se extienden en dirección 3'. b) El tamaño de las deleciones es heterogéneo en el menor, no así en el mayor, donde el tamaño de las deleciones es de aproximadamente 200 Kb. c) Se han detectado duplicaciones en enfermos de DMD/DMB, encontrándose aproximadamente el 70% de éstas en el punto caliente menor (77). d) Las mutaciones relacionadas con la DMB se localizan principalmente en el punto caliente mayor.

No está claro por qué las deleciones se originan en estas regiones, sin embargo, se han propuesto dos hipótesis, la primera propone la existencia de secuencias peculiares dentro de los intrones, que podrían aumentar la frecuencia de deleciones. La segunda plantea que los intrones son muy grandes y por lo tanto su tamaño facilita ser blanco de deleciones (92). Para el caso de la primera propuesta se ha demostrado al menos en dos enfermos de DMD/DMB que tenían una deleción a partir del intron 43, que una secuencia similar a un transposon (elemento transponible humano de la familia THE-1) pudiera estar involucrada en la inestabilidad de esa zona (124).

Se han detectado al menos 35% de enfermos de DMD, que no presentan deleciones (77, 92), probablemente tengan microdeleciones o mutaciones puntuales. Estas últimas se han localizado en varios enfermos con DMD/DMB, su distribución es heterogénea, aunque los exones 70 y 72 son los que las presentan con mayor frecuencia (82, 128, 134).

No se ha encontrado correlación entre posición-extensión de la deleción en el gen DMD, con gravedad de la enfermedad, (92, 99), en sí se han detectado casos de deleciones que no corresponden con el fenotipo esperado, por ejemplo existen dos casos reportados de DMB, cuyo análisis molecular mostró que tenían deleciones mayores, al menos dos exones más, que enfermos que tenían DMD.

Con lo que respecta al retraso mental se ha reportado una relación estadísticamente significativa entre deleción de la región que comprende los exones 45-52 y retraso mental en los enfermos de DMD (95, 131). Deleciones en esa región pueden afectar la expresión de la distrofina de 427kD y la Dp140 y no la de Dp116 y Dp71, lo cual sugiere que la Dp140 o alguna de las distrofinas grandes, pudieran tener un papel importante en el Sistema nervioso central y posiblemente en el retraso mental (95).

Debido a que no existe una correlación entre posición-extensión de la deleción y gravedad de la enfermedad, se ha propuesto la hipótesis del marco de lectura (109), que básicamente plantea que

los enfermos de DMD sufrieron una delección que rompió el marco de lectura del gen DMD y por lo tanto se produjo una distrofina truncada. En cambio la delección en los enfermos de DMB no rompió el marco de lectura y por lo tanto se produjo una distrofina más pequeña pero parcialmente funcional. Esta hipótesis se apoya en evidencias experimentales como la inmunotransferencia con la que se demostró que la distrofina está ausente en enfermos DMD (<3%) y presente a ciertos niveles (>10%) o con un tamaño diferente en los enfermos de DMB (71). Esta regla del marco de lectura ha explicado el 92% de la delecciones investigadas, en 258 casos de DMD y DMB (88). El 8% restante que no cumplen con la regla se ha explicado mediante 2 causas. La primera por una reiniciación a partir de un promotor críptico en el intron 2 (57, 101) y la segunda por un acomodo diferente de los exones durante el proceso de empalme de éstos, que restaure el marco de lectura en una pequeña población de los transcritos (63).

Se ha propuesto un mapa patológico-funcional de la distrofina en base al estudio de la distribución de las delecciones en los enfermos DMD/DMB analizados. En este se propone que delecciones en el dominio amino terminal ocasionan un fenotipo variable pero grave de DMB. Las delecciones en el segundo dominio parecen ser dispensables debido a que ocasionan un fenotipo muy leve o atípico. Delecciones en el tercer dominio provocan una DMB típica. Con unas cuantas excepciones las delecciones en el dominio carboxilo terminal resultan en DMD (4, 12, 57, 88, 125).

Por lo que respecta a los ratones mdx, el modelo animal de la DMD/DMB más trabajado, se han detectado transcritos del gen DMD murínico (DMDm) en los ratones homocigotos mdx, pero a un nivel del 16% respecto a los ratones no mdx (33), sin embargo en los primeros no se encontró distrofina usando anticuerpos policlonales contra esa proteína (17, 147). Actualmente se sabe que en el gen DMDm de los ratones mdx la citosina de la posición 3185 es reemplazada por una timina y ocasiona que el codon CAA se convierta en TTA, un codon de terminación que produce una distrofina truncada, con solo el 27% de su secuencia (99, 139).

Por otro lado, los ratones mdx presentan una aparente contradicción con los enfermos de DMD, ya que a pesar de que las mutaciones en los loci DMD de ambas especies son aparentemente iguales a nivel traduccional (no presencia de distrofina), a nivel histológico son diferentes; los ratones mdx no presentan fibrosis endomesial, además de que no mueren por la falta de la distrofina. Esto plantea la posibilidad de que existan otros factores desconocidos que juegan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad (99), o bien las otras distrofinas, como la utrofina, puedan dar esas diferencias (4, 16).

6. APLICACIONES CLINICAS.

Con el aislamiento y caracterización del gen DMD, ahora es posible evaluar a los enfermos con DMD y a sus familiares, utilizando sondas genómicas, sondas de cDNA y secuencias repetidas variables

presentes en el mismo gen (27, 35, 41, 49, 62, 86, 87, 119, 124, 138, 151).

Las sondas genómicas compuestas en su mayoría de secuencias no codificadoras (intrones), pueden detectar fragmentos de restricción polimórficos en el tamaño (RFLP's) dentro o alrededor del gen DMD y usarse en estudios de ligamiento (62).

Las sondas de cDNA identifican regiones codificadoras (exones) del gen DMD. Estas sondas son menos usadas como marcadores genéticos ya que los segmentos de DNA que reconocen son menos variables que los segmentos no codificadores, sin embargo han sido útiles para detectar deleciones en el gen DMD (41, 62, 99).

El estudio molecular de la DMD/DMB se ha realizado por 4 técnicas diferentes.

a) RFLP's (153). Existen una serie de sondas genómicas que detectan RFLP's (útiles para estudios de ligamiento). La metodología básica consiste en obtener DNA de leucocitos, en caso de fetos de biopsia de las vellosidades coriónicas o de líquido amniótico (44). El DNA es aislado y una vez restringido se realizan hibridaciones tipo "Southern", con una sonda radioactiva. Esta técnica presenta una serie de problemas en el diagnóstico molecular de la DMD/DMB, que tienen que ver con el gran tamaño y la alta frecuencia de recombinación intragénica reportada, para este gen (2, 135). Para evitar esto se recomienda usar de 10 a 20 sondas genómicas, para cubrir todo el locus, lo cual aumenta la eficiencia del ensayo a

cerca del 99% (62). Otro problema con el uso de esta metodología es que el análisis de los RFLP's no detecta el defecto en el gen, sin embargo es de gran utilidad para dar asesoramiento genético, cuando no se conoce la causa mutacional en éste.

b) Detección de deleciones. Las sondas genómicas y de cDNA pueden detectar deleciones en el gen DMD. La metodología básica es la misma a la usada en los RFLP's y tiene varias ventajas, respecto a la anterior, ya que la demostración del defecto en el gen es directa por lo que los eventos de recombinación no son un problema. La certeza del diagnóstico cuando ocurre la detección de la deleción en el gen es del 100%. Las sondas genómicas detectan deleciones solo en el 10-20% de los enfermos de DMD, utilizando todas las sondas de cDNA del gen DMD se pueden detectar aproximadamente un 55% de mutaciones (deleciones y duplicaciones) en el gen (67, 77, 86).

Con el desarrollo de la técnica de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR), la detección de las deleciones en el gen DMD de los individuos afectados por esta enfermedad, se ha facilitado enormemente. Actualmente existen varios paquetes de amplificación múltiple, como el 9 plex o el 5 plex (10, 35), que amplifican conjuntamente varias regiones de los puntos calientes de origen de deleciones del gen DMD. Con este tipo de metodología y las hibridaciones tipo Southern es posible detectar del 65-70% de las mutaciones en los individuos afectados por la DMD/DMB (27).

El uso de las sondas de cDNA y la técnica de PCR, para determinar las deleciones en el gen DMD es de gran utilidad, ya que éstas últimas son la causa mutacional principal relacionada con la enfermedad, sin embargo la información generada se debe manejar con precaución, ya que existe un reporte de una persona sin DMD/DMB que presenta una deleción en el gen DMD (89).

Con lo que respecta a las mujeres portadoras, en éstas se pueden detectar deleciones mediante un Southern cuantitativo. Con esta técnica se puede saber si una mujer es hemicingota (portaría la deleción en uno de sus cromosomas X) para una región del gen DMD y por lo tanto ser portadora. Sin embargo esta técnica requiere de una comparación cuidadosa de la intensidad de las bandas de los exones deletados y no deletados en la posible portadora, lo que provoca que los resultados obtenidos del análisis pueden ser en un buen número de casos subjetivos, además de consumir una buena cantidad de tiempo y ser caros (62, 66, 102, 138).

c) Microsatélites. Los microsatélites son secuencias de DNA de 1-5 nucleótidos de longitud, de composición variable, presentes en la eucromatina de los cromosomas y pertenecen a las secuencias denominadas secuencias variables repetidas en tándem (VNTR's) (151). Debido a que estas secuencias se heredan de manera mendeliana, son altamente polimórficas, están ampliamente distribuidas y pueden ser detectadas en una secuencia de DNA de manera relativamente sencilla, por ejemplo por PCR, son de gran utilidad en el diagnóstico molecular de enfermedades hereditarias,

así como en estudios para la identificación de individuos (150, 151). Se estima que existen de 50,000 a 100,000 de un tipo de estas secuencias en el genoma humano, las (dC-dA)n-(dG-dT)n, también nombradas (CA)n. Estas secuencias de solo dos nucleótidos de longitud, que se repiten muchas veces pertenecen a la subclase de secuencias cortas repetidas en tándem (STR's).

Se han descrito secuencias STR de CA en el gen DMD, una en la región UTR 3', una en el intron 63, cuatro en la región 5' y una en cada uno de los intrones 44, 45, 49 y 50 y se ha demostrado que son de gran utilidad en el diagnóstico de portadoras para la DMD/DMB (11, 27, 52, 118, 127).

d) Detección de la distrofina. Debido a que se conoce el producto del gen de la DMD, la distrofina, la detección de ésta se puede usar en el diagnóstico de DMD, principalmente en enfermos sin deleciones en el DNA o con características atípicas.

La distrofina está presente en el músculo normal, ausente en enfermos de DMD y presente a bajos niveles o con una movilidad alterada en enfermos de DMB (71). Para detectar la distrofina por inmunotransferencia se requiere de músculo obtenido por biopsia. Esta prueba es muy sensible y específica ; más del 90% de los enfermos de DMD no presentan distrofina y aproximadamente el 90% de los controles presentan niveles normales de la proteína (62, 71).

El uso de dos anticuerpos diferentes, dirigidos contra los dominios amino y carboxilo terminal de la distrofina permite, mediante

inmunotransferencia, diferenciar a un enfermo de Duchenne de un Becker (21). Por estudios inmunohistoquímicos utilizando anticuerpos contra la distrofina, es posible detectar portadoras (17, 18).

Actualmente se cuenta con una buena cantidad de anticuerpos contra diversas regiones de la distrofina, lo que permite tener un diagnóstico mas certero de la DMD/DMB, o bien un conocimiento de la importancia de los diversos dominios de la proteína (114).

e) Posibles errores en la interpretación del diagnóstico molecular. Existen al menos tres fuentes potenciales de error en la predicción de riesgo genético para la DMD/DMB, utilizando el diagnóstico molecular: a) Recombinación intragénica. Se ha reportado una alta frecuencia de recombinación para este locus (1, 2, 38), posiblemente por el tamaño tan grande del gen. La recombinación puede ocasionar un diagnóstico de portadoras o prenatal equivocado. Este riesgo es mayor cuando la causa mutacional de la enfermedad no es conocida. El problema se puede solventar usando diferentes marcadores. Para tener una certeza del 99.6% en el diagnóstico de portadoras o prenatal, es conveniente utilizar al menos 5 secuencias de repetidos de CA en los extremos 5' y 3' del gen y otros en la zona central de éste. (27, 32, 62, 119).

b) Heterogeneidad genética. Algunas manifestaciones clínicas o fenotípicas relacionadas con una enfermedad, pueden ser resultado de mutaciones en diferentes loci (15).

En el caso de la DMD/DMB se han detectado niñas y niños con esta enfermedad, que aparentemente presentan cariotipo normal (137, 143), en algunos de estos enfermos analizados los niveles de distrofina en músculo fueron normales y el análisis molecular del gen DMD no reveló anomalías (62). Posiblemente la causa de la enfermedad en éstos individuos se deba a un desorden autosómico recesivo raro, como la distrofia muscular de cintura (LGMD), que en varios casos es indistinguible de la DMB (6). Recientemente se han descrito al menos 4 variedades diferentes de la LGMD (tipo 2A, 2C, 2D y 2E) y otras distrofias que se pueden confundir con la DMB, como la Distrofia muscular autosómica recesiva (ARMD), la Distrofia muscular autosómica recesiva severa de infantes (SCARMD) y la Distrofia muscular congénita (CMD). Todas estas distrofias son resultado de alteraciones en los diferentes componentes del complejo sarcoglicano, que se encuentra asociado a la distrofina en la fibra muscular (158).

c) Mosaicismo germinal. Se han descrito varios casos de mujeres que no presentan deleciones en el gen DMD en el DNA de sus linfocitos, sin embargo tuvieron más de un hijo con DMD/DMB y deleciones en el gen DMD. Esto se pudo haber dado por una mutación en la línea de células gonadales de esas mujeres, que ocasionó que algunos ovocitos tuvieran la deleción y otros no (8, 40).

El riesgo de que ocurra este evento puede ser alto (14%), por lo cual debe ser considerado cuando se va a dar consejo genético a familias en donde aparentemente los individuos afectados sufrieron

una mutación de novo (62). Un problema que ha complicado mas el fenómeno del mosaicismo germinal en la DMD/DMB, es la demostración de que algunas mujeres portadoras de la DMD/DMB, aparte de tener mosaicismo germinal, tienen mosaicismo somático (22).

4. OBJETIVOS.

1. *Objetivos generales.*

- Analizar el patrón de deleciones en el gen DMD, en enfermos mexicanos de DMD/DMB.

- Establecer el diagnóstico de portadoras de la DMD/DMB, en familias mexicanas.

2. *Objetivos particulares.*

- Aislamiento del DNA genómico, obtenido de leucocitos de pacientes con DMD, sus familiares y personas normales, para crear un banco de DNA de familias con DMD.
- Establecimiento del método de PCR utilizando los paquetes de amplificación múltiple 9 y 5 plex.
- Análisis de las deleciones presentes en el gen DMD, en los individuos afectados, usando la técnica de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) e hibridaciones Southern.
- Análisis de la correlación entre la localización de las deleciones del gen DMD y el fenotipo de la enfermedad, en los individuos afectados por DMD/DMB.

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

JUSTIFICACION.

El diagnóstico molecular de individuos afectados y posibles portadoras de la DMD/DMB es una necesidad dentro del campo de la medicina preventiva, ya que permite tener en muchos casos una certeza diagnóstica del 100% y evitar a las familias en riesgo las severas cargas psicosociales y económicas que produce esta enfermedad, disminuyendo también las cargas médico-asistenciales al hacer posible el diagnóstico de la enfermedad.

El conocimiento molecular de la enfermedad podría facilitar en el futuro, el desarrollo de la terapia génica contra esta alteración.

METODOS.

1. *Diagnóstico clínico de la DMD/DMB y clasificación clínica de esta enfermedad, en los individuos afectados.*

El diagnóstico clínico de la DMD/DMB se hizo mediante diversas pruebas clínicas y de laboratorio como, determinación en el suero de los afectados de la enzima muscular cretinina fosfocinasa (CPK), estudios histológicos en biopsias musculares para determinar cambios miopáticos y estudios electromiográficos.

Los individuos afectados fueron clasificados en no ambulatorios y ambulatorios. En el primer grupo el padecimiento fue clasificado como DMD, si los enfermos dejaron de caminar antes de los 12 años de edad y como DMB si continuaban caminando después de los 16 años. Los afectados fueron clasificados como intermedios si dejaron de caminar entre los 12-16 años de edad. En el segundo grupo los enfermos fueron clasificados como DMD o DMB de acuerdo a su evolución clínica e historia familiar. La severidad fenotípica también fue determinada de acuerdo a los criterios propuestos por Vignos, P. J. et. al. (146), los cuales evalúan la marcha y postura de los posibles afectados.

Los afectados por esta distrofia, sus padres y abuelos analizados en este estudio, nacieron en México.

Cuarenta y un distróficos pertenecen al Hospital Infantil de México "Dr. Federico Gómez", 8 al Centro Médico Nacional XXI-IMSS, 7 al Hospital General-SSA, 4 al Instituto Nacional de Ortopedia y 1 al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velázquez Suárez".

2. Método para extraer DNA a partir de sangre periférica usando SDS y Cloruro de Sodio (80).

Se tomaron 15 ml. de sangre periférica de un individuo en un tubo que contenía 2.5 ml. de EDTA al 0.5% (pH=7.6) (No debe usarse heparina porque inhibe la acción de las enzimas de restricción). Se dividió la muestra en dos y se centrifugó a 3 krpm durante 10

min. a temperatura ambiente. A partir de aquí las muestras se trabajaron de manera independiente y en forma idéntica.

Se tomó con una pipeta Pasteur la capa de leucocitos (capa blanca) de la superficie del paquete (interfase), sin importar que hubieran eritrocitos contaminantes. Esta fase se pasó a un tubo limpio y esterilizado (Corex o Falcon). Se agregaron al tubo de 30 a 40 ml. de la solución RCLB (Tris 10mM pH=7.6, Cloruro de magnesio 5mM y Cloruro de sodio 10mM). Se cubrió el tubo con parafilm y se agitó fuertemente. Se centrifugó a la muestra 3 Krpm, 10 min. a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante, de preferencia usando vacío, evitando eliminar la pastilla de leucocitos. Se repitieron los pasos 4, 5 y 6 al menos dos veces más, hasta que la pastilla de leucocitos estaba blanca.

Se resuspendió la pastilla en 886 ul. de Cloruro de Sodio 5mM agitando fuertemente con pipeta Gilson y se pasó la muestra a un tubo eppendorff esterilizado. Se agregó al tubo 46 ul. de SDS al 10% y este se agitó cerrado fuertemente. Se agregó 308 ul. de cloruro de sodio saturado al tubo y éste se agitó cerrado fuertemente. Se centrifugó el tubo 30 min. a 15 Krpm a temperatura ambiente, se tomó el sobrenadante y se realizaron con el 2 extracciones fenólicas (25:24:1 fenol:cloroformo:isoamílico). Se precipitó el DNA con 1 volumen de isopropanol o 2 volúmenes de etanol (no es necesario agregar sal en la precipitación). Se lavó la pastilla 2 veces con etanol al 70% y se resuspendió la pastilla

en 500 ul de agua desionizada esterilizada.

Finalmente se determinó la concentración y grado de pureza del DNA por espectrofotometría y gel (136). La determinación de la concentración del DNA se realizó de la siguiente manera. En una celdilla de cuarzo con 400 ul. de agua destilada se resuspendió 4 ul. de la solución de DNA problema y se determinó la densidad óptica de la solución mediante la lectura a 260 nanómetros en un espectro Beckman Du-40. Considerando que una densidad óptica de DNA bicatenario es igual a 50 ug./ml. se calculó la concentración del DNA problema.

Para establecer el grado de pureza de la solución de DNA se determinó el cociente 260/280. También se estimó la concentración del DNA en gel mediante la intensidad de fluorescencia del DNA teñido con bromuro de etidio, a través de un transiluminador de UV. de onda corta y usando un marcador de concentración conocido, como el DNA del fago lambda tratado con la restrictasa HindIII (Gibco-BRL).

3. Método para extraer DNA plasmídico (136).

Se creció la bacteria con el plásmido en 5ml. de Luria (en 1 lt. de agua destilada se disolvió 10 g. de triptona, 5 g. de extracto de levadura, 10 g. de cloruro de sodio, 1 ml. de hidróxido de sodio 2M y esterilizar), más ampicilina (20 ug/ml), durante 12 hrs. a 37°C, con agitación.

Se centrifugó el cultivo a 10 Krpm por 10 min. a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 200 ul de la solución I (50mM de glucosa, 10mM de EDTA y 25mM de Tris-HCl pH=8.0). La mezcla se dejó reposar 5 min. en hielo-agua. Se agregó a la mezcla 400 ul. de la solución II (0.2M de hidróxido de sodio y 1% de SDS), se invirtió ésta suavemente varias veces hasta su homogeneización. La mezcla se mantuvo 5 min. en hielo-agua. Se agregaron 300 ul. de solución III (3M de acetato de sodio pH=4.8) y se invirtió la mezcla suavemente varias veces. Se incubó el tubo con la mezcla en un baño etanol hielo-seco, durante 5 min. y se descongeló a temperatura ambiente.

Se centrifugó el tubo a 15 Krpm durante 15 min. a temperatura ambiente, se tomó la fase acuosa y se le agregó un volumen de isopropanol. Se dejó reposar la muestra durante 30 min. a temperatura ambiente. Se centrifugó la muestra a 15 Krpm durante 15 min. a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 30 ul. de agua desionizada esterilizada. Se precipitó el DNA plasmídico con 1/2 volumen de acetato de amonio 7.5M y 2 volúmenes de etanol absoluto, incubando durante 30 min. a -20°C. Se centrifugó la solución a 15 Krpm durante 15 min. a 4°C, se lavó la pastilla 2 veces con 1 ml. de etanol al 70%, se secó la pastilla y se resuspendió en 50 ul. de agua desionizada esterilizada.

4. Digestión del DNA plasmídico con endonucleasas de restricción (14, 136).

Se agregó a un tubo eppendorf nuevo y esterilizado un microgramo de DNA, solución amortiguadora para restricción 1X adecuada para la restrictasa a utilizar, 20 u. de la enzima de restricción y el volumen necesario de agua desionizada esterilizada, generalmente hasta obtener un volumen final de 20 ul.

Se incubó la mezcla a la temperatura y tiempo reportado para el funcionamiento de la enzima. Al terminar la restricción se tomó una alícuota y se analizó el producto de la restricción por electroforesis en geles de agarosa.

5. Restricción de DNA genómico de alto peso molecular (136).

Una vez definida la concentración de DNA genómico a restringir, se mezclaron el DNA con la solución de restricción adecuada para el funcionamiento la enzima, se incubó la muestra de 2-4 hrs a 4°C. agitando ésta con el vortex, cada 20 min. Una vez terminada la incubación se agregó una alícuota de la enzima de restricción y se agitó con el vortex la mezcla durante 2-3 min. a 4°C.

Se centrifugó la muestra unos segundos en una centrífuga eppendorf y la mezcla se incubó de 15-30 min. a la temperatura óptima para la restrictasa utilizada (HindIII). Después de la incubación se agregó la nueva alícuota de la enzima al tubo y se trabajó como en el paso 2. Se incubó la muestra a la temperatura óptima para la enzima,

durante 12 hrs.

Se precipitó la muestra con 2 volúmenes de etanol absoluto y se resuspendió en 20-30 ul. de agua desionizada esterilizada.

6. *Electroforesis en geles de agarosa (14, 136).*

En un carro de cámara electroforética previamente cerrado con cinta adhesiva se colocó un peine y se agregó agarosa al 0.8% en TBE 1X (0.089M de Tris-borato y 0.089M de ácido bórico), con bromuro de etidio (0.5 ug./ml.), previamente fundida, hasta alcanzar un grosor de 1 a 3 cm.

Una vez solidificada la agarosa, se quitó cuidadosamente el peine y la cinta adhesiva. Se colocó el carro en la cámara electroforética y se cubrió con la solución de corrida TBE 1X.

En un trozo de parafilm se mezclaron 2 ul. de colorante de corrida (0.25% de azul de bromofenol, 0.25% de cianol xileno y 30% de glicerol) y la muestra de DNA. Se tomó la muestra con una micropipeta y se depositó en el pozo del gel.

Se sometió la cámara electroforética a corriente eléctrica durante 40-60 min., utilizando un voltaje de 100-120 volts. Una vez terminada la electroforesis se observó el gel en un transiluminador de UV de onda corta y se tomó una fotografía con una cámara Polaroid modelo MP-4+.

7. *Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-urea al 6% (14, 136).*

Se preparó una solución stock al 40% de poliacrilamida mezclando 38.67 g. de Acrilamida y 1.33 g. de Bisacrilamida, se agregaron 50 ml. de agua desionizada esterilizada y la solución se agitó aproximadamente 20 min., hasta que se disolvió la acrilamida y bisacrilamida. Se aforó a 100 ml. con agua desionizada, la solución se preparó en ausencia de luz. Se agregaron 2.5 g. de amberlita a la solución stock y ésta se agitó 1 hr. a temperatura ambiente, para desionizarla. La solución fue filtrada a través de papel filtro Whatman 40 y se guardó a 4°C. en un frasco cubierto de papel aluminio.

Se lavaron los vidrios que contendrán el gel de acrilamida, con un detergente suave. Estos se enjuagaron bien con agua destilada y secaron a temperatura ambiente. Los vidrios se limpiaron con etanol industrial y se dejaron secar. Se pusieron 2 tiras plásticas en los extremos de uno de los vidrios. Estas se impregnaron previamente con grasa de silicón. Se puso otra tira plástica, también engrasada, en la parte inferior del vidrio. Se unieron los dos vidrios y sujetaron entre sí, con pinzas.

Para preparar el gel de poliacrilamida-urea 7M desnaturalizante al 6%, se mezclaron en el siguiente orden: 7.5 ml. de la solución stock de poliacrilamida al 40%, 5 ml. de TBE 10X (108 g. de Tris base, 55 g. de ácido bórico y 9.3 g. de EDTA), 21 g. de urea, 25

ml. de agua desionizada, 0.4 ml. de persulfato de amonio al 10% y 30 ul. de TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletileno diamida).

Se agregó la mezcla de poliacrilamida-urea en el espacio entre los 2 vidrios, evitando que se formen burbujas. El vaciado debe hacerse rápidamente debido a que una vez que se agrega el TEMED, la mezcla de poliacrilamida empieza a polimerizarse. Se puso un peine de los denominados diente de tiburón, en el espacio entre los vidrios y se dejó polimerizar el gel durante aproximadamente de 20-60 min.

Cuando la solución polimerizó se quitó la tira plástica inferior y el peine. El gel y los vidrios se lavaron con agua y se puso el peine con los dientes orientados hacia el gel. Se puso el gel en la cámara de electroforesis vertical y se agregó la solución de corrida TBE 1X.

Se puso la mezcla de DNA (5-7 ul) y colorante de corrida (2 ul) (98% de formamida, 10mM de EDTA, 0.1% de azul de bromofenol y 0.1% de xileno cianol) en el pozo del gel. El gel se sometió a corriente eléctrica durante 1-1.30 hrs., a 35-40 miliampers.

Una vez terminada la electroforesis se quitó el vidrio superior y se analizó el patrón de bandas mediante la tinción del gel con una solución de bromuro de etidio (0.5 ug/ml) o bien en caso de uso de nucleótidos radioactivos, el gel se secó de 30 a 60 min. y se expuso a una placa autoradiográfica de 12 a 48 Hrs, a -70 °C. Se reveló la placa y se analizó el patrón de bandas.

8. *Determinación de deleciones genéticas en el gen DMD mediante la amplificación múltiple 9 plex, de DNA genómico de enfermos de DMD/DMB (35).*

En un tubo con 20 ul., que contiene 12.5 pmoles de cada oligonucleótido, solución amortiguadora para Taq. polimerasa (16.6mM de sulfato de amonio, 67mM Tris-HCl pH=8.8, 6.7mM de cloruro de magnesio, 10mM de B-mercaptoetanol, 170 ug/ml de BSA y 6.7uM de EDTA), 1.5mM de cada dNTP y 10% de DMSO, se agregaron 200 ng. de DNA genómico y agua desionizada esterilizada, para completar 25 ul. A la mezcla se le agregó 2.5 U. de Taq. polimerasa (Gibco-BRL) y 25 ul de aceite mineral. El tubo fue colocado en el un termociclador (modelo 480 Perkin-Elmer Cetus).

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizadas en esta reacción y sus productos de amplificación se muestran en la tabla 4.

Las condiciones de amplificación fueron: Una desnaturalización inicial a 94°C., 7 min., 25 ciclos de desnaturalización (94°C., 30 seg.), alineamiento (52°C., 30 seg.), polimerización (65°C., 4 min.) y una extensión final de 7 min. a 65°C.

Una vez terminada la amplificación se tomó una alícuota (5-10 ul.) de los productos de la amplificación y se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa, como se describe anteriormente, con la diferencia de usar agarosa al 1.4%.

TABLA 4.

OLIGONUCLEOTIDOS Y PRODUCTOS DE AMPLIFICACION DEL 9 PLEX.

EXON.	SECUENCIA.	PRODUCTO AMPLIFICADO. (pb)
4	TTGTCGGTCTCCTGCTGGTCAGTC CAAAGCCCTCACTCAAACATGAAGC	196.
8	GTCCTTTACACACACTTTACCTGTTGAG GGCCTCATTCTCATGTTCTAATTAG	360.
12	GATAGTGGGCTTTACTTACATCCTTC GAAAGCACGCAACATAAGATACACCT	331.
17	GACTTTCGATGTTGAGATTACTTTCCC AAGCTTGAGATGCTCTCACCTTTTCC	416.
19	TTCTACCACATCCCATTTTCTTCCA GATGGCAAAAAGTGTGAGAAAAAGTC	459.
44	CTTGATCCATATGCTTTTACCTGCA TCCATCACCCCTTCAGAACCTGATCT	268.
45	AAACATGGAACATCCTTGTGGGGAC CATTCCTATTAGATCTGTGCGCCCTAC	547.
48	TGGAATACATGGTTAAATCCCAACATG CCTGAATAAAGTCTTCCTTACCACAC	506.
51	GAAAATTGGCTCTTTAGCTTGTGTTTC GGAGAGTAAAGTGATTGGTGAAAATC	388.

9. *Determinación de deleciones genéticas en el gen DMD, mediante la amplificación múltiple 5 plex, de DNA genómico de enfermos de DMD/DMB (35).*

En un tubo con 20 ul., que contiene 12.5 pmoles de cada oligonucleótido, solución amortiguadora para Taq polimerasa (16.6mM de sulfato de amonio, 67mM de Tris-HCl pH=8.8, 6.7uM de cloruro de magnesio, 10mM de B-mercaptoetanol, 170 ug/ml. de BSA y 6.7uM de EDTA), 1.5mM de cada dNTP y 10% de DMSO, se agregaron 200 ng de DNA genómico y agua desionizada esteril, para completar 25 ul.

A la mezcla se le agregó 2.5 U. de Taq polimerasa (Gibco-BRL) y 25 ul de aceite mineral.

La secuencia de oligonucleótidos utilizadas en esta reacción y sus productos de amplificación, están descritos en la tabla 5.

Las condiciones de amplificación fueron: Desnaturalización inicial a 94°C., 6 min., 25 ciclos de desnaturalización (94°C., 30 seg.), alineamiento (54°C., 30 seg.), polimerización (65°, 4 min.) y una extensión final de 7 min. a 65°C.

Se tomó una alícuota (5-10 ul.) de los productos de la amplificación y ésta se sometió a electroforesis en un gel de agarosa, como se comenta anteriormente, con la diferencia de usar agarosa al 1.4%.

TABLA 5.

OLIGONUCLEOTIDOS Y PRODUCTOS DE AMPLIFICACION DEL 5 PLEX.

EXON.	SECUENCIA.	PRODUCTO AMPLIFICADO. (pb) .
PROMOTOR	GAAGATCTAGACAGTGGATACATAACAAATGCATG TTCTCCGAAGGTAATTGCCTCCCAGATCTGAGTCC	535.
13	AATAGGAGTACCTGAGATGTAGCAGAAAT CTGACCTTAAAGTTGTTCTTCCAAAGCAG	238.
43	GAACATGTCAAAGTCACTGGACTTCATGG ATATATGTGTACCTACCCTGTGCGGTCC	357.
50	No publicada.	712.
52	AATGCAGGATTTGGAACAGAGGCGTCC TTCGATCCGTAATGATTGTTCTAGCCTC	113.

10. Detección de portadoras para la DMD/DMB, mediante PCR, usando repetidos variables de CA de los intrones 44, 45, 49 y 50 del gen DMD (27).

En 15 ul. de volumen final se mezclaron 20 ng. de DNA genómico, 1.5 ul. de solución amortiguadora Cetus 10x (100mM de Tris-HCl pH=8.3, 500mM de Cloruro de Potasio y 15mM de Cloruro de Magnesio), 1.2 ul. de una solución de dNTP's 2.5mM , 1.5 ul. de una solución 0.2M del nucleótido contraparte del radioactivo, 15 pmoles de cada

oligonucleótido (STR 44, 45, 49) y 2.5 pmoles de cada oligonucleótido STR 50 (STR 44 se coamplifica con STR 49 y STR 45 con STR 50), 0.2 ul. de desoxicitosina 5' (alfa ³²P) trifosfato (2uCi), 1 U. de Taq polimerasa (Gibco-BRL) y 15 ul. de aceite mineral.

Las secuencias de oligonucleótidos utilizadas en esta reacción están descritas en la tabla 6.

Las condiciones de amplificación fueron: Una desnaturalización inicial a 94°C., 5 min., 23 ciclos de desnaturalización (94°C., 30 seg.), alineamiento (62°C., 30 seg.), polimerización (65°C., 2 min.) y un extensión final de 5 min. a 65°C.

Una vez terminada la amplificación se tomó una alícuota (5-6 ul.) de los productos de la amplificación, se mezclaron con medio volumen de colorante de corrida (98% de formamida, 10mM EDTA, 0.1% de azul de bromofenol, 0.1% de cinol xileno), se calentó la mezcla a 90°C durante 3 min. y se sometió a una electroforesis en geles de desnaturalizantes de poliacrilamida-urea al 6%. Se secó el gel y se expuso a una placa autoradiográfica como se describe anteriormente. Se reveló la placa autoradiográfica y se analizó el patrón de bandas observadas en ella.

TABLA 6.

SECUENCIA DE OLIGONUCLEOTIDOS DE LOS INTRONES 44, 45 49 Y 50.

LOCUS/OLIGO	SECUENCIA DEL OLIGO.
DMD44/A	TCCAACATTGGAAATCACATTCAA
DMD44/B	TCATCACAAATAGATGTTTCACAG
DMD45/A	GAGGCTATAATTCITTAACCTTGGC
DMD45/B	CTCTTCCCTCTTTATTTCATGTAC
DMD49/A	CGTTTACCAGCTCAAAATCTCAAC
DMD49/B	CATATGATACGATTCGTGTTTTGC
DMD50/A	AAGGTTCCCTCCAGTAACAGATTTGG
DMD50/B	TATGCTACATAGTATGTCCCTCAGAC

11. Detección de portadoras para la DMD/DMB, mediante PCR, usando repetidos variables de CA de la región 5' del gen DMD (52).

En 50 ul. de volumen final se mezclaron 400 ng. de DNA genómico, 5 ul. de solución amortiguadora Cetus 10x (100mM de Tris-HCl pH=8.3, 500mM de Cloruro de Potasio y 15mM de Cloruro de Magnesio), 4 ul. de una solución de dNTP's 2.5mM, 5 ul. de una solución 1mM del nucleótido contraparte del radioactivo, 15 pmoles de cada oligonucleótido (Dys II 5' y Dys II 3'), 2uCi de deoxicitosina 5' (alfa ³²P) trifosfato, 2.5 U. de Taq polimerasa (Gibco-BRL) y 50 ul. de aceite mineral.

Las secuencias de oligonucleótidos utilizadas en esta reacción fueron: TCTGATATATAGGGATTATTTGTGTTGTTATAC (Dys II 5') y ATTATGAAACTATAAGGAATAACTCATTTAGC (Dys II 3').

Las condiciones de amplificación fueron: Una desnaturalización inicial a 94°C., 5 min., 24 ciclos de desnaturalización (94°C., 30 seg.), alineamiento (55°C., 30 seg.), polimerización (63°C., 4 min.) y un extensión final de 10 min. a 63°C.

Una vez terminada la amplificación se tomó una alícuota (5-6 ul.) de los productos de la amplificación y se sometieron a una electroforesis en geles de desnaturalizantes de poli(acrilamida-urea) al 6%, como se describe anteriormente. Se secó el gel y se expuso a una placa autoradiográfica como se describe anteriormente. Se reveló la placa autoradiográfica y se analizó el patrón de bandas observadas en ella.

12. Detección de portadoras para la DMD/DMB, mediante PCR, usando repetidos variables de CA de la región 3' del gen DMD (127).

En 30 ul. de volumen final se mezclaron 300 ng. de DNA genómico, 3 ul. de solución amortiguadora Cetus 10x (100mM de Tris-HCl pH=8.3, 500mM de Cloruro de Potasio y 10mM de Cloruro de Magnesio), 2.4 ul. de una solución de dNTP's 2.5mM, 3 ul. de una solución 1mM del nucleótido contraparte del radioactivo, 15 pmoles de cada oligonucleótido (Dys II 5' y Dys II 3'), 2uCi de deoxicitosina 5' (alfa ³²P) trifosfato, 1 U. de Taq polimerasa (Gibco-BRL) y 15 ul.

de aceite mineral.

Las secuencias de oligonucleótidos utilizadas en esta reacción fueron: TGTCTGTCTTCAGTTATATG (GT 5') y ATAACTTACCCAAGTCATGT (CA 3').

Las condiciones de amplificación fueron: Desnaturalización inicial a 94°C., 6 min., 25 ciclos de desnaturalización (94°C., 2 min.), alineamiento (50°C., 2 min.), polimerización (72°C., 1 min.) y una extensión final de 5 min. a 65°C.

Una vez terminada la amplificación se tomó una alícuota (5-6 ul.) de los productos de la amplificación y se sometió a una electroforesis en geles de desnaturalizantes de poliacrilamida-urea al 6%, como se describe anteriormente. Se secó el gel y se expuso a una placa autoradiográfica como se describe anteriormente. Se reveló la placa autoradiográfica y se analizó el patrón de bandas observadas en ella.

13. Origen de las sondas de cDNA.

Las sondas de cDNA del gen DMD, utilizadas en el presente trabajo fueron obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC) y están descritas por Koenig *et. al.* (87). En la tabla 7 se describen sus características.

TABLA 7.
 SONDAS DE cDNA DEL GEN DMD.

NOMBRE.	PLASMIDO.	ENZIMAS PARA LIBERAR EL INSERTO.	TAMAÑO.	EXONES QUE CONTIENEN
1-2a	pBS	HindIII/EcoRI	1.5 kb.	1-12.
2b-3	pBS	EcoRI	1.1 kb.	13-21.
4-5a	pBS	EcoRI	1.8 kb.	22-32.
5b-7	pBSIIKS	EcoRI	2.5 kb.	31-47.
8	pBSIIKS	EcoRI	0.9 kb.	47-52.
9	pBSIIKS	BamHI/EcoRI	1.1 kb.	53-58.
10	pBSIIKS	BamHI/EcoRI	0.5 kb.	58-65.
11-14	pBSIIKS	BamHI/EcoRI	4.5 kb.	66-79.

14. *Aislamiento de inciertos de cDNA.*

Una vez terminada la restricción del DNA plasmídico recombinante que contiene el cDNA del gen DMD, los productos fueron separados por una electroforesis en agarosa al 0.8%. Se cortó la banda de interés del gel de agarosa. Se maceró el trozo de agarosa y se puso en un tubo eppendorf. A éste se le agregó medio volumen de TBE modificador (si se usó TBE 1X como solución amortiguadora de corrida) y 4.5 volúmenes de yoduro de sodio. La mezcla se incubó 5 min. a 45-50°C. Una vez terminada la incubación se agregaron al tubo 5 ul. de perlas de vidrio (glassmilk) y se agitó éste con vortex.

Se incubó el tubo 10 min. en hielo y se centrifugó para obtener una pastilla del DNA-perlas de vidrio. Se eliminó el sobrenadante y se lavó 3 veces la pastilla con etanol absoluto helado. Se eluyó 2 veces la pastilla con 15 ul. de agua desionizada esterilizada.

15. Marcaje de sondas de cDNA.

En un tubo ependorf se mezcló 25 ng. de DNA a marcar, 0-23 ul. de agua desionizada esterilizada y 10 ul. de nanómeros al azar.

La mezcla se calentó 5 min. a 94°C y se centrifugó 1 min. a temperatura ambiente, en una centrífuga Eppendorf. Se agregaron 10 ul. de solución amortiguadora 5X con los dNTP's, 100uCi de desoxicitosina 5' (alfa ³²P) trifosfato y 1 ul. de polimerasa Klenow exo (-) (5 U/ul.). El volumen final de reacción fue de 50 ul. El tubo se incubó a 37°C., 20 min. Se adicionaron 2 ul. de EDTA 0.5M, para detener la reacción.

La sonda marcada se precipitó con 1/2 volumen de acetato de amonio 7.5M y 2 volúmenes de etanol absoluto. Se resuspendió la sonda en 50 ul. de agua desionizada esterilizada.

16. Determinación de la incorporación de ³²P y la actividad específica de las sondas marcadas.

Después de la reacción de marcaje (ver protocolo anterior), se tomó 1 ul. y se diluyó en 99 ul. de EDTA 0.2M. Se alicuotaron por duplicado 3 ul. de la mezcla anterior sobre papel filtro Whatman DE 81, se permitió que las gotas secan durante aproximadamente 15

min. Se lavó uno de los papeles 2 veces con 50 ml. de una solución 2x de SSC (0.3M de cloruro de sodio y 0.03M de citrato de trisodio), 5 min. con agitación a temperatura ambiente. Se lavó una vez más el papel de acuerdo a las condiciones anteriores, pero utilizando etanol absoluto previamente enfriado a -20 °C.

Una vez secos ambos papeles se pusieron por separado en viales de centelleo y se agregó a cada vial 5 ml. de tolueno-onminofluor (1 gr de onminofluor por 1000 ml. de tolueno).

Se determinó la cantidad de cuentas por millón (cpm) presentes en los papeles, mediante un contador de centelleo Beckman modelo LS 6000sc. El promedio de la cantidad de marca en el papel sin lavar indicó la radioactividad total en la reacción y la determinada en el papel lavado la incorporación del nucleótido radioactivo a la sonda. La actividad específica de la sonda se determinó mediante la siguiente ecuación.

$$SA = ((uCi) (2.2 \times 10^9) (P)) / (M_1 + ((1.3 \times 10^3) (P) (uCi/S)))$$

Donde:

SA= Actividad específica en dpm/ug.

uCi= Cantidad de uCi. del nucleótido radioactivo utilizado en la reacción de marcaje.

P= Porcentaje de incorporación del nucleótido radioactivo en la sonda de DNA, obtenido de dividir las cpm del papel lavado entre las cpm del papel sin lavar.

M_1 = Cantidad de la sonda utilizada en el marcaje, expresada en nanogramos.

S = Actividad específica del nucleótido radioactivo, expresada en Ci/mmol.

17. Análisis de DNA genómico de enfermos de DMD mediante hibridaciones tipo Southern (136).

Se restringieron 10 ug. de DNA genómico de acuerdo al protocolo 5, utilizando la restrictasa HindIII. Una vez terminada la restricción se separaron los productos de ésta mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, sin bromuro de etidio, utilizando geles grandes (25 cm.) y corriendo los productos durante dos días a bajo voltaje 20-25 volts.

Después de terminar la electroforesis se tomó una fotografía del gel utilizando una cámara Polaroid MP-4+. Se puso el gel en una palangana que contenía una solución despurinizadora (0.25M de ácido clorhídrico concentrado). Esta solución debe cubrir completamente el gel. Se agitó la solución con el gel a temperatura ambiente, 15 min. Se eliminó la solución y se repitió lo anterior una vez más.

Se eliminó la solución despurinizadora y se lavó el gel con agua destilada unos segundos. Se eliminó el agua destilada y se agregó la solución desnaturizante (1.5M de cloruro de sodio y 0.5M de Hidróxido de sodio), la cual debe cubrir completamente el gel. Se incubó 30 min. a temperatura ambiente con agitación.

Se eliminó la solución desnaturalizante y se lavó con agua destilada unos segundos. Se eliminó el agua destilada y se agregó la solución neutralizante (1.5M de cloruro de sodio, 0.5M de Tris-HCl pH=7.2 y EDTA 1mM), cubriendo todo el gel. Se incubó 15 min. a temperatura ambiente con agitación. Se repitió este paso una vez más. Se eliminó la solución neutralizante y se preparó la transferencia.

Se agregó en una palangana 1 lt. de solución de transferencia 10x de SSC (1.5M de cloruro de sodio y 0.15M de citrato de trisodio). Se puso una esponja sobre la solución, permitiendo que ésta quedara completamente impregnada de la solución. Sobre la esponja se pusieron 3 papeles Whatman 3MM, previamente impregnados con la solución de transferencia. Los papeles se pusieron uno sobre otro y el tamaño fue aproximado al del gel. Se puso el gel sobre los papeles Whatman. Los pozos se orientaron hacia los papeles. Se puso la membrana de nylon Hybon N sobre el gel. La membrana fue del mismo tamaño del gel y se impregnó con la solución de transferencia. Sobre la membrana se pusieron 3 papeles Whatman 3MM, previamente impregnados con la solución de transferencia. Los papeles tenían el tamaño aproximado del gel. Se puso un grupo de sanitas sobre los papeles Whatman, hasta alcanzar una altura de aproximadamente 5 cm. Las sanitas deben tener un tamaño aproximado del gel y no deben tocar la solución de transferencia. Se puso sobre las sanitas un peso de 0.5-1 Kg. Se permitió la transferencia del DNA del gel a la membrana, al menos durante 12 hrs y después de

la transferencia se desmanteló cuidadosamente el sistema.

La membrana se lavó con 2X de SSC (0.3M de cloruro de sodio y 0.03M de citrato de trisodio) y se dejó secar a temperatura ambiente de 10-20 min. Con la finalidad de verificar la transferencia se retifó el gel con bromuro de etidio y se observó a través de un transiluminador de UV. de onda corta.

Se incubó la membrana en un horno al vacío, durante 2 hrs. a 80°C y posteriormente con 10 ml. de solución de prehibridación (3X de SSC, 0.5% de SDS, 0.30 mg. de RNA previamente desnaturizado, 5x de solución Denharts (BSA al 0.1%, Ficoll al 0.1% y polivinilpiridolina al 0.1%) y 49mM de fosfato de sodio), 2 hrs. a 65°C.

Se desnaturizó la sonda por calentamiento a 94°C. 5 min. y se adicionó a la solución de prehibridación. La mezcla se incubó al menos 12 hrs. a 65°C. Después de la incubación se eliminó la solución de hibridación.

Se lavó la membrana en condiciones de astringencia media (1x de SSC, SDS al 1%) 10 min. a 65°C. Las veces que fue necesario hasta que la membrana sonó de manera específica y de 150 a 200, en la escala 1X de un contador Geiger (modelo Pug1).

Se dejó secar la membrana entre dos sanitas, a temperatura ambiente

de 30-40 min. Se metió la membrana a una bolsa de plástico transparente y se expuso a una placa autoradiográfica en un cassette con pantallas intensificadoras, de 5-10 días, a -70°C. Se reveló la placa y se analizó el patrón de bandas.

RESULTADOS.

1. Obtención de un banco genómico, a partir de individuos afectados con DMD/DMB y sus familiares.

Se extrajo el DNA de linfocitos a partir de 15 ml. de sangre periférica, de 61 enfermos de DMD/DMB y 40 individuos pertenecientes a 5 familias diferentes, con antecedentes de distrofia, utilizando los procedimientos descrito en métodos.

Las concentraciones de DNA obtenidas fueron optimas, en promedio de 250-500 ng/ul y con una pureza de 1.5 a 2 unidades de absorbancia. Estos DNA's no mostraron degradación después de la extracción y pudieron ser restringidos por diversas endonucleasas de restricción. Este método se eligió después de probar otros métodos como el de extracciones fenólicas o el de CTAB-DTAB (61, 81, 136)

2. Localización de deleciones genéticas en enfermos de DMD/DMB, mediante la amplificación múltiple 9 y 5 plex.

Con la finalidad de determinar la localización de las posibles deleciones genéticas en los enfermos mexicanos de DMD/DMB, así como la distribución general de éstas en el gen DMD en la población

mexicana, el DNA de cada uno de los 61 individuos afectados por esta distrofia fue amplificado mediante la técnica de amplificación múltiple 9 y 5 plex, como se describe en métodos.

En la figura 1 se muestran los productos de amplificación, producidos a partir del DNA genómico de diversos individuos mexicanos afectados por esta distrofia y utilizando el 9 plex (A) y el 5 plex (B). Como se puede observar en (A), los individuos 4.1, 4.5, 5.1, 5.2, 6.2 y 6.3, presentaron deleciones que abarcan desde 1 hasta 3 exones diferentes (exones deletados 8, 17, 45, 48 y 51). Al utilizar la otra estrategia de amplificación múltiple observamos que solamente los individuos 4.6 y 20.1 presentaron deleciones del exon 50 (B).

En la Fig. 2 se muestra la distribución de las deleciones obtenidas de la amplificación múltiple 9 y 5 plex, del DNA genómico de los 61 individuos analizados. El porcentaje de enfermos de DMD/DMB con deleciones en el gen DMD, fue del 45% (28/61). La mayor parte de las deleciones se localizaron en el punto caliente mayor (exones 44-52), con un porcentaje del 85.7% y solamente el 14.2% de éstas se localizaron en el punto caliente menor.

3. Extensión de las deleciones genéticas en el punto caliente mayor del gen DMD, en los individuos afectados por DMD/DMB.

Para la delimitación de la extensión de las deleciones genéticas en el punto caliente mayor de los individuos afectados por DMD/DMB se

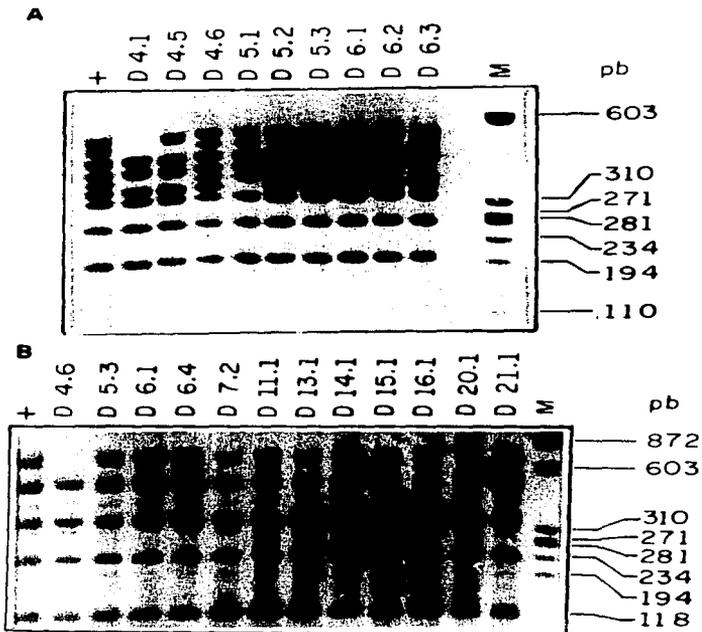


Fig. 1: Amplificación multiplex de DNA genómico de 18 enfermos mexicanos con DMD/DMB. El DNA obtenido a partir de leucocitos fue amplificado como se describe en métodos. Una alícuota de cada muestra se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 1.4% y se tiñó con bromuro de etidio. (A) Amplificación con el 9 plex. (B) Amplificación con el 5 plex. (+) Control positivo (productos de amplificación de un individuo sin deleciones). (M) Marcador de tamaño, OX174 digerido con Hae III. Se indican los tamaños de las bandas del marcador en pares de bases (pb).

Fig. 2

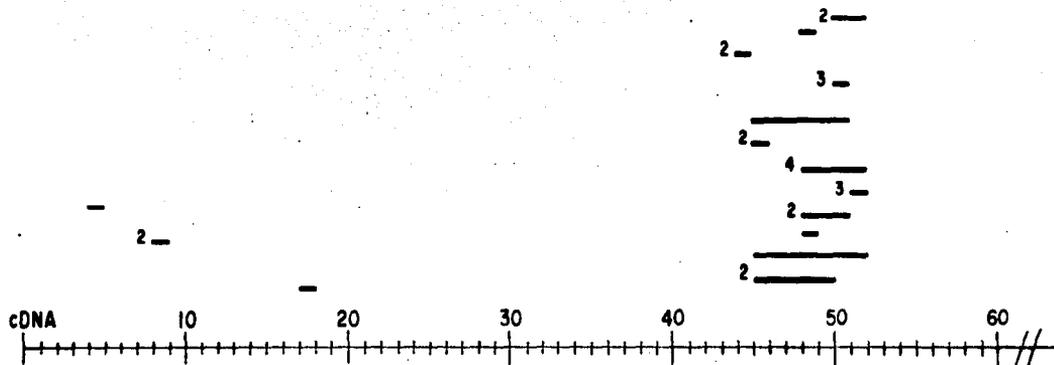


Fig. 2: Distribución de deleciones en el cDNA del gen DMD, obtenida mediante 9 y 5 plex. La línea central ilustra el cDNA del gen DMD y sus exones. Las líneas en la parte superior del cDNA ilustran las deleciones y los números, las veces que se encontraron.

realizaron 2 estrategias diferentes, PCR e hibridaciones Southern.

Mediante el análisis del patrón de deleciones obtenido por la amplificación múltiple 9 y 5 plex del DNA genómico de los enfermos de DMD/DMB, se pudo delimitar en 11 enfermos la extensión de la deleción genética.

En la segunda estrategia se delimitó la extensión de las deleciones genéticas mediante ensayos de hibridación tipo Southern y usando sondas de cDNA del gen DMD. Para realizar las hibridaciones tipo Southern lo primero que se hizo fue restringir el DNA humano de alto peso molecular, con la enzima de Hind III, como se describe en métodos.

En la Fig. 3 se muestra el patrón de restricción de DNA humano de alto peso molecular (5, 10 y 20 microgramos), con la enzima HindIII, durante 12 hrs.

El DNA restringido se sometió a una electroforesis en gel de agarosa, como se describe en métodos. Una vez terminada ésta, el gel fue desnaturalizado, neutralizado y los productos transferidos a una membrana de nylon, que se fijó con calor como se describe en métodos.

Para generar las sondas radioactivas de cDNA del gen DMD primero se liberaron éstas, mediante el corte del plásmido que las contenía,

M 1 2 3

23,130

9416

6557

4361

2322

2027

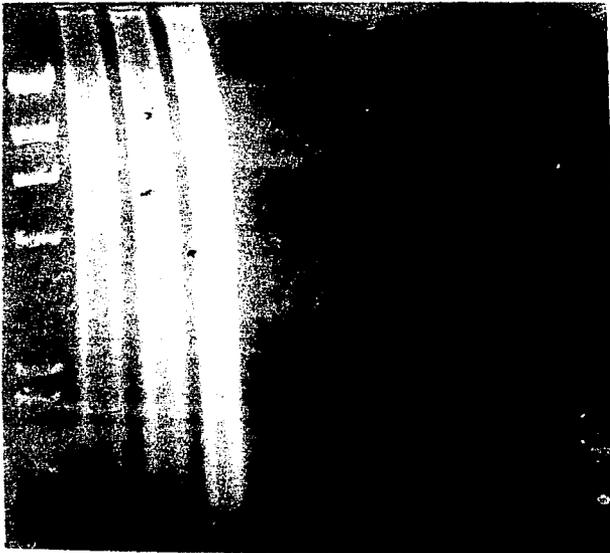


Fig. 3: Patrón del DNA genómico humano restringido con la endonucleasa HindIII. La restricción del DNA genómico humano se realizó como se describe en métodos. Los productos de la restricción fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 0.8% y teñidos con bromuro de etidio. (1) Producto de la restricción utilizando 5 ug de DNA genómico. (2) Producto de la restricción utilizando 10 ug de DNA genómico. (3) Producto de la restricción utilizando 20 ug de DNA genómico. (M) Marcador de peso molecular, lambda HindIII. Se indica el tamaño de las bandas en pares de bases.

utilizando la restrictasa adecuada (ver métodos). En la Fig. 4 y 5 se muestran unas fotografías de geles de agarosa en donde se ilustra el corte de plásmidos recombinantes con endonucleasas, para liberar los insertos 2b-3, 5b-7, 8, 9, 10 y 11-14, de cDNA del gen DMD. Como se puede observar cada plásmido liberó el inserto esperado (ver tabla 7). A continuación éstos fueron purificados a partir del gel (ver métodos). En la Fig. 6 se muestra una fotografía de un gel de agarosa en donde se observan 3 diferentes insertos purificados. Los tamaños corresponden a los insertos esperados (ver tabla 7), la concentración de DNA de cada inserto fue de 5-10 ng/ul, obtenida a partir de 2-3 ug de plásmido más inserto.

Los insertos purificados fueron marcados con un isótopo radioactivo mediante la técnica de oligos al azar (ver métodos). La actividad específica obtenida, en promedio, para cada sonda fue de $1.3-1.5 \times 10^9$ y el porcentaje de incorporación varió entre 22 al 45%.

Con estas sondas radioactivas se hicieron ensayos de hibridación contra DNA genómico control y de 7 enfermos de DMD/DMB con eliminaciones en el punto caliente mayor, como se describe en métodos. En la Fig. 7 se muestra una autoradiografía en donde se hibridó el inserto de cDNA 8 marcado contra 3 concentraciones diferentes de DNA genómico humano. Esta sonda reconoce a los exones 47-52 y produce 7 bandas de 10, 7, 3.8, 3.7, 3.1, 1.6 y 1.25 kb cuando se hibrida con DNA genómico tratado con la enzima de

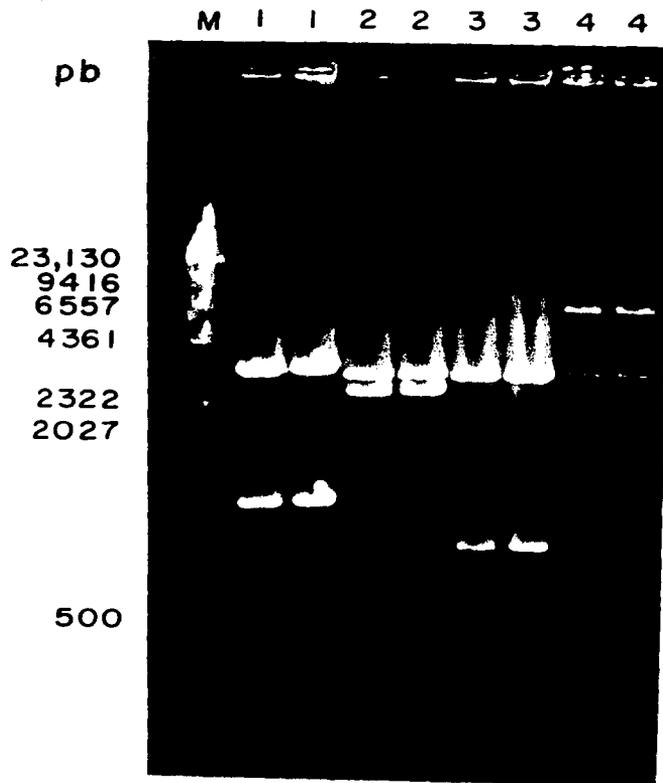


Fig. 4: Patrón de restricción de plásmidos recombinantes con insertos de cDNA del gen DMD. Los plásmidos pBS con cDNA 2b-3, bluescript KS con cDNA 5b-7, bluescript KS con cDNA 8 y bluescript KS con cDNA 9-14 fueron cortados con la endonucleasa EcoRI, como se describe en métodos. Los productos de restricción de cada plásmido fueron sometidos, por duplicado, a electroforesis en geles de agarosa al 0.8% y teñidos con bromuro de etidio. (1) Plásmido mas inserto 2b-3. (2) Plásmido mas inserto 5b-7. (3) Plásmido mas inserto 8. (4) Plásmido mas inserto 9-14. (M) Marcador de peso molecular, lambda HindIII, se indica el tamaño de las bandas en pares de bases.

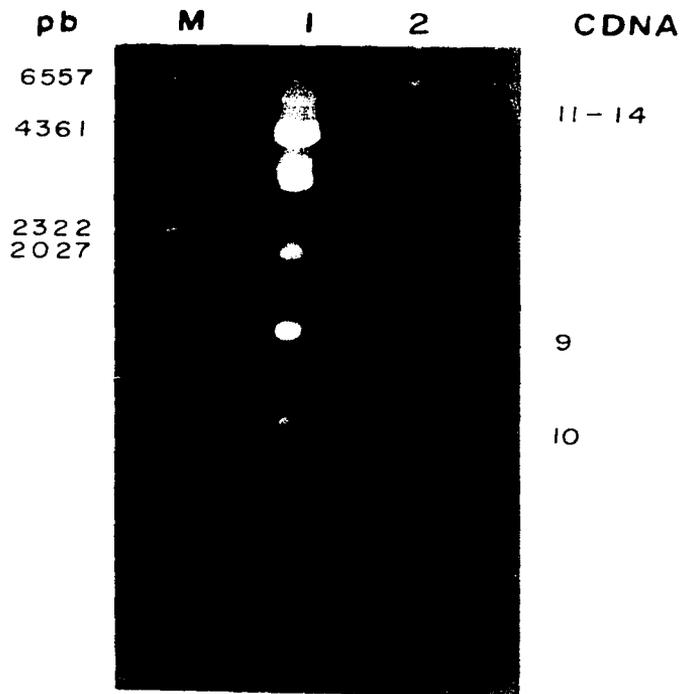


Fig. 5: Patrón de restricción del plásmido recombinante bluescript KS con el inserto 9-14. Se hizo una doble restricción con las endonucleasas EcoRI y BamHI, los productos de la doble restricción se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 0.8% y se tiñeron con bromuro de etidio. (1) Restricción del plásmido recombinante bluescript y liberación de los cDNAs 9, 10, 11-14. (2) Plásmido sin restringir. (M) Marcador de tamaño, lambda HindIII, se indican los tamaños de los fragmentos en pb.

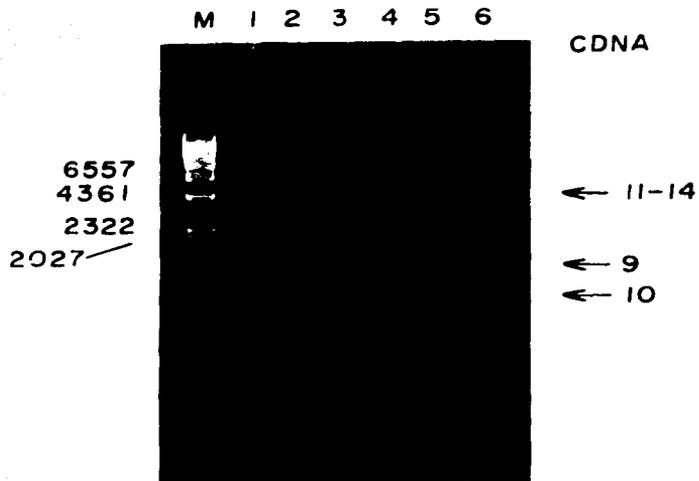
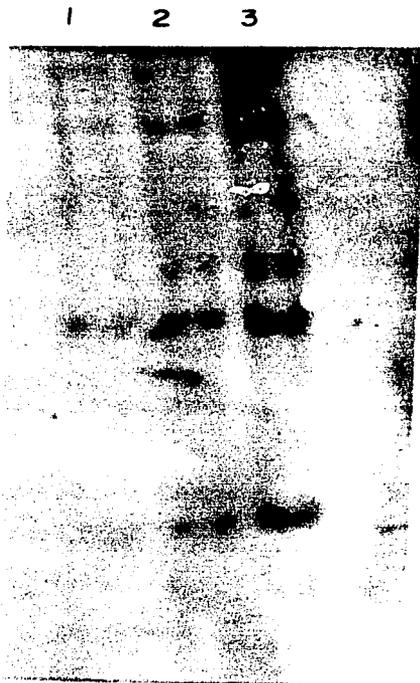


Fig. 6: Purificación de insertos de cDNA del gen DMD por "Gen clean". Los insertos de cDNA 9, 10 y 11-14 fueron purificados mediante el el paquete comercial "Gen clean", como se describe en métodos. Los productos purificados fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 0.8% y teñidos con bromuro de etidio. (1) 1 ul de cDNA 9. (2) 3 ul de cDNA 9. (3) 1 ul de cDNA 10. (4) 3 ul de cDNA 10. (5) 1 ul de cDNA 11-14. (6) 3 ul de cDNA 11-14. (M) Marcador de tamaño, lambda HindIII, se indican los tamaños de los fragmentos en pb.

restricción Hind III. Como se puede observar aparecieron las 7 bandas esperadas (41), en cada uno de los 3 carriles. Debido a que no se observó una diferencia significativa entre 10 y 20 ug., se optó por continuar las hibridaciones tipo Southern con 10 ug. solamente.

Con la finalidad de delimitar la extensión de las deleciones hacia el extremo 3' del gen DMD, en afectados por esta distrofia, se hibridó el inserto cDNA9 contra el DNA de 6 individuos con deleciones hasta el exon 52. En los individuos analizados se observó la banda del exon 55 y por lo tanto la deleción no se extiende mas allá del exon 54. En los individuos 4.1 y 31.1 la deleción llegó hasta el exon 53 y en los individuos 50.1, 51.1, 7.4 y 8.1 hasta el exon 54.

La delimitación de la extensión de las deleciones en el punto caliente mayor de los individuos faltantes se realizó mediante la amplificación de los exones 46, 47, 49 (30). Con los datos obtenidos en ese trabajo y por medio del Southern las frecuencias de deleciones y la distribución de éstas en las 2 regiones con mayor frecuencia de deleciones se modificaron poco, siendo que el 50.8% de los enfermos mexicanos de DMD/DMB analizados tuvieron deleciones en el gen DMD y el 49.1% no. La frecuencia de deleciones en el punto caliente mayor fue del 87% y del 12.9% en el punto caliente menor.



III
 Frag. Hind
 Exon

10 (47)

7.0 (52)

3.8/3.7 (48.50)

3.1 (51)

1.6 (49)

1.25 (48)

Fig. 7: Hibridación tipo Southern de la sonda cDNA 8 con DNA genómico humano utilizando una sonda marcada con ^{32}P y con actividad específica de 50×10^6 . El DNA obtenido de linfocitos fue digerido con la enzima HindIII y la hibridación se hizo como se describe en métodos. (1) 5 ug de DNA genómico cortado con HindIII. (2) 10 ug de DNA genómico cortado con HindIII. (3) 20 ug de DNA genómico cortado con HindIII. Se indica el tamaño de los fragmentos HindIII y sus exones correspondientes.

En la tabla 8 se muestra la frecuencia de deleciones en los diversos exones del gen DMD de los 61 individuos analizados, mediante PCR e hibridaciones Southern. Los exones con mayor porcentaje de deleción fueron el 50 con 16.1% y el 51 con 13.1%. En la región promotora de músculo del gen DMD y sus exones 12, 13, 19 y 43 no se detectaron deleciones en ninguno de los enfermos analizados.

En la Fig. 8 se muestra la extensión de las deleciones localizadas en el punto caliente mayor, de los individuos analizados por PCR y por hibridaciones Southern. Como se puede observar las deleciones no se extienden más allá del exon 54 del gen DMD.

4. Predicción del marco de lectura en los enfermos DMD/DMB, con deleciones genéticas en el punto caliente mayor y correlación entre las características clínicas y el análisis molecular de las deleciones, en estos enfermos.

Mediante la delimitación de la extensión de las deleciones en el punto caliente mayor del gen DMD, se determinó si el marco de lectura de éste se encontraba en fase o no en los enfermos estudiados en este trabajo.

De 27 distróficos con deleciones en el punto caliente mayor, en 25 el marco de lectura no se encontraba en fase y en 2 sí.

TABLA 8.

PORCENTAJE DE DELECCIONES EN LOS EXONES DEL GEN DMD, OBTENIDOS MEDIANTE PCR E HIBRIDACIONES SOUTHERN.

EXON	PORCENTAJE.
Pm-----	0
4-----	1.1
8-----	2.2
12-----	0
13-----	0
17-----	0
19-----	0
43-----	0
44-----	2.2
45-----	6.7
46-----	10.1
47-----	10.1
48-----	12.3
49-----	11.2
50-----	16.8
51-----	13.4
52-----	6.7
53-----	3.3
54-----	2.2
55-----	0.0

Fig. 8

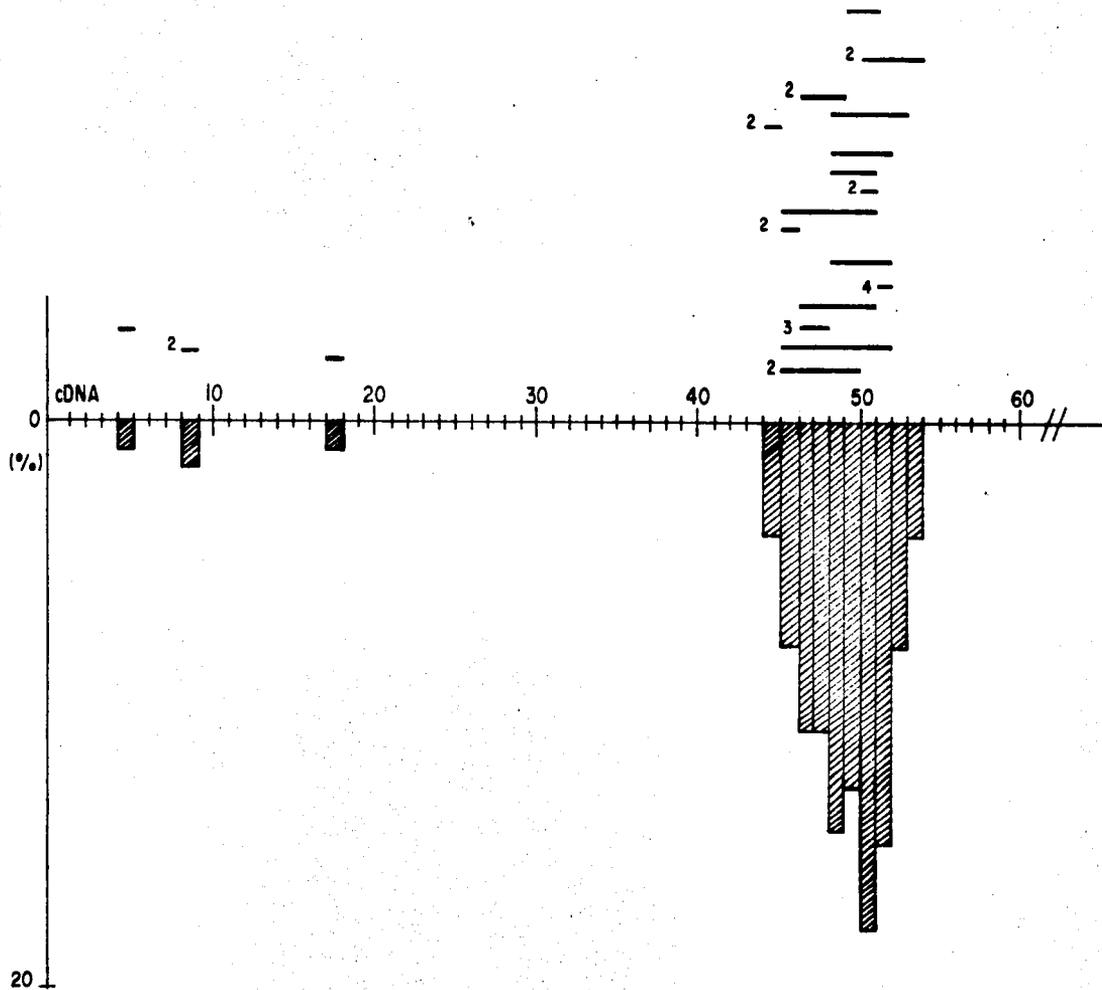


Fig. 8: Extensión de deleciones genéticas en el cDNA del gen DMD, obtenida mediante amplificación multiplex e hibridaciones tipo Southern. La línea central ilustra el cDNA del gen DMD y sus exones. Las líneas en la parte superior del cDNA ilustran las deleciones y los números, las veces que se encontraron. Las barras en la parte inferior del cDNA indican el porcentaje de deleciones.

En la tabla 9 se muestra la relación entre los datos clínicos de 16 enfermos de DMD/DMB y el análisis molecular obtenido en este trabajo. En 13 de estos enfermos se encontró una correlación entre la predicción de ruptura del marco de lectura y la severidad de la enfermedad. Los individuos afectados 9.1, 10.1 y 7.3 no mostraron una correlación entre la predicción del marco de lectura y el fenotipo esperado. En los dos primeros la deleción mantiene el marco de lectura abierto, sin embargo presentaron DMD. En el individuo 7.3 la deleción alteró el marco de lectura, sin embargo el individuo presentó DMB.

5. Diagnóstico de portadoras para la DMD/DMB, mediante PCR, usando repetidos variables de CA, de los intrones 44, 45, 49, 50 y de los extremos 5' y 3', del gen DMD.

Se realizó el diagnóstico de portadoras en 21 mujeres en riesgo, pertenecientes a 5 familias con antecedentes de DMD/DMB. Para esto se amplificaron las regiones polimórficas de repetidos de CA de los intrones 44, 45, 49, 50 y de dos regiones en los extremos 5' y 3' del gen DMD, como se describe en métodos.

Los productos de amplificación de cada región fueron sometidos a electroforesis en geles de acrilamida al 6% (ver métodos). El patrón producido consistió en una o más bandas, a las que se le asignaron letras, en cada familia analizada la banda o alelo A fue el mas pequeño.

RELACION FENOTIPO-GENOTIPO EN LOS ENFERMOS DE DMD/DMB, CON DELECCIONES GENETICAS EN EL PUNTO CALIENTE MAYOR DEL GEN DMD.

ENFERMO	EDAD A LA DEJO DE CAMINAR (AÑOS)	CPK	HISTORIA FAMILIAR	GRAVEDAD	EXONES DEL.	MARCO DE LEC
NO CAMINA						
4.1	8	230	NO	DMD/GRAVE	45-52	FF
4.5	9	-	SI	DMD/GRAVE	48-52	FF
5.2	15	1352	NO	INT/MODERADA	46-48	FF
6.2	8	3470	NO	DMD/GRAVE	46-51	FF
6.5	9	1648	NO	DMD/MODERADA	51	FF
7.1	10	1636	NO	DMD/MODERADA	45-50	FF
7.4	8	5600	NO	DMD/GRAVE	48-52	FF
9.1	9	7440	NO	DMD/GRAVE	45-51	EF
10.1	11	1550	NO	DMD/MODERADA	48-51	EF
18.1	12	-	SI	DMD/MODERADA	45	FF
19.1	13	2534	NO	INT/MODERADA	45	FF
20.1.	8	276	NO	DMD/GRAVE	50	FF
CAMINA						
4.6	-	6008	NO	DMD/MODERADA	50	FF
7.3	-	3796	NO	DMB/MODERADA	44	FF
12.1	-	1174	NO	*/MODERADA	51	FF
26.1	-	2068	NO	*/MODERADA	46-47	FF

Tabla 9. Se consideraron solamente los individuos con deleciones en el punto caliente mayor y con datos clínicos. (Exones del.) Exones deletados. (Marco de Lec) Marco de lectura. (*) Muy joven para definir el tipo de distrofia. (FF) Marco de lectura fuera de fase. (EF) Marco de lectura en fase.

En la Fig. 9 se muestran los pedigree y las autoradiografías del patrón electroforético del DNA de 4 miembros de la familia mexicana No. 1 con antecedentes de DMD, donde se amplificaron las 6 regiones de repetidos de CA del gen DMD. Mediante ensayos 9 y 5 plex se sabía que el individuo afectado (II1) carecía de los exones 50-51. La falta de producto de amplificación en la región STR-50, en este individuo (Fig. 9A') confirmó la delección. La mujer en riesgo (II2) fue portadora para la DMD, ya que presentó el mismo alelo que su hermano afectado (II1) en las regiones intrónicas 44, 45, 49 y 5'. La región STR-50 y 3' no fueron informativas, ya que la madre (I1) fue homocigota en ambas regiones.

En la Fig 10 se muestran los pedigree con los haplotipos y las autoradiografías obtenidas de la amplificación de las regiones STR's 5', 44, 49, de la familia 2 con antecedentes de DMB. Los hombres afectados de esta familia, no presentaron delecciones genéticas después del análisis con el 9 y 5 plex. Las mujeres I-5 y I-6 de esta familia no fueron portadoras con las regiones intrónicas 44 y 49 (Fig 10A). Las regiones intrónicas 45 y 50 del gen DMD no fueron informativas debido a que la madre probablemente era homocigota para ambas regiones. La mujer II-2 presentó el haplotipo de riesgo con los STR's 44, 49 y la II-4 no (Fig 10A). El análisis de haplotipos usando STR 5' de las mujeres I-5 y I-6 (Fig 10B) confirmó que ellas no eran portadoras. Esto se concluyó, asumiendo haplotipos hipotéticos de sus padres como A para el padre y como AB para la madre (Fig 10C).

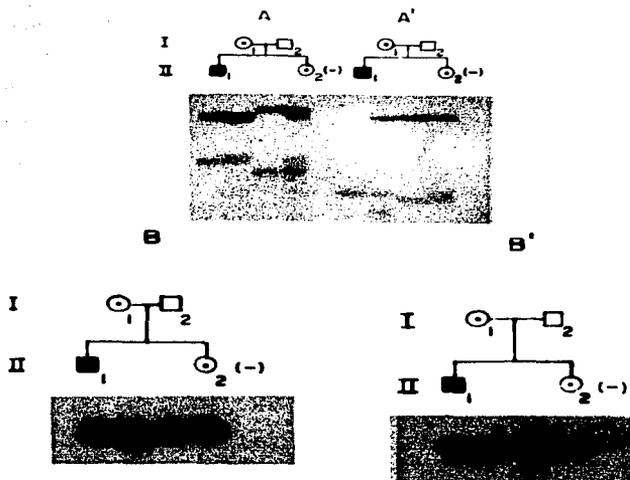


Fig. 9: Pedigree y autoradiografías de la Familia mexicana No. 1 con DMD. El DNA genómico fue aislado de linfocitos y analizado como se describe en métodos. (A) Amplificación de las regiones STR-49 (parte superior) y STR-44 (parte inferior). (A') Amplificación de las regiones STR-50 (parte superior) y STR-45 (parte inferior). (B) Amplificación de la región 5'. (B') Amplificación de la región 3'. (-) Control negativo. El individuo afectado (II1) tiene deletados los exones 50-51.

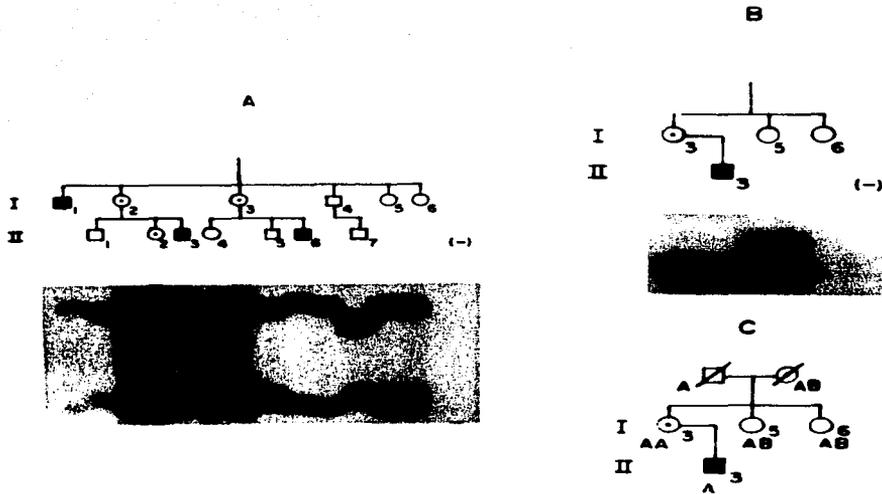


Fig. 10: Pedigree y autoradiografías de la Familia No. 2. El DNA genómico fue aislado y analizado como se describe en métodos. (A) Amplificación de las regiones STR-49 (parte superior) y STR-44 (parte inferior). (B) Amplificación de la región 5' de algunos integrantes de la Familia No. 2. (C) Pedigree con los haplotipos hipotéticos de los padres de esta familia. (-) Control negativo.

En la Fig. 11 se muestra el pedigree con los haplotipos y la autoradiografía, en donde se amplificaron las regiones intrónicas 45 y 50 de la familia No. 3, con tres afectados de DMB severa (II4, II5 y II6), donde está incluida una mujer. Los hombres enfermos no tuvieron deleciones en el gen DMD, con la amplificación múltiple 9 y 5 plex. La mujer en riesgo (II3) no resultó ser portadora para esta distrofia y la mujer afectada (II4) presentó los mismos alelos que sus hermanos afectados con los STR's 45 y 50. La presencia de los mismos alelos en la mujer afectada y sus hermanos afectados, sugiere que esta mujer heredó el cromosoma afectado.

Las otras cuatro regiones del gen DMD analizadas (44, 49, 5' y 3') no fueron informativas ya que la madre de la familia (I1) fue homocigota para ellas.

En la familia No. 4, con antecedentes de DMD, se detectó un evento de recombinación en el gen DMD, el cual está ilustrado en la Fig. 12. Mediante la amplificación múltiple 9 y 5 plex se demostró que los individuos afectados (II3 y II5), de esta familia, carecían del exon 45. Como se puede observar en la autoradiografía de la Fig. 12A los individuos afectados tienen alelos diferentes en la región 44. En la Fig. 12B se muestran los diversos alelos de estos individuos y de su madre, en las regiones 5', 44, 45, 49, 50 y 3' del gen DMD. Como se puede observar los enfermos tiene alelos diferentes en la regiones 5' y 44, pero comparten los mismos en las regiones 49, 50 y 3', además de la deleción en la región 45. Esto sugiere un evento de recombinación en el intron 44, en uno de los

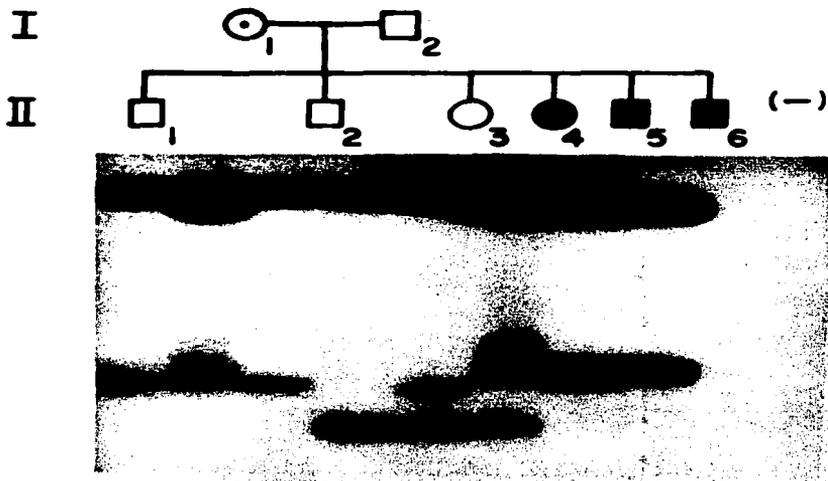


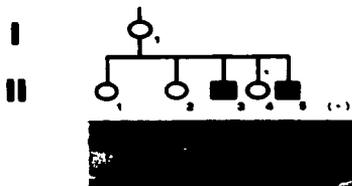
Fig. 11: Pedigree y autoradiografía de la Familia No. 3. El DNA genómico fue aislado de linfocitos y analizado como se describe en métodos. Amplificación de las regiones STR-50 (parte superior) y STR-45 (parte inferior). (-) Control negativo.

dos afectados. Debido a este evento no fue posible determinar el estado portador en las 3 mujeres en riesgo (II1, II2 y II4), de esta familia.

En la Fig. 13 se muestran el pedigree, haplotipos y autoradiografías de la familia No. 5, en donde se amplificaron las regiones intrónicas 44, 45, 49 y 50 del gen DMD. Mediante la amplificación múltiple 9 y 5 plex se demostró que el individuo afectado (III1) tiene una deleción que abarca los exones 48-51. Como se puede observar en la Fig. 13A y 13B, el DNA del individuo afectado careció de productos de amplificación en las regiones 49 y 50, lo cual confirmó la deleción, la madre (II1) presentó dos alelos en la región 49 (Fig 13A). Este resultado sugiere una mutación de novo en el individuo afectado o mosaicismo gonadal en la madre ya que su DNA no presenta la deleción que tiene su hijo. Por otro lado las dos mujeres en riesgo en esta familia (II2 y II3) tuvieron alelos paternos diferentes en las regiones intrónicas 44, 45 y 50, lo cual demuestra que estas regiones son útiles para confirmar paternidad dentro de una familia.

De las 21 mujeres pertenecientes a las 5 familias analizadas, el 38% fue portadora y el 33% no lo fue, con al menos una de las 6 regiones trabajadas. En 5 mujeres en riesgo no se pudo definir su estado portador, debido a un evento de recombinación en una de las familias y a un fenómeno de mosaicismo germinal o mutación de novo, en otra. La región intrónica 44 fue la mas informativa y la región

A



B

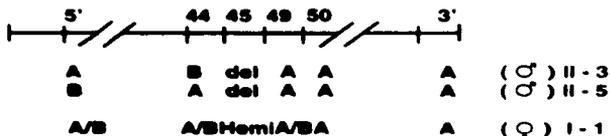


Fig. 12: Evento de recombinación en la Familia No. 4. El DNA genómico fue aislado de linfocitos y analizado como se describe en métodos. (A) Pedigree y autorradiografía de la región STR-44. (-) control negativo. (B) Representación esquemática de los haplotipos de los individuos II1, II3 y II5 obtenidos de la amplificación de las regiones 5', 3', 44, 45, 49 y 50. (-) control negativo. La línea horizontal ilustra el gen DMD.

Fig. 13: Mosaicismo gonadal en la Familia No. 5. El DNA genómico fue aislado de linfocitos y analizado como se describe en métodos. (A) Amplificación de las regiones STR-49 (parte superior) y STR-44 (parte inferior). (B) Amplificación de las regiones STR-50 (parte superior) y STR-45 (parte inferior). (-) Control negativo.

3' no fue informativa en ninguna de las familias analizadas.

8. DISCUSION.

La metodología utilizada, en el presente trabajo, para extraer DNA genómico de los individuos afectados, sus familiares y personas no afectadas por DMD/DMB, fue adecuada ya que en promedio se obtuvieron concentraciones de 125-250 ug por cada 15-20 ml. de sangre. El DNA obtenido no mostró degradación y se pudo restringir con diversas restrictasas. Este método también tiene la ventaja de ser más rápido y barato en comparación con otros métodos utilizados en la extracción de DNA genómico, como los métodos de extracción de DNA genómico, con fenol-cloroformo o con los detergentes CTAB-DTAB (61, 81, 136).

Con la finalidad de determinar el patrón de deleciones genéticas en el gen DMD de los distróficos mexicanos analizados en este trabajo, se decidió utilizar la técnica de amplificación múltiple 9 y 5 plex, debido a varias ventajas respecto a otra metodologías, este método esta diseñado para amplificar las regiones del gen DMD que presentan con mayor frecuencia deleciones genéticas y detecta aproximadamente el 98% de eliminaciones en el gen (10, 35).

Si se compara esta metodología con las hibridaciones tipo Southern, también utilizadas para determinar deleciones en el gen DMD, el PCR multiplex es más económico, rápido y no presenta problemas técnicos

como la comigración de fragmentos o bandas de hibridación poco intensas en la autoradiografía, que suelen presentarse en esa técnica (88). Con el PCR multiplex también es posible, en algunos casos, determinar la extensión de las deleciones genéticas en los individuos afectados por DMD/DMB y así predecir si el marco de lectura del gen DMD esta en fase o no.

En los casos en los cuales no se pudo determinar la extensión de la deleción genética en el gen DMD, mediante esa metodología, se realizaron hibridaciones tipo Southern, usando sondas de cDNA del gen DMD (41) o PCR de exones del punto caliente mayor, que no fueron amplificadas por el 9 y 5 plex (30).

El porcentaje de deleciones genéticas obtenido en los enfermos mexicanos afectados por esta distrofia, analizados mediante PCR y Southern, fue del 50.8%. Este porcentaje es uno de los más bajos reportado en la población humana, solamente en la población japonesa e israelita se ha informado de frecuencias más bajas (Tabla 10).

La distribución de deleciones en el gen DMD de los enfermos mexicanos afectados por esta distrofia presentó también diferencias respecto a otras poblaciones estudiadas ya que fue la que tuvo un mayor porcentaje (87%) de deleciones en el punto caliente mayor. La población israelita, que fue la mas cercana a la nuestra, tuvo un 78% de deleciones en esa región (41, 59, 88). Posiblemente las

TABLA 10.

DISTRIBUCION DE DELECCIONES EN EL GEN DMD EN DIFERENTES ETNIAS.

PAIS	DELECCIONES (%)	LOCALIZACION EN PUNTO CALIENTE MAYOR (%)	NO. DE ENFERMOS	REFERENCIA
CHINA	56.6	80	11	159
FRANCIA	68	68	38	26
JAPON	40	60	50	7
USA	59	69	160	101
ISRAEL	37	78	62	141
MEXICO	50.8	87	61	ESTE TRABAJO

diferencias entre los enfermos mexicanos y los pertenecientes a otras poblaciones analizadas, sean resultado de la información genética particular a nuestra población mestiza. En caso de que esto se confirme, mediante un estudio con un mayor número de individuos, convendría diseñar un ensayo multiplex para diagnóstico de DMD/DMB, mas conveniente a nuestra población.

Se ha reportado que en diversas poblaciones de individuos afectados por DMD/DMB tanto europeas como anglosajonas de Estados Unidos de América y Canadá (39, 59), el inicio de la delección del punto caliente mayor, aunque es heterogéneo, empieza con mayor frecuencia en el intron 44. En la población mexicana los afectados por DMD/DMB analizados en el presente trabajo, también presentan la más alta frecuencia de inicio de delecciones en ese intron. Posiblemente la alta frecuencia de inicio de delecciones en este intron se debe a que es muy grande (46, 87, 92) o a la presencia de secuencias inestables como las reportadas en el intron 43 de este gen (126).

De los 27 enfermos con delecciones en el punto caliente mayor que se analizaron en el presente trabajo, 2 presentaron el marco de lectura en fase y 25 no. Dieciseis de ellos disponían de datos clínicos y se pudo hacer una correlación entre estos datos y los moleculares. En 13 de estos enfermos se encontró una correlación entre el marco de lectura en no fase y la gravedad de la enfermedad, de acuerdo a la predicción de Monaco A. et. al. (109). En los otros 3 no se presentó esta correlación, 2 de ellos (9.1 y

10.1) tuvieron el marco de lectura en fase, sin embargo su fenotipo fue DMD y uno, el enfermo 7.3, manifestó un fenotipo DMB, a pesar de tener el marco de lectura fuera de fase. Para los dos primeros casos donde no se confirmó la hipótesis del marco de lectura, las deleciones en el gen DMD, ocasionaron que se perdiera una región del segundo dominio de la distrofina, que de acuerdo al mapa patológico-funcional de esta proteína, ocasionaría un fenotipo DMB medio o atípico (4, 12, 55, 125). Sin embargo ellos presentan un fenotipo DMD, que podría deberse a que las deleciones ocasionaron que se perdieran las regiones consenso requeridas para el correcto empalme de los exones en el gen DMD (88) y por lo tanto el RNAm producido posiblemente no se traduzca. Esto se podría confirmar mediante el análisis del RNAm del gen DMD y la distrofina, en estos enfermos.

Se ha reportado la presencia de distrofina y RNAm del gen DMD en algunos enfermos de DMD/DMB, en los que una deleción ocasionó que el marco de lectura del gen, no estuviera en fase (141, 154). La explicación mas probable para esto podría ser que ocurriera previamente un procesamiento alternativo que generara un acomodo diferencial de exones en el RNAm del gen DMD. Posiblemente esto mismo sucedió en el individuo 7.3 que tiene un fenotipo Becker, a pesar de tener el marco de lectura del gen DMD fuera de fase. Para confirmar lo anterior sería necesario analizar el transcrito y la proteína del gen DMD de este individuo.

El 49.1% de los enfermos de DMD/DMB analizados en el presente trabajo, mediante PCR e hibridaciones Southern, no mostraron deleciones genéticas en el gen DMD. Posiblemente tengan una mutación en otras regiones no analizadas del gen o bien presenten microdeleciones o mutaciones puntuales, las cuales no se pueden detectar con las técnicas utilizadas en el presente trabajo. (82, 128, 134).

Debido a que las mujeres portadoras de la Distrofia muscular de Duchenne/Becker son asintomáticas, se han diseñado diversas pruebas para determinar el estado portador en mujeres en riesgo para esta enfermedad. Una de las mas utilizadas es la determinación en suero de la enzima muscular creatina fosfocinasa, ya que los niveles de ésta son elevados en aproximadamente el 70-75% de las mujeres portadoras, sin embargo varios factores pueden modificar los niveles de la enzima en la misma mujer y hacer el diagnóstico poco preciso (9, 138, 157).

Con la finalidad de mejorar el diagnóstico de portadoras para la DMD/DMB en familias mexicanas con antecedentes de esta enfermedad, en el presente trabajo se implementó el diagnóstico molecular de portadoras para esta distrofia, utilizando repetidos en tándem de los nucleótidos CA de 6 regiones diferentes del gen DMD (intrones 44, 45, 49, 50 y extremos 5' y 3' del gen DMD).

Hay al menos 3 ventajas en el uso de estos 6 marcadores en el

diagnóstico molecular de portadoras para la DMD/DMB. La primera es acerca de la localización de éstos marcadores, 4 de ellos se encuentran dentro de la región del gen DMD donde con mayor frecuencia se dan las deleciones genéticas (45, 54, 86). Esto facilita la detección de portadoras debido a que es más fácil determinar el estado portador en una familia, cuando las mujeres son hemicigotas para la deleción. La segunda ventaja es que estos 6 marcadores son útiles para descartar eventos de recombinación en el gen DMD. Chakraborty *et. al.* (32) considera que mediante el uso de 2 secuencias en el punto caliente mayor de eliminación del gen DMD y un marcador en cada uno de los extremos de este gen, se pueden identificar eventos de recombinación dentro del gen y obtener información diagnóstica en casi todas las familias con DMD/DMB analizadas. La tercera ventaja es que estas secuencias tienen un alto polimorfismo en las poblaciones estudiadas y pueden usarse para realizar estudios de ligamiento en familias con antecedentes de DMD/DMB.

Este es el primer estudio en México, que describe el estado portador de mujeres en riesgo pertenecientes a familias con antecedentes de DMD/DMB, haciendo uso de 6 repetidos de CA dentro del gen DMD.

Como se puede observar en la familia 1 de la Fig. 9, el diagnóstico de portadoras mediante el uso de los repetidos de CA es altamente informativo, ya que la mujer en riesgo (II2), se pudo definir como

portadora con 4 de las regiones del gen DMD analizadas.

Como ya se comentó anteriormente una de las ventajas en el uso de los repetidos de CA en el diagnóstico de portadoras, es su alta heterocigosidad en las poblaciones estudiadas (11, 27, 52, 127) y probablemente en la nuestra (Estrada, J. comunicación personal). Esto permitió definir el estado portador de 2 mujeres de la familia 2 (I5, I6), asumiendo haplotipos hipotéticos de sus progenitores, ya fallecidos (ver Fig. 10C).

En la Fam. 3 (ver Fig. 11) analizada en este trabajo, existe una mujer (II4), que inicialmente se diagnosticó, desde el punto de vista clínico, como afectada por una DMB severa. Los criterios clínicos que sugirieron que ella padecía esa alteración fueron la edad en que dejó de caminar, que fue la misma que la de sus hermanos afectados (14 años de edad), los niveles elevados de CPK y alteraciones miopáticas compatibles con esta distrofia (Mercado R. comunicación personal). Los alelos obtenidos por la amplificación del DNA de las regiones de CA de los intrones 45' y 50, de esta mujer (ver Fig 11), sugieren que está afectada por esta distrofia, ya que presenta el alelo que segrega con la enfermedad. Su hermana no afectada (II3), no lo presenta.

Se han reportado pocos casos de mujeres afectadas por DMD/DMB en la población humana y se han explicado como resultado de una inactivación preferencial del cromosoma X no afectado, o por un alteración cromosómica tipo 45 X0 o translocación X/autosómica

(132). Por lo anterior es necesario realizar estudios complementarios que pudieran explicar las manifestaciones clínicas de la mujer II4 de esa familia, tales como un cariotipo y la determinación de la distrofina en sus fibras musculares. Resultados preliminares obtenidos, en nuestro laboratorio, mediante hibridaciones Western, indican que esta mujer y sus hermanos afectados, carecen de distrofina muscular.

El porcentaje de eventos de recombinación en las familias estudiadas en este trabajo fue del 20%. Este valor es similar al 27% reportado por Clemens P. et. al. (32). El evento de recombinación detectado en la familia 4 se dio al igual que los reportados por Clemens P. et. al. (32) en el punto caliente mayor, el cual tiene una frecuencia de recombinación varias veces mayor a las otras regiones del gen (1, 2, 38). Debido a este evento detectado en esta familia (ver Fig. 12) no se pudo definir el estado portador de las 3 mujeres en riesgo (III1, II2, II4), sin embargo mediante el uso de otras metodologías moleculares como la detección de eliminaciones por corte con RNAasa A (113) o el RT-PCR (133), se podría definir el estado portador de esas mujeres..

La mujer I1 de la familia 5 (ver Fig. 13A) probablemente tenga mosaicismo gonadal para la delección presente en su hijo, o bien este último tenga una mutación de novo. Se estima que el mosaicismo gonadal es un evento relativamente frecuente (12%) en familias con DMD/DMB y puede tener implicaciones en la determinación portador

para esta enfermedad, debido a que se confundiría con una aparente mutación de novo en el gen DMD (62).

La región STR-44 fue el marcador mas informativo en la determinación del estado portador, en las familias analizadas en este trabajo. Sin embargo fue el segundo con mayor heterocigosidad (65.2%) en 23 mujeres mexicanas no portadoras de la DMD/DMB (Estrada J. comunicación personal). Powell J. et. al. (127) obtuvo un 47% de heterocigosidad para el marcador 3' del gen DMD, en población caucásica, sin embargo esta región no fue informativa en ninguna de las familias mexicanas analizadas en este trabajo. Posiblemente esta diferencia sea resultado de las características peculiares de nuestra población mestiza.

El uso de estas metodologías moleculares en el diagnóstico de portadoras para la DMD/DMB es importante debido a que en la mayoría de los casos son altamente informativas y mas fáciles de implementar que otra metodologías y permiten proporcionar un asesoramiento genético mas adecuado.

9. REFERENCIAS.

1. Abbs S, Roberts RG, Matthew CG, Bentley DR, Bobrow M (1990) Accurate assessment of intragenic recombination frequency within the Duchenne muscular dystrophy gene. *Genomics*. 7:602-606.
2. Abbs S, Yau SC, Clark S, Matthew CG, Bobrow M (1991) A

- convenient multiplex PCR system for detection of dystrophin gene deletions: comparative analysis with cDNA hybridisation shows mistypings by both methods. *J Med Genet* 28:304-311.
3. Acsadi G, Dickson G, Love DR, Jani A, Walsh FS, Gurusinghe A, Wolff JA, Davies KE (1991) Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature*. 352:815-818.
 4. Ahn AH, Kunkel LM (1993) The structural and functional diversity of dystrophin. *Nature Genetics*. 3:283-290.
 5. Appel S, Roses A (1983) The muscular dystrophies. En Stanbury E. The metabolic basis of inherited disease. 5ed. Mc. Graw Hill.
 6. Arikawa E, Hoffman EP, Kaido M, Nonaka MD, Sugita H, Arahata MD (1991) The frequency of patients with dystrophin abnormalities in a limb-girdle patient population. *Neurology*. 41:1491-1496.
 7. Asano J, Tomatsu S, Sukegawa K, Ikedo Y, Minami R, Iida M, Nishimura M, Nakagawa M, Ohshiro M, Orii T (1990) Gene deletions in Japanese patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Jpn J Hum Genet* 39:419-423.
 8. Bakker E, Van Broeckhoven C, Bonten EJ, Van de Vooren MJ, Veenema H, Van Hul W, Van Ommen GJB, Vandenberghe A, Pearson PL (1987) Germline mosaicism and Duchenne muscular dystrophy mutations. *Nature*. 329:554-556.
 9. Barkhaus P, Gilchrist J (1989) Duchenne muscular dystrophy manifesting carriers. *Arch Neurol*. 46: 673-675.
 10. Beggs AH, Koening M, Boyce FM, Kunkel LM (1990) Detection of 98% of DMD/BMD deletions by PCR. *Hum Genet*. 86:45-48.

11. Beggs AH, Kunkel LM (1990) A polymorphic CACA repeat in the 3' untranslated region of dystrophin. *Nucleic Acids Res.* **18**:1931.
12. Beggs AH, Hoffman EP, Snyder JR, Arahata K, Specht L, Shapiro F, Angelini C, Sugita H, Kunkel LM (1991) Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy: Dystrophin gene and protein studies. *Am J Hum Genet.* **49**:54-67.
13. Berger S, Kimmel A (Ed) (1987) *Methods in Enzymology*. Vol. 152. Guide to molecular cloning techniques. Academic Press.
14. Bieber FR, Hoffman EP, Amos J (1989) Dystrophin analysis in Duchenne muscular Dystrophy: Use in fetal diagnosis and in Genetic counseling. *Am J Hum Genet* **45**:362-367.
15. Bird TD (1994) Major patterns of Human Inheritance: Relevance to the epilepsies. *Epilepsia.* **35**:s2-s6.
16. Blake DJ, Tinsley JM, Davies KI (1994) The emerging family of dystrophin related proteins. *Trends in Cell Biology.* **4**:19-23.
17. Bonilla, E. Sammitt CE, Miranda AF, Hays AP, Salviati G, DiMauro S, Kunkel LM, Hoffman EP, Rowland LP (1988) Duchenne muscular dystrophy: Deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell.* **54**:447-452.
18. Bonilla, E. Schmidt B, Samitt CE, Miranda AF, Hays AP, DeOliveira AB, Chang HW, Servidei S, Ricci E, Younger DS, DiMauro S (1988) Normal and dystrophin-deficient muscle fibers in carriers of the gene for Duchenne muscular Dystrophy. *Am J Pathol.* **133**:440-445.
19. Boyce FM, Beggs AH, Feener C, Kunkel LM (1991) Dystrophin is

- transcribed in brain from a distant upstream promotor. Proc Natl Acad Sci USA. 88:1276-1280.
20. Brown CT, Thomas NST, Sarfarazi M (1985) Genetic linkage relationships of seven DNA probes with Duchenne and Becker muscular dystrophy. Hum Genet. 71:62-74.
 21. Bulman DE, Murphy EG, Zubrzycka-Gaarn EE, Worton RG, Ray PN (1991) Differentiation of Duchenne and Becker muscular dystrophy phenotypes with amino- and carboxy-terminal antisera specific for dystrophin. Am J Hum Genet. 48:295-304.
 22. Bunyan DJ, Robinson DO, Collins AL, Cockwell AE, Bullman HMS, Whittaker PA (1994) Germline and somatic mosaicism in a female carrier of Duchenne muscular dystrophy. Hum Genet. 93:541-544.
 23. Burghes AHM, Logan C, Hu X, Belfall B, Worton RG, Ray PN (1987) A cDNA clone from the Duchenne/Becker muscular dystrophy gene. Nature. 328:434-437.
 24. Byers TJ, Lidov HGW, Kunkel LM (1993) An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. Nature Genetics. 4:77-81.
 25. Carlson EA (1991) Defining the gene: An evolving concept. Am J Hum Genet. 49:475-487.
 26. Claustres M, Tuffery S, Chevron MP, Jozelon MP, Martinez P, Echenne B, Demaille J (1991) Molecular deletion patterns in families from southern France with Duchenne/Becker muscular dystrophies. Hum Genet. 88:179-184.
 27. Clemens PR, Fenwick RG, Chamberlain JS, Gibbs RA, De Andrade M, Chakraborty R, Caskey CT (1991) Carrier detection and prenatal

- diagnosis in Duchenne and Becker muscular Dystrophy families, using dinucleotide repeat polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 42:951-960.
28. Cooper BJ (1989) Animal models of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Br Med Bull.* 45:703-718.
 29. Cooper DN, Schmidtke J (1991) Diagnosis of genetic disease using recombinant DNA. Third edition. *Hum Genet.* 87:519-560.
 30. Coral R (1995) Estudio molecular de alteraciones en el gen DMD presentes en familias mexicanas con Distrofia muscular de Duchenne y Distrofia muscular de Becker. Tesis doctoral. CINVESTAV, México.
 31. Cox GA, Phelps SF, Chapman VM, Chamberlain JS (1993) New mdx mutation disrupts expression of muscle and nonmuscle isoforms of dystrophin. *Nature Genetics.* 4:87-93.
 32. Chakraborty R, Zhong Y, De Andrade M, Clemens PR, Fenwick RG, Caskey CT (1994) Linkage disequilibria among (CA)_n polymorphisms in the human dystrophin gene and their implications in carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Genomics.* 21:567-570.
 33. Chamberlain JS, Pearlman JA, Muzny DM, Gibbs RA, Ranier J, Reeves AA, Caskey CT (1988) Expression of the murine Duchenne muscular dystrophy gene in muscle and brain. *Science.* 239:1516-1517.
 34. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT (1988) Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.*

16:11141-11156.

35. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Caskey CT (1989) Multiple PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. En PCR protocols, a guide to methods and applications. Editado por Innis MA, Gelfand MA, Sninsky JJ, White TJ. Academic Press. pp.272-281.
36. Chelly J, Kaplan JC, Maire P, Gautron S, Kahn A (1988) Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues. Nature. 333:858-860.
37. Chelly J, Concordet JP, Kaplan JC, Kahn A (1989) Illegitimate transcription: Transcription of any gene in any cell type. Proc Nat Acad Sci USA. 86:2617-2621.
38. Chen JD, Denton MJ, Morgan G, Pearn JH, Mackinlay AG (1988) The use of field-inversion gel electrophoresis for deletion detection in Duchenne muscular dystrophy Am J Hum Genet. 42:777-780.
39. Danieli GA, Mioni F, Muller CR, Vitiello L, Mostacciuolo ML, Grimm T (1993) Patterns of deletions of the dystrophin gene in different European populations. Hum Genet. 91:342-346.
40. Darras BT, Francke U (1987) A partial deletion of the muscular dystrophy gene transmitted twice by an unaffected male. Nature. 329:556-558.
41. Darras BT, Francke U (1988) Normal human genomic restriction-fragment patterns and polymorphisms revealed by hybridization with the entire Dystrophin cDNA. Am J Hum Genet. 43:612-619.
42. Darras BT, Blattner JF, Harper AJ, Spiro AJ, Alter S, Francke

- U (1988) Intragenic deletions in 21 Duchenne muscular Dystrophy (DMD)/Becker muscular Dystrophy (BMD) families studied with the dystrophin cDNA: Location of breakpoints on HindIII and BglII exon containing fragment maps, meiotic and mitotic origin of the mutations. *Am J Hum Genet.* 43:620-629.
43. Davies K, Pearson PL, Harper PS, Murray JM, O'Brien T, Sarfarazi M, Williamson R (1983) Linkage analysis of two cloned DNA sequences flanking the Duchenne muscular dystrophy locus on the short arm of the human X chromosome. *Nucleic Acids Res.* 11:2303-2313.
44. Davies, K (1986) Human genetic diseases. A practical approach. Ed. Irl Press.
45. Den Dunnen JT, Bakker E, Klein Breteler EG, Pearson PL, Van Ommen GJB (1987) Direct detection of more than 50% Duchenne muscular dystrophy mutations by field inversion gels. *Nature.* 329:640-642.
46. Den Dunnen JT, Bakker E, Van Ommen GJB, Pearson PL (1989) The DMD gene analysed by field inversion gel electrophoresis. *Br Med Bull* 45:644-658.
47. Dorkins H, Junien C, Mandel JL, Wrogemann K, Moison JP (1985) Segregation analysis of a marker localized Xp21.2-Xp21.3 in Duchenne and Becker muscular dystrophy families. *Hum Genet.* 71:103-107.
48. Dunckley MG, Love DR, Davies KE, Walsh FS, Morris GE, Dickson G (1992) Retroviral-mediated transfer of a dystrophin minigene into mdx mouse myoblasts in vitro. *FEBS.* 296:128-134.

49. Edwards MC, Gibbs RA (1994) Multiplex PCR: Advantages, Development, and Applications. PCR Methods and Applications. 3:s65-s74.
50. Emanuel BS, Zackai EH, Tucker SH (1983) Further evidence for Xp21 location of Duchenne muscular dystrophy (DMD) locus:x;9 translocation in a female with DMD. J Med Genet. 20:461-463.
51. England SB, Nicholson LVB, Johnson MA, Forrest SM, Love DR, Zubrzycka-Gaarn EE, Bulman DE, Harris JB, Davies KE (1990) Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin. Nature. 343:180-182.
52. Feener CA, Boyce FM, Kunkel LM (1991) Rapid detection of CA polymorphisms in cloned DNA: Application to the 5' region of the dystrophin gene. Hum Genet. 48:621-627.
53. Fenichel GM, Florence JM, Pestronk A, Mendell JR, Moxley RT, Griggs RC, Brooke MH, Miller JP, Robinson J, King W, Signore L, Panday S, Schierbrecker J, Wilson B (1991) Long-term benefit from prednisone in Duchenne muscular dystrophy. Neurology. 41:1874-1877.
54. Forrest SM, Cross GS, Speer A, Gardner-Medwin D, Burn J, Davies KE (1987) Preferential deletion of exons in Duchenne and Becker muscular dystrophies. Nature. 329:638-640.
55. Francke U, Ochs HD, de Martinville B, Giacalone J, Lingren V, Distèche C, Pagon RA, Hofker MH, Van Ommen GJB, Pearson PL, Wedgwood RJ (1985) Minor Xp21 chromosome deletion in a male associated with expression of Duchenne muscular dystrophy, chronic granulomatous disease, retinitis pigmentosa, and Mc

- Leod syndrome. Am J Hum Genet. 37:250-267.
56. French, W. (1986) El tratamiento de las enfermedades genéticas. Mundo Científico. 6:620-630.
57. Gangopadhyay SB, Sherratt TG, Heckmatt JZ, Dubowitz V, Miller G, Shokeir M, Ray PN, Strong PN, Worton RG (1992) Dystrophin in frameshift deletion patients with Becker muscular dystrophy. Am J Hum Genet. 51:562-570.
58. Gardner-Medwin, D. (1980) Clinical features and classification of muscular dystrophies. Br Med Bull. 36:109-115.
59. Gillard E, Chamberlain JS, Murphy EG, Duff CL, Smith B, Burghes AHM, Thompson MW, Sutherland J, Oss I, Bodrug SE, Klamut HJ, Ray PN, Worton RG (1989) Molecular and phenotypic analysis of patients with deletions within the deletion-rich region of the Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) gene. Am J Hum Genet. 45:507-520.
60. Gúrecki DC, Monaco AP, Derry JM, Walker AP, Barnard EA, Barnard PJ (1992) Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain region regulated by different promoters. Hum Mol Genet. 1:505-510.
61. Gustincich S, Manfioletti G, Del Sal G, Schneider C. (1991) A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole Human blood. Biotechniques. 11:298-301.
62. Gutmann DH, Fischbeck KH (1989) Molecular Biology of Duchenne and Becker's muscular dystrophy: Clinical applications. Ann Neurol. 26:189-194.
63. Hagiwara Y, Nishio H, Kitch Y, Takeshima Y, Narita N, Wada H,

- Yokoyama M, Nakamura H, Matsuo M (1994) A novel point mutation (G to T) in a 5' splice donor site of intron 13 of the Dystrophin gene results in exon skipping and is responsible for Becker muscular Dystrophy. *Am J Hum Genet.* 54:53-61.
64. Hammond RG Jr. (1987) Protein sequence of DMD gene is related to actin-binding domain of alpha-actinin. *Cell.* 51:1.
65. Hardiman O, Sklar RM, Brown RH (1993) Methylprednisolone selectively affects dystrophin expression in human muscle cultures. *Neurology.* 43:342-345.
66. Hiraishi Y, Kato S, Ishihara T, Takano T (1992) 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.* 29:897-901.
67. Hodgson S, Hart KA, Abbs S, Heckmatt J, Rodillo E, Bobrow C, Dubowitz V (1989) Correlation of clinical and deletion data in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *J Med Genet.* 26:682-693.
68. Hoffman EP, Monaco AP, Feener CA, Kunkel LM (1987) Conservation of the Duchenne muscular dystrophy gene in mice and humans. *Science.* 238:347-350.
69. Hoffman EP, Brown RH Jr., Kunkel LM (1987) Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell.* 51:919-928.
70. Hoffman EP, Knudson CM, Campbell KP, Kunkel LM (1987) Subcellular fractionation of dystrophin to the triads of skeletal muscle. *Nature.* 330:754-758.
71. Hoffman EP, Fischbeck KH, Brown RH, Johnson M, Medori R, Loike

- JD, Harris JB, Waterston R, Brooke M, Specht L, Kupsky W, Chamberlain J, Caskey CT, Shapiro F, Kunkel LM (1988) Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's and Becker's muscular dystrophy. *N Engl J Med.* 318:1363-1368.
72. Hoffman EP, Hudecki MS, Rosenberg PA, Pollina C, Kunkel LM (1988) Cell and fiber type distribution of dystrophin. *Neuron.* 1:411-420.
73. Hoffman EP, Watkins SC, Slayter HS, Kunkel LM (1989) Detection of a specific isoform of alpha-actinin with antisera directed against dystrophin. *J Cell Biol.* 108:503-510.
74. Hoffman, E. P. (1993) La Miopatia de Duchenne. *Mundo Científico.* 13:224-232.
75. Hofker MH, Wapenaar MC, Goor N, Bakker E, Van Ommen GJB, Pearson PL (1985) Isolation of probes detecting restriction fragment length polymorphisms from X chromosome-specific libraries: potential use for diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet.* 70:148-156.
76. Honeycombe J, Anand R (1989) Molecular analysis of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Comp Biochem Physiol.* 92A:125-131.
77. Hu X, Burghes AHM, Ray PN, Thompson MW, Murphy EG, Worton RG (1988) Partial gene duplication in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *J Med Genet.* 25:369-376.
78. Hu X, Ray PN, Murphy EG, Thompson MW, Worton RG (1990) Duplicational mutation at the Duchenne muscular dystrophy locus:

- its frequency, distribution, origin, and phenotype/genotype correlation. Am J Hum Genet. 46:682-695.
79. Jacobs PA, Hunt PA, Mayer M, Bart RD (1981) 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. 33:513-518.
80. Kempster, B (1992) Quick preparation of high molecular weight DNA by freezing. TIG. 8:7-8.
81. Kendall TL, Byerley DJ, Dean R (1991) Isolation of DNA from blood. Anal Biochem. 195:74-76.
82. Kilimann MW, Pizzuti A, Grompe M, Caskey CT (1992) Point mutations and polymorphisms in the human dystrophin gene identified in genomic DNA sequences amplified by multiplex PCR. Hum Genet. 89:253-258.
83. Kingston HM, Sarfarazi M, Thomas NST, Harper PS (1984) Localisation of the Becker muscular dystrophy gene on the short arm of the X chromosome by linkage to clone DNA sequences. Hum Genet. 67:6-17.
84. Klamut HJ, Zubrzycka-Gaarn EE, Bulman DE, Gangopadhyay SB, Worton RG, Ray PN (1989) Myogenic regulation of dystrophin gene expression. Br Med Bull. 45:681-702.
85. Knudson CM, Hoffman EP, Kahl SD, Kunkel LM, Campbell KP (1988) Evidence for the association of dystrophin with the transverse tubular system in skeletal muscle. J Biol Chem. 263:8480-8484.
86. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM (1987) Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy

- (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*. 50:509-517.
87. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM (1988) The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*. 53:219-228.
88. Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T, Meng G, Muller CR, Lindlolf M, Kaariainen H, de la Chapelle A, Kiuru A, Savontaus ML, Gilgenkrantz H, Récan D, Chelly J, Kaplan JC, Covone AE, Archidiacono N, Romeo G, Liechti-Gallati S, Schneider V, Braga S, Moser H, Darras BT, Wrogemann K, Blondin LAJ, van Paassen HMB, van Ommen GJB, Kunkel LM (1989) The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: Correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet*. 45:498-506.
89. Koh J, Pericak-Vance MA, Yamaoka LH, Hung WY, Worton RG, Lee JE, Kandt RS, Bartlett RJ, Speer MC, Phillips K, Ray PN, Gilbert JR, Siddique T, Roses AD (1987) Inherited deletion at Duchenne dystrophy locus in normal male. *Lancet*. 2:1154-1155.
90. Kunkel LM, Monaco AP, Middlesworth W, Ochs HD, Latt SA (1985) Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X chromosome deletion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82:4778-4782.
91. Kunkel LM, Hejtmancik JF, Caskey CT, Spear A, Monaco AP, Latt SA (1986) Analysis of deletion in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy. *Nature*. 322:73-77.
92. Kunkel LM, Hoffman EP (1989) Duchenne/Becker muscular

- dystrophy: A short overview of the gene, the protein, and current diagnostics. *Br Med Bull.* 45:630-643.
93. Lederfein D, Levy Z, Augier N, Mornet D, Morris G, Fuchs O, Yaffe D, Nundel U (1992) A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscular tissues. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:5346-5350.
94. Lev AA, Feener CC, Kunkel LM, Brown RH Jr (1987) Expression of the Duchenne muscular dystrophy gene in cultured muscle cells. *J Biol Chem.* 262:14817-14820.
95. Lidov HGW, Selig S, Kunkel LM (1995) Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Hum Mol Genet.* 4:329-335.
96. Lindenbaum RH, Clarke G, Patel C, Moncrieff M, Hughes JT (1979) Muscular dystrophy in an X;1 translocation female suggests that Duchenne locus is on X chromosome short arm. *J Med Genet.* 16:389-392.
97. Lindenbaum MH, Carbonetto S (1993) Dystrophin and patterns at the cell surface. *Curr Biol.* 3:109-111.
98. Lindolf M, Kaariainen H, Van Ommen GJB, De la Chapella A (1988) Microdeletions in patients with X-linked muscular dystrophy: Molecular-clinical correlations. *Clin Genet.* 33:131-139.
99. Love DR, Forrest SM, Smith TJ, England S, Flint T, Davies KE, Speer A (1989) Molecular analysis of Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Br Med Bull.* 45:659-680.
100. Lyon MF (1991) The quest for the X-inactivation center. *TIG.* 7(3):69-70.

101. Malhotra SB, Hart KA, Klamut HJ, Thomas NST, Bodrug SE, Burghes AHM, Bobrow M, Harper PS, Thompson MW, Ray PN, Worton RG (1988) Frame-shift deletions in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Science*. 242:755-759.
102. Mao Y, Cremer M (1989) Detection of Duchenne muscular dystrophy carriers by dosage analysis using the DMD cDNA clone 8. *Hum Genet*. 81:193-195.
103. Mathew CG. ed. (1991) *Protocols in Human Molecular Genetics*. Humana Press.
104. Metzinger L, Passaquin AC, Warter JM, Poindron P (1993) Alpha-methylprednisolone promotes skeletal myogenesis in dystrophin-deficient and control mouse cultures. *Neuroscience Letters*. 2:561-564.
105. Mimura N, Asano A (1986) Isolation and characterization of a conserved actin-binding domain from rat hepatic actinogelin, rat skeletal muscle, and chicken gizzard alpha-actinins. *J Biol Chem*. 261:10680-10687.
106. Monaco AP, Bertelson CJ, Middlesworth W, Colletti CA, Aldridge J, Fischbeck KH, Bartlett R, Pericak-Vance MA, Roses AD, Kunkel LM (1985) Detection of deletion spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA segment. *Nature*. 316:842-845.
107. Monaco AP, Neve RL, Colletti-Feener C, Bertelson CJ, Durnit DM, Kunkel LM (1986) Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature*. 323:646-650.
108. Monaco AP, Bertelson CJ, Colletti-Feener C, Kunkel LM (1987)

- Localization and cloning of Xp21 deletion breakpoint involved in muscular dystrophy. *Hum Genet.* 75:221-227.
109. Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM (1988) An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletion of the DMD locus. *Genomics.* 2:90-95.
110. Monaco AP (1994) Isolation of genes from cloned DNA. *Curr Op Genet Develop.* 4:360-365.
111. Moser H (1984) Duchenne muscular dystrophy: Pathogenic aspects and genetic prevention. *Hum Genet.* 66:17-40.
112. Murray JM, Davies KE, Harper PS, Meredith L, Mueller CR, Williamson R (1982) Linkage relationship of a cloned DNA sequence on the short arm of the X chromosome to Duchenne muscular dystrophy. *Nature.* 300:69-71.
113. Myers RM, Lumelsky N, Lerman LS, Maniatis T (1985) Detection of single base substitutions by ribonuclease cleavage at mismatches in RNA:DNA duplex. *Sciences.* 230:1242-1246.
114. Nguyen TM, Ginjaar IB, van Ommen GJB, Morris GE (1992) Monoclonal antibodies for dystrophin analysis. *Biochem. J.* 288:663-668.
115. Nora J, Fraser C. (1980) *Genética médica. Principios y práctica.* Ed. La Prensa Médica mexicana.
116. Nudel U, Robzyk K, Yaffe D (1988) Expression on the putative Duchenne muscular dystrophy gene in differentiated myogenic cell cultures and in the brain. *Nature.* 331:635-638.
117. Oronzi-Scott M, Sylvester JE, Heiman-Patterson T, Shi YJ,

- Fieles W, Stedman H, Burghes A, Ray P, Worton R, Fischbeck KH (1988) Duchenne muscular dystrophy gene expression in normal and diseased human muscle. *Science*. 239:1418-1420.
118. Oudet C, Heilig R, Mandel JL (1990) An informative polymorphism detectable by polymerase chain reaction at the 3' end of the dystrophin gene. *Hum Genet*. 84:283-285.
119. Oudet C, Heilig R, Hanauer A, Mandel JL (1991) Nonradioactive assay for new microsatellite polymorphisms at the 5' end of the Dystrophin gene, and estimation of intragenic recombination. *Am J Hum Genet*. 49:311-319.
120. Oudet C, Hanauer A, Clemens P, Caskey T, Mandel JL (1992) Two hot spots of recombination in the DMD gene correlate with the deletion prone regions. *Hum Mol Genet*. 1:599-603.
121. Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, Hoffman EP, Kunkel LM (1989) Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to positive by injection of normal myoblasts. *Nature*. 337:176-179.
122. Partridge TA (1991) Invited review: Myoblast transfer: A possible therapy for inherited myopathies? *Muscle & Nerve*. 14:197-212.
123. Passaquin AC, Metzinger L, Léger JJ, Warter JM, Poindron P (1993) Prednisolone enhances myogenesis and dystrophin-related protein in skeletal muscle cell cultures from mdx mouse. *J Neuroscience Res* 35:1-10.
124. Passos-Bueno MR, Rapaport D, Love D, Flint T, Bortoline ER, Zats M, Davies K (1990) Screening of deletions in the dystrophin gene with the cDNA probe Cf23a, Cf56a, and Cf115. *J Med Genet*.

27:145-150.

125. Passos-Bueno MR, Vainzof M, Marie SK, Zatz M (1994) Half the dystrophin gene is apparently enough for a mild clinical course: confirmation of its potential use for gene therapy. *Hum Mol Genet.* 3:919-922.
126. Pizzuti A, Pieretti M, Fenwick RG, Gibbs RA, Caskey CT (1992) A transposon-like element in the deletion-prone region of the Dystrophin gene. *Genomics.* 13:594-600.
127. Powell JF, Fodor FH, Cockburn DJ, Monaco AP, Craig IW (1991) A dinucleotide repeat polymorphism at the DMD locus. *Nucleic Acids Res.* 19:1159.
128. Prior TW, Papp AC, Snyder PJ, Burghes AHM, Sedra MS, Western LM, Bartello C, Mendell JR (1993) Identification of two point mutations and a one base deletion in exon 19 of the dystrophin gene by heteroduplex formation. *Hum Mol Genet.* 2:311-313.
129. Ray PN, Belfall B, Duff C, Logan C, Kean V, Thompson MW, Sylvester JE, Gorski JL, Schmickel RD, Worton RG (1985) Cloning of the breakpoint of an X;21 translocation associated with Duchenne muscular dystrophy. *Nature.* 318:672-675.
130. Ragot T, Vincent N, Chafey P, Vigne E, Gilgenkrantz H, Couton D, Cartaud J, Briand P, Kaplan JC, Perricaudet M, Kahn A (1993) Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice. *Nature.* 361:647-650.
131. Rapaport D, Passos-Bueno MR, Brandao L, Love D, Vainzof M, Zatz M (1991) Apparent association of mental retardation and specific patterns of deletions screened with probes cf56a and

- cf23a in Duchenne muscular dystrophy. Am J Med Genet. 39:437-441.
132. Richards CS, Watkins SC, Hoffman EP, Schneider NR, Milsark IW, Katz KS, Cook JD, Kunkel LM, Cortada JM (1990) Skewed X inactivation in a female MZ twin results in Duchenne muscular Dystrophy. Am J Hum Genet. 46:672-681.
133. Roberts RG, Barby TFM, Manners E, Bobrow M, Bentley DR (1991) Direct detection of Dystrophin gene rearrangements by analysis of Dystrophin mRNA in peripheral blood lymphocytes. Am J Hum Genet. 49:298-310.
134. Roberts RG, Bobrow M, Bentley D (1992) Point mutation in the dystrophin gene. Proc Natl Acad Sci USA. 89:2331-2335.
135. Roberts RG, Coffey AJ, Bobrow M, Bentley DR (1993) Exon structure of the human dystrophin gene. Genomics. 16:536-538.
136. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning. A laboratory manual. 2 ed. CSH.
137. Salih MAM, Omer MIA, Bayoumi RA, Karrar O, Johnson M (1983) Severe autosomal recessive muscular dystrophy in an extended Sudanese kindred. Dev Med Child Neurol. 25:43-52.
138. Schwartz LS, Tarlenton J, Popovich B, Seltzer WK, Hoffman EP (1992) Fluorescent multiplex linkage analysis and carrier detection for Duchenne/Becker muscular dystrophy. Am J Hum Genet. 51:721-729.
139. Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ (1989) The molecular basis of muscular Dystrophy in the mdx mouse: A point mutation. Science. 244:1578-1580.

140. Sharp NJH, Kornegay JN, Van Camp SD, Herbstreith MH, Secore SL, Kettle S, Hung WY, Constantinou CD, Dykstra MJ, Roses AD, Bartlett RJ (1992) An error in dystrophin mRNA processing in Golden Retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular Dystrophy. *Genomics*. 13:115-121.
141. Sherratt TG, Vulliamy T, Dubowitz V, Sewry CA, Strong PN (1993) Exon skipping and translation in patients with frameshift deletions in the Dystrophin gene. *Am J Hum Genet*. 53:1007-1015.
142. Shomrat R, Gluck E, Legum C, Shiloh Y (1994) Relatively low proportion of dystrophin gene deletions in Israeli Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. *Am J Med Genet*. 48:369-373.
143. Somer H, Voutilainen A, Knuutila S, Käitila I, Rapola J, Leinonen H (1985) Duchenne-like muscular dystrophy in two sisters with normal karyotypes: Evidence for autosomal recessive inheritance. *Clin Genet*. 28:151-156.
144. Verellen-Dumoulin CH, Freund M, De Meyer R, Laterre C, Frederic J, Thompson MW, Markovic VD, Worton RG (1984) Expression of an X-linked muscular dystrophy in a female due to translocation involving Xp21 and nonrandom inactivation of the normal X chromosome. *Hum Genet*. 67:115-119.
145. Verman I (1990) Gene therapy. *Sci Am*. 263:34-41.
146. Vignos PJ, Spencer GE, Kenneth C (1963) Management of progressive muscular dystrophy of childhood. *Jama*. 184:89.
147. Watkins SC, Hoffman EP, Slayter HS, Kunkel LM (1988) Immunoelectron microscopic localization of dystrophin in myofibres. *Nature*. 333:863-866.

148. Watson J, Tooze J, Kurtz DT (1986) ADN recombinante. Introducci3n a la Ingenieria Gen3tica. Ed. Labor.
149. Watson J, Gilman M, Witkowski J, Zoller M (1992) Recombinant DNA. Second edition. Scientific American Books.
150. Weissenbach J, Gyapay G, Dib C, Vignal A, Morissette J, Millasseau P, Vaysseix G, Lathrop M (1992) A second-generation linkage map of the human genome. Nature. 359:794-801.
151. Weissenbach J. (1993) Microsatellite polymorphisms and the genetic linkage map of the human genome. Curr Op Genet Develop. 3:414-417.
152. Wepenaar MC, Kievits T, Hart KA, Abbs S, Blonden LJA, den Dunnen JT, Grootsholten PM, Bakker E, Verellen-Dumoulin C, Bobrow M, van Ommen GJB, Pearson PL (1988) A deletion hotspot in the Duchenne muscular dystrophy gene. Genomics. 2:101-108.
153. White R, Lalouel JM (1988) Cartografia cromos3mica con marcadores de DNA. Inv Cien. 139:12-20.
154. Winnard AV, Klein CJ, Coovert DD, Prior T, Papp A, Snyder P, Bulman DE, Ray PN, McAndrew King W, Moxley RT, Mendell JR, Burghes AHM (1993) Characterization of translational frame exception patients in Duchenne/Becker muscular dystrophy. Hum Mol Genet. 2:737-744.
155. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL (1990) Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. Science. 247:1465-1467.
156. Worton RG, Duff C, Sylvester JE, Schmickel RD, Willard HF (1984) Duchenne muscular dystrophy involving translocation of

- the DMD gene next to ribosomal RNA genes. *Science*. 224:1447-1449.
157. Worton RG, Thompson M (1988) Genetics of Duchenne muscular dystrophy. *Ann Rev Genet*. 22:601-629.
158. Worton RG (1995) Muscular dystrophies: Diseases of the Dystrophin-glycoprotein complex. *Science*. 270:755-756.
159. Zatz M, Vianna-Morgante AM, Campos P, Diament AJ (1981) Translocation (X;6) in a female with Duchenne muscular dystrophy: Implications for the localization of the DMD locus. *J Med Genet*. 18:442-447.
160. Zeng YT, Chen MJ, Qui XH, Huang SZ (1991) Analysis of RFLPs and DNA deletions in the Chinese Duchenne muscular dystrophy gene. *J Med Genet*. 20:167-171.