



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

"IDENTIFICACION DE ELIMINACIONES EN EL GEN DE  
DISTROFINA (DMD) EN PACIENTES CON DIAGNOSTICO  
DMD/DMB Y DETECCION DE PORTADORAS DE LAS  
MISMAS MEDIANTE EL ANALISIS POR RT-PCR DEL  
TRANSCRITO DEL GEN DMD"

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
P R E S E N T A :  
**FIDEL OMAR HERNANDEZ AGUILAR**

ASESORES: DR. RAMON M. CORAL VAZQUEZ

DRA. HAYDEE ROSAS VARGAS

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2005

m. 340538



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



ESTADO LIBRE Y SOBERANO  
DE QUERÉTARO  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Identificación de eliminaciones en el gen de distrofina (DMD) en pacientes con diagnóstico DMD/DWB y detección de portadoras de las mismas mediante el análisis por RT-PCR del transcrito del gen DMD.

que presenta el pasante: Fidel Omar Hernández Aguilar  
con número de cuenta: 09853138-3 para obtener el título de  
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Junio de 2004

- PRESIDENTE QFI. Andrea Becerril Osaya *Andrea A. Becerril*
- VOCAL DRA. Sandra Díaz Barriga Arceo *Sandra*
- SECRETARIO DR. Ramón Coral Vázquez *Ramón*
- PRIMER SUPLENTE QFB. Rosalba Bonilla Sánchez *Rosalba B.*
- SEGUNDO SUPLENTE DRA. Norma Laura Delgado Buenrostro *Norma*

*A la familia Sotelo Rodríguez de SM:  
Celestino, Martha, Martha Ofelia, Katy  
y Luis, como muestra del amor que les  
profeso.*

---

## Agradecimientos

A Juan y Jorge Bustamante y sus respectivas familias, por la oportunidad de dejarme trabajar en su empresa, porque la convivencia crea lazos inquebrantables, por la amistad incondicional y porque sin su ayuda esto no hubiera sido posible.

A Carla Paulín, por estar siempre ahí, por quererme y cuidarme, por el camino que hemos recorrido juntos, por compartir el sueño, por dejarme ser parte de tu vida.

TE AMO.

Al Dr. Ramón Coral, por su liderazgo, su paciencia, su apoyo, su gran disposición a compartir sus conocimientos y por dejarme pertenecer a su grupo de trabajo.

A la Dra. Haydeé Rosas por su ejemplo de dedicación, esfuerzo y perfección en el trabajo, por su guía, por la amistad, y por los libros compartidos.

Al Daniel "Brozo" por el préstamo de su compu para la elaboración de esta tesis. Por la hermandad y porque siempre está presto a ayudar.

A mis amigos de la escuela por todo lo que vivimos, por las fiestas, las películas, las fotos, la música. Ahí va la lista: Luisa, Renata, Jessica, Nancy, Silvia, Gina, Carla, Marlene, Sandy, Alexa, Mimis, Beto, Luis, Saúl, Alberto.

A la familia, porque, la familia es la familia.

---

–No tengo el gusto de conocer a vuacé.

–Algunos de estos señores sí me conocen –respondió el capitán en su mismo tono–. Y me huelga mucho acompañar a vuestra merced en nombre de los amigos que no pueden hacerlo.

–No se diga más –Ganzúa me observaba, amable, tras sus enormes bigotazos–. ¿Os acompaña el mozo?

El capitán dijo que sí, y yo asentí a mi vez, con un saludo de cabeza que me salió muy cortés y motivó gestos de aprobación de los asistentes; que nadie aprecia tanto la modestia y la buena crianza en los jóvenes como la gente de la carda.

–Buena planta tiene –dijo el jaque–. Que tarde mucho en verse en éstas.

–Amén –rubricó Alatraste.

Terció Saramago el portugués para alabar mi presencia allí. Que es edificante para la mocedad, dijo arrastrando mucho las eses con su acento lusitano, ver cómo se despide de este mundo la gente de hígados y de honra, y más en estos tiempos cuitados en que todo son desvergüenza y malas costumbres. Pues dejando aparte la fortuna de nacer en Portugal –que no estaba al alcance de todos, por desgracia– nada instruía tanto como ver bien morir, tratar a hombres sabios, conocer tierras y la lección continua de buenos libros.

–así –concluyó, poético– con Virgilio dirá el rapaciño *Arma virumque cano*, y *Plus quam civilia campos* con Lucano.

(Las aventuras del capitán Alatraste. Volumen IV. El oro del Rey. Capítulo VI. Págs. 182-183).

---

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Genética molecular de la UIM. en Genética Humana del Hospital de pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Bajo la dirección del Dr. Ramón M. Coral Vázquez y la Dra. Haydeé Rosas Vargas.

---

## ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras y tablas.....	ii
Abreviaturas.....	iii
Resumen.....	v
1. Introducción.....	1
1.1. Distrofia muscular de Duchenne/Becker.....	1
1.2. El gen <i>DMD</i> .....	2
1.3. Distrofina.....	3
1.4. Complejo de proteínas asociadas a distrofina.....	5
1.5. Mutaciones en el gen <i>DMD</i> .....	8
1.6. Identificación de portadoras.....	10
2. Justificación.....	12
3. Objetivos.....	13
4. Material y métodos.....	14
4.1 Grupo de estudio.....	14
4.1.1. Pacientes analizados.....	14
4.1.2. Mujeres analizadas.....	14
4.2. Extracción de DNA genómico.....	16
4.3. Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa multiplex.....	17
4.4. Aislamiento de RNA total de linfocitos pertenecientes a.....	19
familias con antecedentes DMD/DMB	
4.5. Transcripción reversa acoplada a la Reacción en Cadena.....	20
de la Polimerasa (RT-PCR)	
5. Resultados.....	22
5.1. Amplificación individual por PCR de un hombre sano sin.....	22
DMD/DMB, utilizado como control positivo	
5.2. Identificación de deleciones en el gen <i>DMD</i> en pacientes.....	22
mexicanos con diagnóstico DMD/DMB	
5.3. Delimitación de las deleciones situadas en el "punto caliente".....	26
mayor y correlación clínico-molecular	
5.4. Diagnóstico molecular de mujeres portadoras de la DMD/DMB.....	29
6. Discusión.....	34
7. Conclusiones.....	43
8. Anexo.....	44
9. Referencias.....	47

---

---



## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>FIGURA 1.</b> El gen <i>DMD</i> y la proteína distrofina.....	4
<b>FIGURA 2.</b> El complejo de proteínas asociadas a distrofina.....	7
<b>FIGURA 3.</b> Árbol genealógico completo de la familia analizada..... para determinar el estado de portadora/no portadora	15
<b>TABLA I.</b> Ubicación, secuencia y temperatura de alineamiento..... de los oligonucleótidos utilizados para la PCR y el tamaño de los fragmentos amplificados.	18
<b>FIGURA 4.</b> Amplificación individual de los exónes de los "puntos calientes".....	23
<b>FIGURA 5.</b> Amplificación por PCR multiplex del "punto caliente" menor y..... de los exónes 70 y 74	24
<b>FIGURA 6.</b> Amplificación por PCR multiplex del "punto caliente" mayor.....	25
<b>TABLA II.</b> Registro de deleciones y correlación clínico-molecular..... en pacientes con DMD/DMB	27
<b>FIGURA 7.</b> Esquema del "punto caliente" mayor del gen <i>DMD</i> ..... y la distribución de las deleciones	28
<b>FIGURA 8.</b> Integridad del RNA total extraído de linfocitos de sangre..... periférica	31
<b>FIGURA 9.</b> Árbol genealógico y productos de amplificación obtenidos..... por RT-PCR para identificación de portadoras	32
<b>FIGURA 10.</b> Representación de los productos obtenidos por RT-PCR.....	33
<b>FIGURA 11.</b> Análisis de Distrofina por inmunohistoquímica.....	36
<b>FIGURA 12.</b> Esquema para explicar la "hipótesis del marco de lectura".....	40

## ABREVIATURAS

A	oligonucleótido antisentido
Agua DEPC	agua dietilpirocarbonatada
°C	grados centígrados
CC	espiral enrollada
cDNA	DNA complementario
DPC	complejo de proteínas asociadas a distrofina
CPK	creatinina fosfocinasa
DMD	distrofia muscular de Duchenne
DMB	distrofia muscular de becker
<i>DMD</i>	gen codificante para distrofina
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP's	desoxirribonucleótidos trifosfato
D.O	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
EF	marco de lectura en fase
FF	marco de lectura fuera de fase
FISH	hibridación con fluorescencia <i>in situ</i>
Kb	kilobases
kDa	kilodaltones
MAPH	sonda de hibridación amplificable multiplex
Mb	megabases
ml	mililitros
mM	milimolar
m-mlv	virus de la leucemia murina de Molones
ng	nanogramos
nm	nanometros

pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
RCLB	buffer para lisis de glóbulos rojos
RNA	ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensajero
r.p.m.	revoluciones por minuto
RT-PCR	transcripción reversa acoplada a reacción en cadena de la polimerasa
S	oligonucleótido sentido
SDS	dodecilsulfato de sodio
STR	secuencias intragénicas polimórficas repetidas en tándem
TGO	transaminasa glutámico oxalacética
UV	luz ultravioleta
V	volts
μg	microgramos
μl	microlitros

## Resumen

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) y su variante alélica la distrofia muscular de Becker (DMB) son enfermedades que se heredan de forma recesiva ligada al cromosoma X, transmitidas por mujeres portadoras y son causadas por mutaciones en el gen *DMD* que codifica para la proteína membranar denominada distrofina. La DMD/DMB se caracteriza principalmente por debilitamiento muscular progresivo y degeneración muscular.

El 65% de las mutaciones en el gen de distrofina son deleciones, mismas que se agrupan principalmente en el extremo 5' y en la región media del gen y se les conoce como "punto caliente" menor y mayor, respectivamente.

En el 93% de los pacientes en quienes se han delimitado las eliminaciones existe una correlación clínico-molecular, la cual se asocia con la presencia o no de alteraciones en el marco de lectura del gen, dando como resultado DMD o DMB, respectivamente.

Las deleciones pueden identificarse utilizando la técnica de PCR multiplex, amplificando por bloques los exónes de las regiones mencionadas. Sin embargo, la identificación de portadoras por los métodos utilizados en la detección de mutaciones en pacientes es difícil debido a que se trata de mutaciones en el cromosoma X y las mujeres portadoras (46 XX) conservan una copia del gen silvestre en uno de sus cromosomas. Por tal razón es necesario desarrollar metodologías que auxilien en la detección de portadoras de manera rápida y confiable.

En el presente trabajo se analizaron 20 pacientes con diagnóstico clínico DMD/DMB por la técnica de PCR multiplex con 15 pares de oligonucleótidos divididos en 6 grupos para detectar eliminaciones en los "puntos calientes" del gen *DMD* y poder delimitar la extensión de las eliminaciones y así establecer la correlación clínico-molecular de acuerdo a lo que establece la "hipótesis del marco de lectura".

Mediante el análisis por PCR multiplex se encontraron 7 pacientes con eliminaciones dentro del "punto caliente" mayor y ninguno con eliminaciones en el "punto caliente" menor.

En 5 de los 7 pacientes se pudo delimitar la extensión de las eliminaciones, uno de ellos no presentó correlación clínico-molecular; la eliminación de los exónes 46 al 50 da como resultado un fenotipo Duchenne, pero el paciente presenta un fenotipo Becker probablemente ocasionado por un procesamiento alternativo que restaura el marco de lectura del gen.

Para el análisis de portadoras se implementó la técnica de RT-PCR en una familia con antecedentes DMD en la que existe una portadora obligada, con una deleción en el exón

45, y 3 mujeres con riesgo de haber heredado el gen alterado. De las cuales se encontró a 2 mujeres portadoras y una no portadora.

En conclusión, podemos afirmar que la gravedad de la enfermedad está dada por el efecto de las eliminaciones en el marco de lectura del gen; que el estudio de los pacientes con diagnóstico DMD/DMB debe ser integral para poder brindarles un diagnóstico correcto que lleve a un asesoramiento médico adecuado y, que la técnica de RT-PCR se puede utilizar como técnica alternativa para detectar portadoras en los casos de los pacientes donde es posible detectar la eliminación.

## 1. Introducción

### 1.1. Distrofia muscular de Duchenne/Becker

El término distrofia muscular abarca un diverso grupo de desórdenes hereditarios caracterizados por un debilitamiento muscular progresivo y degeneración muscular.

El modo de herencia, la edad de inicio y la progresión total se han utilizado para clasificar las diferentes clases de distrofia muscular.

Dentro de las distrofias ligadas al cromosoma X se halla la distrofia muscular de Duchenne (DMD), descrita por primera vez por el médico francés G. Duchenne de Boulogne en el año 1868, así como la distrofia muscular de Becker (DMB), descrita por el alemán Peter Emil Becker en el año 1957. Ambos padecimientos se heredan de forma recesiva ligada al cromosoma X, se transmiten por mujeres portadoras, y son causados por mutaciones en el gen *DMD*. Worton y col. (1988) propusieron que un tercio de los casos de DMD/DMB se debe a mutaciones de *novo*, un tercio a la herencia de mujeres portadoras sin antecedentes de la enfermedad y un tercio por la herencia del gen presente desde las primeras generaciones de la familia.

La DMD afecta aproximadamente a uno de cada 3,500 hombres nacidos vivos (Emery, 1993) y se manifiesta entre los 2 y 5 años de vida empiezan con dificultad para subir escaleras y correr, aumento en el movimiento de rotación de cadera al caminar, debilidad en los miembros proximales, pseudohipertrofia en las pantorrillas y signo de Gowers. El examen de laboratorio muestra algunas enzimas séricas elevadas como la aldolasa, la transaminasa glutámico oxalacética (TGO), la 2-deshidrogenasa láctica y la creatinina fosfocinasa (CPK). Los niveles altos de CPK, de al menos dos órdenes de magnitud con respecto al nivel normal, se deben a que esta enzima que se origina en músculo, se escapa al suero por el daño en el tejido muscular. La debilidad muscular provoca que los pacientes con DMD pierdan su capacidad para caminar de manera progresiva y tengan que depender de una silla de ruedas para poder desplazarse antes de alcanzar la edad de 12 años. Estos pacientes generalmente mueren en sus primeros años de adolescencia o alrededor de los veinte años, usualmente de fallas respiratorias debido a la debilidad de los músculos intercostales e infecciones respiratorias. Otra causa de mortalidad en este tipo de pacientes son las cardiomiopatías (Perloff et al., 1984).

La forma benigna de la enfermedad conocida como DMB es menos grave que la DMD y su incidencia es de 1/30, 000 varones nacidos vivos, tiene un inicio mucho más tardío que la DMD y su expectativa de vida es mayor, el 90% de los pacientes llegan a vivir hasta la

cuarta o quinta década de vida y algunos pacientes pierden la movilidad hasta una edad avanzada. La DMB se caracteriza por debilidad muscular menos grave. Los pacientes con DMD/DMB pueden llegar a presentar retraso mental no progresivo causado, tal vez, por la expresión anormal de la distrofina de cerebro (Blake et al., 2000; Mehler, et al., 2000).

## 1.2. El gen *DMD*

La identificación del gen *DMD* (distrofina) en el cromosoma X fue el primer triunfo de la clonación posicional y abrió una nueva era en la investigación de la distrofia muscular de Duchenne/Becker. El gen *DMD* se localiza en el cromosoma Xp21 (Emanuel et al., 1983; Hoffman et al., 1987). Este gen es el más grande conocido hasta ahora ya que cuenta con 79 exónes distribuidos sobre aproximadamente  $2.5 \times 10^6$  pb representando el 1% del DNA del cromosoma X (Koenig et al., 1987; Den Dunnen et al., 1987; Monaco et al., 1987; Gutman y Fishbeck, 1989; Roberts et al., 1993).

La expresión del gen *DMD* da origen a un transcrito de 14 Kb que se expresa predominantemente en músculo cardíaco y esquelético con cantidades más pequeñas en cerebro (Koenig et al., 1987; Chelly et al., 1988; Monaco et al., 1987; Roberts et al., 1993). Sin embargo, se ha demostrado que el gen *DMD* se transcribe a nivel basal en diversas líneas celulares no musculares como son linfoblastos, linfocitos y fibroblastos (Sarkar y Sommers, 1989) por transcripción ilegítima (Chelly et al., 1986; 1988; 1991). El producto de este transcrito se traduce en una proteína denominada distrofina (Koenig et al., 1987).

La transcripción del gen que produce la distrofina de músculo da inicio cuando los mioblastos empiezan a diferenciarse en fibras musculares multinucleadas, lo cual es similar a lo que sucede en otros genes músculo-específicos, tal es el caso de las subunidades de la miosina y enzimas como la creatinina fosfoquinasa (Klamut et al., 1989; Nudel et al., 1989; Weintraub et al., 1991).

La expresión del transcrito "completo" del gen de distrofina es controlado por 3 promotores regulados independientemente (Figura 1A). Los transcritos regulados por los promotores de cerebro (B), músculo (M) y células de Purkinje (P) difieren únicamente en el primer exón que al madurar el RNAm se empalma una serie común de 78 exónes (Boyce et al., 1991; Chelly et al 1990; Gorecki, 1992; Klamut et al., 1990; Makover et al., 1991; Nudel et al., 1989). Los nombres de estos promotores reflejan el sitio principal donde se expresa la distrofina. El promotor B conduce la expresión inicialmente en

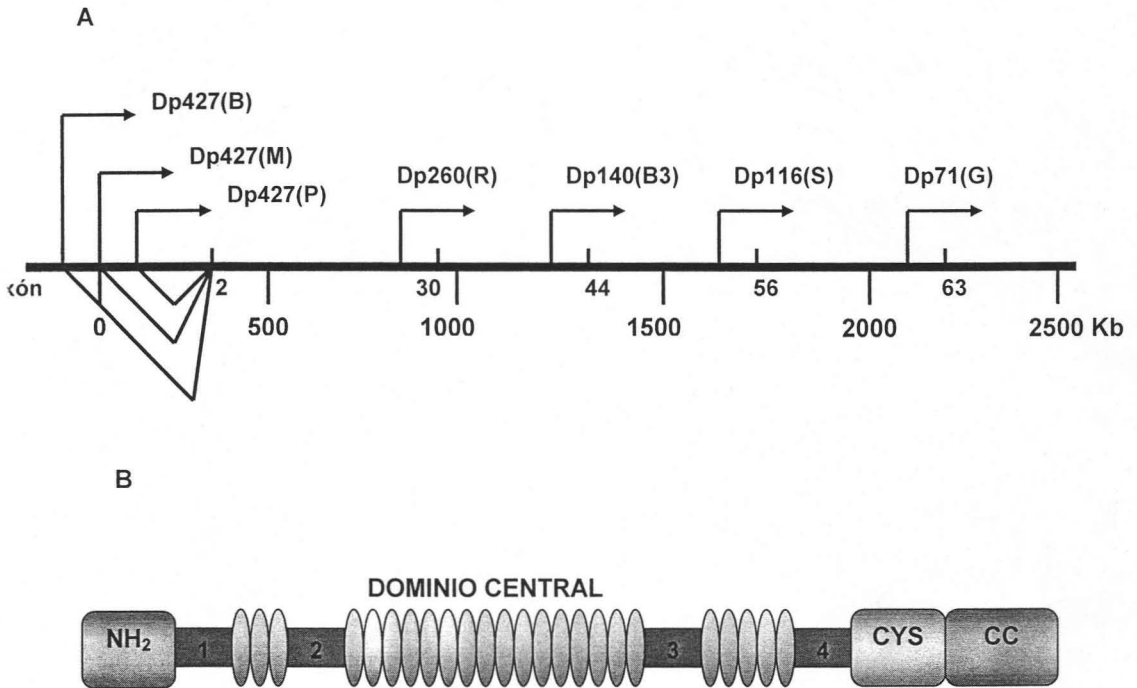
neuronas corticales y el hipocampo del cerebro (Barnea et al., 1990; Chelly et al 1990; Gorecki et al., 1992), mientras que el promotor P se activa en las células de Purkinje y en músculo esquelético (Gorecki et al., 1992; Holder et al., 1996). El promotor M resulta en altos niveles de expresión en músculo esquelético y cardiomiocitos y en bajos niveles en células gliales de cerebro (Barnea et al., 1990; Chelly et al 1990). Estos tres promotores están situados dentro de un intervalo genómico de aproximadamente 400 Kb (Boyce et al., 1991).

El gen *DMD* tiene además, por lo menos cuatro promotores internos que dan origen a transcritos de distrofina más cortos que codifican para isoformas truncadas COOH-terminales. Estos promotores internos se denominan: retinal (R), cerebro-3 (B-3), célula de Schwann (S), y general (G). Cada uno de estos promotores utilizan un único primer exón que se empalma a los exónes 30, 45, 56, y 63, respectivamente, para generar proteínas de 260 kDa (Dp260) (D'Souza *et al.*, 1995), 140 kDa (Dp140) (Lidov et al., 1995), 116 kDa (Dp116) (Byers et al., 1993) y 71 kDa (Dp71) (Blake et al., 1992; Hugnot et al., 1992; Lederfein et al., 1992).

### 1.3. Distrofina

La distrofina es una proteína compuesta por 3,685 aminoácidos con un peso molecular de 427-kDa, representa el 5% de las proteínas del citoesqueleto (Ervasti et al., 1993) y es miembro de la familia de proteínas de la  $\beta$ -espectrina/ $\alpha$ -actinina (Figura 1B) (Koenig et al., 1988). La distrofina puede ser organizada en cuatro regiones separadas, basadas en las secuencias homólogas y en la capacidad de unirse a otras proteínas. Éstas son: el dominio de unión a la actina en el extremo amino-terminal, el dominio central, el dominio rico en cisteína y el dominio COOH-terminal. El dominio central, el más grande, comprende a los aminoácidos 253-3112, dispuestos en 24 (Koenig et al., 1988) ó 25 (Cross et al., 1990) repetidos homólogos, cada uno con cerca de 100 aminoácidos dispuestos a manera de triple alfa hélice similares a los repetidos de la espectrina (Ahn et al., 1993). Este grupo de repetidos  $\alpha$ -hélice es sensible a proteasas (Kunkel et al., 1989) y le da flexibilidad a la molécula, similar a la  $\beta$ -espectrina, ya que cuenta con 4 regiones intercaladas que son ricas en prolina y funcionan como bisagras (Cross et al., 1990; Koenig et al., 1990).





**FIGURA 1.** Representación esquemática del gen *DMD* y la proteína distrofina. A) El gen *DMD* tiene una longitud de 2.5Mb que codifica para 7 isoformas de la proteína. Los transcritos "completos" de distrofina se transcriben a partir de 3 promotores (señalados con flechas) en el extremo 5' del gen. Cada RNAm codifica para una proteína de 427-kDa que solo difiere en sus secuencias NH<sub>2</sub>-terminal. Los 4 promotores que se encuentran en la región media y hacia el extremo 3' transcriben diferentes RNAm que codifican para isoformas más pequeñas de la proteína. B) la proteína distrofina está compuesta por 3,685 aminoácidos, con un peso molecular de 427-kDa y se divide en cuatro dominios: el dominio de unión a la actina en el extremo amino-terminal, el dominio central que cuenta con cuatro regiones ricas en prolina que le dan flexibilidad a la molécula, el dominio rico en cisteína y el dominio COOH-terminal.

El tercer dominio es el dominio rico en cisteína (aminoácidos 3113-3270) que se une al  $\beta$ -dístroglicano.

El último dominio corresponde a la región carboxilo (3271-3685 aminoácidos) y contiene dos polipéptidos alargados que pueden formar espirales enrolladas similares a las del dominio principal (Blake et al., 1995). Este dominio se ha denominado el dominio CC (por sus siglas en inglés CC: colied coil). La región CC de la distrofina forma el sitio de unión a la distrobrevina y puede modular la interacción entre sintrofina y otras proteínas asociadas a la distrofina (Blake et al., 1995; Sadoulet- puccio et al. 1997) (Figura 2).

La distrofina se encuentra presente en la membrana de diversas células especializadas, por tal razón se le puede considerar como una molécula que tiene una variedad de funciones, algunas de éstas son:

- Estabilidad a la membrana durante los procesos de contracción muscular
- Transducción de la fuerza; puede ser el vínculo entre la fuerza contráctil producida en el dominio intracelular con el ambiente extracelular.
- Organización en membranas especializadas; se cree que puede organizar la topología de la membrana o mantener las concentraciones de los componentes de la membrana en tejidos no contráctiles.

#### **1.4. Complejo de proteínas asociadas a distrofina**

Diversos estudios han demostrado que la distrofina se encuentra asociada con un conjunto de proteínas formando el complejo de proteínas asociadas a distrofina (DPC, por sus siglas en inglés: Dystrophin-Protein Complex) (Ervasti et al., 1990; Yoshida et al., 1990).

El DPC se puede dividir en varios subcomplejos separados basados en su localización dentro de la célula y su asociación física con otros. Yoshida y col. (1994) demostraron que el DPC se puede disociar en tres complejos distintos. Estos complejos son: 1) el complejo dístroglicano ( subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  ), 2) el complejo sarcoglicano ( subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$ ; sarcospan), localizados en el sarcolema (Crosbie et al.,1997), y 3) las proteínas del citoesqueleto, distrofina, las sintrofinas ( $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ) y las distrobrevina  $\alpha$  y  $\beta$ . La figura 2 muestra una representación esquemática del modelo aceptado actualmente del DPC de músculo esquelético.

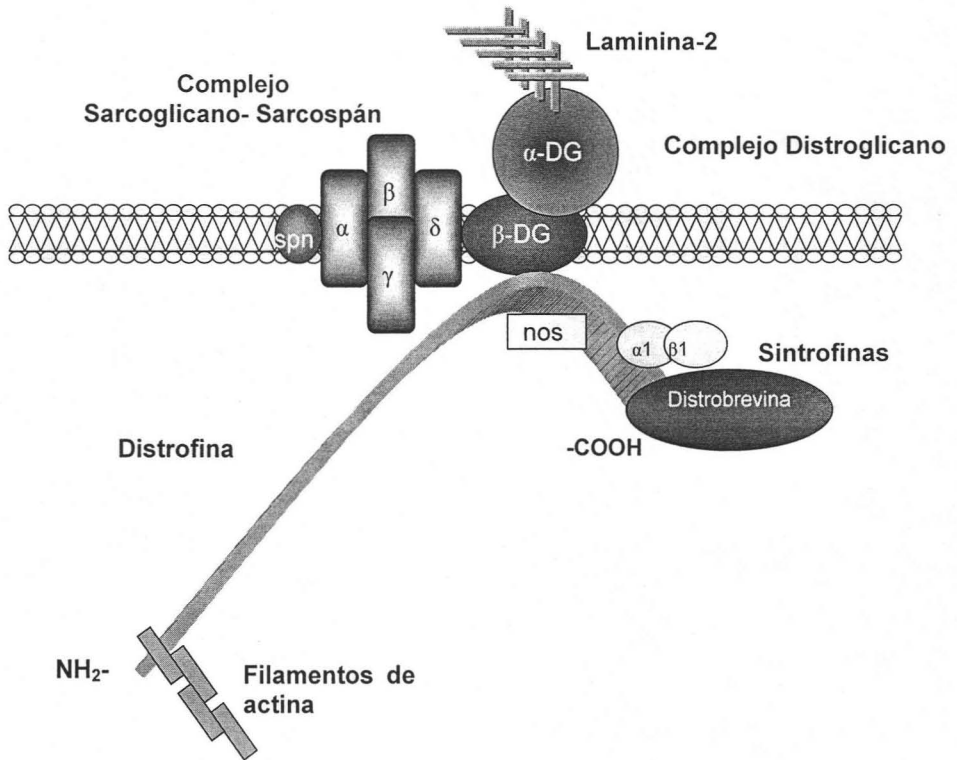
Un papel importante del DPC para la función del músculo y su estabilidad es el de proporcionar soporte mecánico a la membrana plasmática durante la contracción

muscular. Recientemente se sugiere que el DPC participa en la señalización celular (Hack et al., 2000; Thomas et al., 2001).

El estudio de este complejo es el centro de las hipótesis relativas a la patogénesis de la distrofia muscular (Campbell, 1995) aunque, subsecuentes estudios de varias formas de distrofia muscular han identificado nuevos genes que codifican para proteínas de localización subcelular diferente del complejo DPC.

El rompimiento del enlace que une a la matriz extracelular con el citoesqueleto (Ibraghimov-Beskovnaya et al., 1992) causado por mutaciones en la distrofina o los sarcoglicanos produce inestabilidad en el sarcolema, lo cual induce a las fibras musculares a ser susceptibles a necrosis al alterar el mecanismo regulador de calcio, evento principal en las distrofias musculares (Ibraghimov-Beskovnaya et al., 1992; Tay et al., 1990). El incremento de calcio intracelular deriva en la activación de proteasas específicas que provocan la necrosis.

Cuando no hay presencia de distrofina otras proteínas del complejo de proteínas asociado a distrofina son desplazadas del sarcolema lo que conduce a la degeneración progresiva del músculo y ocasiona problemas con su capacidad de regeneración, para que al final las fibras musculares sean sustituidas por tejido adiposo y tejido conectivo fibroso (Blake et al., 2002; Porter JD, 2000).



**FIGURA 2.** El complejo de proteínas asociadas a distrofina (DPC) en músculo esquelético.

### 1.5. Mutaciones en el gen *DMD*

Las mutaciones que causan DMD generalmente resultan en la ausencia o en niveles muy reducidos de la proteína distrofina, mientras que en los pacientes con DMB se produce una proteína parcialmente funcional.

La caracterización de este gen ha permitido el estudio de la naturaleza de las mutaciones dentro de él. Las deleciones son el tipo de mutaciones más frecuentes (65%) (Love et al., 1989; Den Dunnen et al., 1989) aunque se han reportado algunas translocaciones, más frecuente en mujeres portadoras, y duplicaciones parciales del gen en 10% de los pacientes (Worton et al., 1988).

El análisis de DNA de pacientes con DMD/DMB ha demostrado que en 50-70% de los casos estos fenotipos son el resultado de deleciones localizadas principalmente en la región proximal o distal del gen de la distrofina, a estas regiones se les llama "puntos calientes" menor y mayor, respectivamente (Darras et al., 1988; Baumbach et al., 1989; Den Dunnen et al., 1989).

El "punto caliente" menor comienza en el intrón 1 y abarca a los exónes del 2-20 removiendo parcial o totalmente los sitios de unión a la actina con parte del dominio central (Liechti- Gallati et al., 1989; Koenig et al., 1988; Den Dunnen et al., 1989; Oudet et al., 1992), mientras que el "punto caliente" mayor empieza en el intrón 44, abarcando a los exónes 45-53 y removiendo parte del dominio central (Beggs et al., 1990), reportándose en este intrón el inicio de la mayoría de las eliminaciones (Koenig et al., 1988; Den Dunnen et al., 1989; Roberts et al., 1993).

La razón de la existencia de estos dos "puntos calientes" no está clara. Es posible, sin embargo, que la estructura de la cromatina en la región Xp21 influya en el evento de recombinación o deleción de los dos "puntos calientes" (Blake et al., 2002). Se han propuesto dos hipótesis para explicar la existencia de estos "puntos calientes"; la primera propone la existencia de secuencias peculiares dentro de los intrones, que puede aumentar la frecuencia de eliminaciones. La segunda plantea que debido al gran tamaño de los intrones, éstos son blanco fácil para posibles eliminaciones (Kunkel et al., 1989).

La falta de correlación entre la posición y la extensión de las eliminaciones con la gravedad de la enfermedad ha llamado la atención (Love et al., 1989), ya que existen casos de pacientes con DMB, cuyo análisis molecular mostró la presencia de eliminaciones mayores, al menos dos exónes más que en individuos con DMD; también se han observado casos en los que una misma eliminación causó manifestaciones clínicas diferentes. Para explicar lo anterior se ha postulado que los pacientes con DMD

tienen eliminaciones que dan origen a mutaciones sin sentido, resultando en proteínas truncadas. Contrariamente, en los individuos con DMB las eliminaciones dejan un marco de lectura abierto, o que permite una proteína pequeña pero parcialmente funcional (Koenig et al., 1989). Como evidencias de estas hipótesis se demostró por inmunotransferencia de proteínas de biopsias de músculo esquelético, que la distrofina está ausente o drásticamente reducida (< 3%) en pacientes con DMD y presente, aunque reducida en cantidad, (>10%) en pacientes con DMB (Hoffman et al., 1988).

No obstante existen excepciones, por ejemplo paciente con DMD con eliminaciones que producen un marco de lectura abierto, o enfermos con DMB que tienen eliminaciones que rompieron el marco de lectura, lo que se puede explicar por la presencia de RNAm pequeños con un marco de lectura abiertos originados por procesamientos alternativos, estos RNAm al parecer fueron capaces de producir una proteína parcialmente funcional.

Las deleciones pueden identificarse utilizando la técnica de Southern blot con sondas de DNA y cDNA (Koenig et al., 1987; Forrest et al., 1988; Hu et al., 1988). Debido a la alta frecuencia con que las deleciones que causan de la enfermedad se presentan dentro del "punto caliente" mayor y menor (50-70%), se implementó la técnica de amplificación simultánea por PCR (Beggs et al., 1990; Chamberlain et al., 1988; 1989) con el conjunto de exónes de las regiones mencionadas y se detectó el 98% de las eliminaciones identificadas por Southern blot. Por su confiabilidad y por lo simple de la prueba, esta técnica ha llegado a ser una alternativa real para detectar eliminaciones en el gen *DMD* y ha permitido un asesoramiento genético adecuado en la mayoría de las familias afectadas basado en el diagnóstico vía DNA (Armour et al., 2002; Coral-Vázquez et al., 1997; Chamberlain et al., 1992).

Un tercio de los casos de DMD se deben a pequeñas eliminaciones y mutaciones puntuales (sitios CpG) (Bulman et al., 1991), donde un cambio en una sola base, transición de C por T pueden dar origen a un codón de paro (TGA) en lugar de Arg (CGA) (Lenk et al., 1993; Roberts et al., 1992). Las mutaciones puntuales se han identificado (Koenig et al., 1988; Den Dunnen et al., 1989) utilizando la técnica de análisis de conformación de cadena sencilla (SSCP) y análisis heterodúplex; a diferencia de las deleciones que se agrupan en los "puntos calientes" del gen *DMD*, estas pequeñas eliminaciones y mutaciones puntuales se distribuyen de manera uniforme a lo largo de todo el gen, lo que ocasiona que su detección sea difícil debido al gran tamaño del gen.

## 1.6. Identificación de portadoras

Debido a la falta de un tratamiento para contrarrestar los efectos progresivos de la Distrofia muscular de Duchenne/Becker y a la falta de una rehabilitación eficiente, el asesoramiento genético y el diagnóstico prenatal son opciones que los genetistas pueden ofrecer actualmente, basando su decisión en la determinación del estado de portadora. Prácticamente, si la madre de un hijo afectado (caso índice) tiene otro hijo con DMD/DMB, se le considera como portadora obligada. Si existe un hermano afectado o un hijo enfermo, ella es una posible portadora. Pero en la mayoría de las familias solo existe un varón afectado. Por lo tanto, las mujeres emparentadas con un varón afectado son candidatas a un análisis de portadoras. Sin embargo, la identificación de portadoras por los métodos utilizados en la detección de mutaciones en pacientes es difícil debido a que estas mujeres son usualmente asintomáticas porque solo tienen mutado uno de sus dos genes que codifican para la distrofina. El gen normal se mantiene activo y produce distrofina suficiente para que el músculo tenga un funcionamiento normal.

Una de las pruebas que se llevan a cabo con más frecuencia para determinar la condición de portadora, es midiendo los valores de la enzima muscular creatinina fosfocinasa (CPK) en suero, los cuales son altos en la mayoría de las mujeres portadoras. Sin embargo, estos datos son informativos solo en el 70% de los casos (Swaiman et al., 1989; Gruemer et al., 1985), y en el 30% restante estos son imprecisos debido al hecho de que en una misma mujer, fluctúan los niveles de la CPK en función de diversos factores (Appel y Roses, 1983; Barkhaus y Gilchrist, 1989).

Esto ha motivado el desarrollo de diversos métodos, algunos de ellos todavía están en fase de investigación, que permitan una identificación más precisa. Entre los diferentes métodos se pueden mencionar los siguientes:

- **Análisis de ligamiento utilizando secuencias polimórficas repetidas (CA)<sub>n</sub>:** Estos microsatélites de 1 a 5 nucleótidos de longitud [secuencias variables repetidas en tándem (VNTRs)] (Clemens et al., 1991; Coral-Vázquez, tesis doctoral, 1995; Estrada Javier, tesis de maestría, 1995; Weissenbach et al., 1993) se heredan de forma mendeliana, son altamente polimórficos y pueden ser detectados en una secuencia de DNA. Esta prueba tiene 95% de confiabilidad debido a la posibilidad de recombinación.

- **Densitometría:** Van Essen y col (1997) reportaron que la prueba de detección de portadoras es posible por densitometría asignando un valor a la intensidad de la banda obtenida. Los valores obtenidos se comparan contra un estándar. Sin embargo la discriminación entre una dosis sencilla o doble es técnicamente demandante, requiere un excelente manejo de la técnica y una interpretación cuidadosa de los datos.
- **FISH (Hibridación con fluorescencia *in situ*):** En esta técnica se utilizan sondas de cósmidos, para aumentar la resolución, que sirven para detectar deleciones y duplicaciones en el gen *DMD* (Calvano et al., 1997). esta técnica es limitada porque solo puede utilizarse cuando se ha detectado la deleción en el paciente además, el costo de las sondas fluorescentes y del equipo es bastante elevado.
- **Sonda de hibridación amplificable multiplex (MAPH):** Esta técnica se basa en la recuperación cuantitativa de sondas, después de su hibridación a DNA inmovilizado. Los productos de PCR se marcan radiactivamente durante la amplificación y se leen de manera independiente en un secuenciador de capilares (White et al., 2002). Cada producto se identifica por su altura; el pico resultante es directamente proporcional al número de copias del gen. Los cambios en la altura del pico indican deleciones y duplicaciones en el gen. Las sondas empleadas son diseñadas para que solamente se utilice un par de oligonucleótidos, resolviendo así los inconvenientes de la eficiencia de alineamiento entre oligonucleótidos. Esta técnica es simple, rápida y permite analizar los 79 exónes del gen *DMD*.
- **PCR en tiempo real:** Esta técnica provee un medio para la detección continua de un producto a través de un proceso de amplificación evitando la etapa de separación en gel y operando en un sistema cerrado evitando así la contaminación del laboratorio con amplicones que pudieran interferir con ensayos posteriores. Los experimentos se llevan a cabo en un termociclador que incorpora un sistema óptico para la excitación de fluorocromos y el monitoreo de longitudes de onda de luz emitidas.



## 2. Justificación

La distrofia muscular de Duchenne/Becker representa el segundo padecimiento genético más común en humanos. Debido a la falta de una rehabilitación eficiente y un tratamiento para contrarrestar esta enfermedad, el diagnóstico correcto por medio de los hallazgos clínicos y el análisis molecular por PCR multiplex adquieren gran relevancia, porque gracias a ellos se le puede brindar al paciente la mejor rehabilitación posible para mejorar su calidad de vida, se puede extender el estudio a los demás miembros de la familia para detectar a otros varones que pudieran presentar la enfermedad, identificar a las posibles portadoras, determinar si existe el riesgo de que haya más varones afectados y que el médico genetista pueda brindar el consejo y la asesoría genética adecuada. Sin embargo, el análisis de portadoras todavía es difícil debido a la presencia de una copia normal del gen *DMD* en mujeres portadoras heterocigotas (2 cromosomas X). Por tal razón, es necesario desarrollar metodologías que ayuden a las técnicas actuales para la detección de portadoras de manera rápida y confiable.

### 3. Objetivos

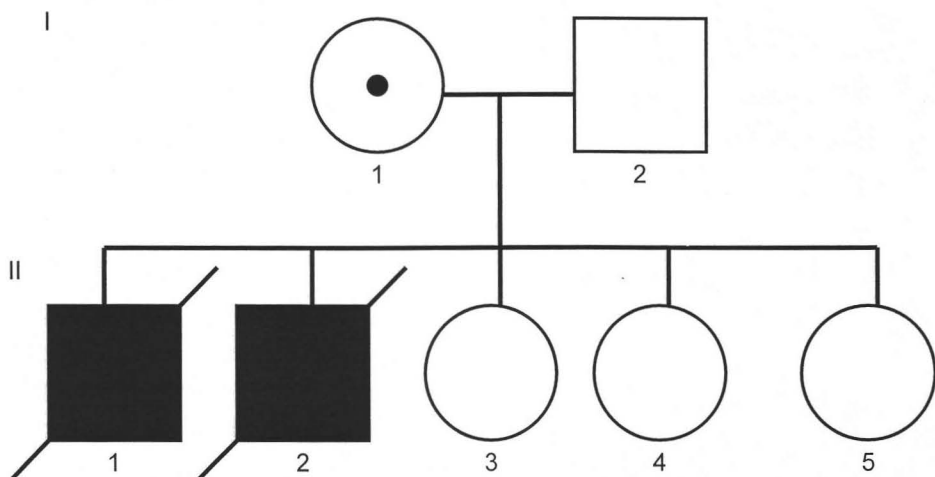
- Identificar eliminaciones en el gen *DMD* utilizando pruebas de amplificación simultánea (PCR multiplex) en pacientes mexicanos con diagnóstico de Distrofia muscular de Duchenne/Becker.
- Delimitar la extensión de las eliminaciones encontradas en los pacientes para poder establecer una correlación clínico-molecular de la enfermedad.
- Detectar mujeres portadoras pertenecientes a una familia con antecedentes DMD/DMB analizando el transcrito del gen *DMD* utilizando la técnica de RT-PCR.

## 4. Sujetos y métodos

### 4.1. Grupo de estudio

**4.1.1. Pacientes analizados.** Se estudiaron 20 pacientes con diagnóstico clínico de DMD/DMB con o sin antecedentes familiares de la enfermedad atendidos en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Hospital Infantil de México "Federico Gómez" y en el Hospital de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco". Los pacientes fueron diagnosticados como DMD o DMB por criterios clínicos y de laboratorio (ver anexo), tales como niveles en suero de la enzima creatinin fosfocinasa (CPK), seudohipertrofia de los músculos de la pantorrilla, anomalías histológicas del músculo y electromiográficas consistentes con una distrofia muscular progresiva.

**4.1.2. Mujeres analizadas.** Para el análisis de detección de portadoras por la técnica de RT-PCR se estudió una familia con antecedentes de DMD. Esta familia, integrada por 7 miembros: el padre, la madre, 2 hijos varones y 3 mujeres (figura 3), formó anteriormente parte de un protocolo de investigación para detectar pacientes con DMD/DMB y portadoras de mutaciones en el gen *DMD* (Coral-Vázquez, Tesis doctoral, 1995). En ese estudio se identificó una delección en el exón 45 en los dos hijos varones con un fenotipo Duchenne característico. Es importante señalar que ambos varones actualmente han fallecido a causa de este padecimiento. Por estos antecedentes y la confirmación del estado de portadora obligada con una mutación en el exón 45 en uno de los dos alelos del gen *DMD*, la madre fue utilizada en este trabajo como testigo. Sin embargo, como no fue posible determinar en ese estudio el estado de portadoras o no portadoras de las tres hijas, se utilizaron en este trabajo como candidatas a un análisis de portadoras.



**FIGURA 3.** Árbol genealógico completo de la familia analizada para determinar el estado de portadora/no portadora por la técnica de RT-PCR, de las tres hijas. El círculo marcado con el punto negro (I1) representa a la portadora obligada, utilizada como testigo en este estudio; los dos niños varones fallecidos a causa de la DMD son representados con los dos cuadros negros con líneas diagonales (II1 y II2); las tres mujeres a las que se les realizó el análisis de portadoras se presentan con círculos (II3, II4 y II5).

## 4.2. Extracción de DNA genómico.

El DNA genómico de 20 pacientes con diagnóstico DMD/DMB se obtuvo de leucocitos de sangre periférica utilizando el método de sales hipertónicas. Las muestras de sangre se colectaron en vacutainer utilizando EDTA como anticoagulante, éstas se centrifugaron a 2500 r.p.m./15 min. para obtener los leucocitos en la interfase los cuales se separaron con una pipeta Pasteur y se colectaron en un tubo limpio para ser lavados y así eliminar a los eritrocitos remanentes, utilizando para ello un amortiguador de lisis de eritrocitos RCLB (del ingles: Red Cell Lisis Buffer; Tris 10mM pH7.6, MgCl<sub>2</sub> 5mM y NaCl 10mM). La pastilla de células blancas resultantes se resuspendió en 180 µl de NaCl 5mM, se colectaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril y se le adicionaron 90 µl de SDS al 10% para lisar las células agitando vigorosamente y dejando incubar por 5 min. a temperatura ambiente, posteriormente se agregaron 615.9 µl de una solución saturada de NaCl para precipitar las proteínas, se incubó 5 min. a temperatura ambiente para posteriormente someterlo a centrifugación a 15,000 r.p.m./15 min. Se recuperó el sobrenadante en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml y se le adicionaron dos volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C). Una vez precipitado el DNA se separó de la solución alcohólica y se lavó un par de ocasiones con una solución de etanol al 75% para retirar las sales remanentes. Finalmente se dejó secar a temperatura ambiente y, dependiendo del tamaño de la pastilla, se resuspendió en un volumen de 20-60 µl de agua inyectable estéril.

A todas las muestras obtenidas se les calculó la concentración por medio de un análisis espectrofotométrico con luz UV realizando lecturas a 260 y 280 nm.

Sabiendo que 1 D.O.<sub>260</sub> = 50 ng/µl de DNA,

la concentración se calculó con la siguiente formula:

$$[\text{DNA}] \text{ ng}/\mu\text{l} = A_{260} (\text{dilución}^{-1})(50 \text{ ng}/\mu\text{l})$$

La relación 260/280 indica la pureza de DNA obtenido. Se considera que las relaciones comprendida entre 1.8 y 2.0 unidades de D.O son las óptimas (Sambrook et al., 1989).

Para determinar la calidad de las muestras se realizaron electroforesis en geles horizontales de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio [10 mg/ ml] utilizando como amortiguador TBE 1X (Tris-base 89 mM, ácido bórico 89mM y EDTA 2mM) (Maniatis et al., 1989). Las muestras de DNA se mezclaron con colorante de corrida que contiene azul

de bromofenol al 0.1% y glicerol al 30% y se corrieron a un voltaje de 100 V. Los geles de agarosa se visualizaron en un analizador de imágenes.

#### **4.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) multiplex de pacientes con diagnóstico DMD/DMB.**

La detección de eliminaciones en el gen *DMD* de los 20 pacientes con diagnóstico DMD/DMB se llevó a cabo por PCR multiplex utilizando 17 pares de oligonucleótidos, diseñados previamente para otro estudio (Canizales Samuel, Tesis de maestría, 1998; Coral-Vázquez et al., 1997), divididos en 6 grupos; los tres primeros grupos comprenden a algunos exónes del denominado "punto caliente" menor (4, 8, 12, 13, 17, 19) y los exónes 70 y 74 del extremo 3': grupo a) exónes 4/13/12/8, con fragmentos de PCR de 78, 120, 151 y 182 pb (pares de bases), respectivamente; b) exónes 70/17, con fragmentos de PCR de 136 y 176 pb, respectivamente; c) exónes 19/74, con fragmentos de PCR de 88 y 159 pb, respectivamente; Los tres grupos restantes abarcan los exónes del "punto caliente" mayor: d) exónes 49/44/48, con fragmentos de PCR de 102, 144 y 186 pb, respectivamente; e) exónes 52/46/45, con fragmentos de PCR de 116, 148 y 212 pb, respectivamente y, finalmente, grupo d) exónes 50/47/51, con fragmentos de PCR de 106, 147 y 232 pb, respectivamente. La división de los exónes en estos grupos es para poder diferenciar claramente los productos obtenidos dependiendo de su tamaño. La secuencia de cada oligonucleótido, el tamaño de los productos de amplificación y la temperatura de alineamiento se describen en la tabla I.

Es importante mencionar que estos oligonucleótidos se diseñaron para amplificar el exón en su totalidad, excluyendo cualquier fragmento de los intrones, para poder determinar la extensión de las eliminaciones genéticas, ya que se diseñaron con las secuencias del cDNA de los extremos 5' y 3' de los exónes del "punto caliente" mayor y menor, además de los exónes 70 y 74, del gen *DMD*.

Las reacciones de amplificación se realizaron con los siguientes reactivos:

2.5 µl de Buffer de reacción 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl)

0.5 µl de mezcla de dNTP's 10mM

1.5 µl de MgCl 25mM

1.0 µl de cada oligonucleótido de concentración 10 mM

200-300 ng de DNA genómico

0.2 µl de Taq-polimerasa 5U/µl

y agua estéril inyectable para llevar la reacción a un volumen final de 25 µl.

EXÓN	OLIGONUCLEÓTIDOS EN DIRECCIÓN 5' → 3' <sup>a</sup>	TEMPERATURA DE ALINEAMIENTO °C	PRODUCTO AMPLIFICADO pb
4	S-CCAAAAGAAAAAGGATCCACAAGA A-ATTATTGTTCTGCAAACCCGCGAGT	55	78
8	S-ATGTTGATACCACCTATCCA A-CTGTTGAGAATAGTGCATTT	55	182
12	S-TTTACATAGAGTTTTAATGGATCTCC A-CTTATGTTGTTGTACTTGCGGTTT	55	151
13	S-GTGCTTCAAGAAGATTAGA A-CTTAAGTTGTTCTTCCAAAG	55	120
17	S-ATTTACAGGCTGTCACCAC A-CTTTTCTAATTCAGAATCCA	55	176
19	S-GCCATAGAGCGAGAAAAA A-CATTCACCATCTGTTCCA	55	88
44	S-CGATTTGACAGATCTGTTGAG A-GATACCATTTGTATTTAGCATGTTCC	55	144
45	S2-GAACTCCAGGATGGCATTGG A-CATTCCTATTAGATCTGTGCGCCTAC	55	212
46	S-GCTAGAAGAACAAAAGAATATCTTG A-CTTGACTTGCTCAAGCTTTTC	55	148
47	S-CTGGTGGAAGAGTTGCCCTG A-CTTTATCCACTGGAGATTTGTCTG	55	147
48	S-GTTTCCCAGAGCTTTACCTGAG A-CTGAACGTCAAATGGTCCTTCTTG	55	186
49	S-GAAAAGTGAATAGCAGTTCAAGC A-CTTCACTGGCTGAGTGGCTG	55	102
50	S-GGAAGTTAGAAGATCTGAGCTC A-GGCTCCAATAGTGGTCAGTC	55	106
51	S-CTCCTACTCAGACTGTTACTCTG A-CTTCTGCTTGATGATCATCTCG	55	232
52	S-GCAACAATGCAGGATTTGGAAC A-CAGTCCGTAATGATTGTTCTAGC	55	116
70	S-ACTACATCAGGAGAAGATGTTGAG A-TTTCCATGTTGCCCCCTCTAA	55	136
74	S-AGATGATGAACATTTGTTAA A-CTGTTTCTTCTCAAGATC	55	159

**TABLA I.** Ubicación, secuencia y temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos utilizados para la PCR multiplex, así como el tamaño del fragmento amplificado.

<sup>a</sup> S= oligonucleótido sentido

A= oligonucleótido antisentido

La incubación se realizó en un termociclador T gradient (Biometra) a las siguientes condiciones:

Una desnaturalización inicial del DNA de 94°C, 5 min., 30 ciclos de desnaturalización (94°C, 30 seg.), alineamiento (55°C, 30 seg.) extensión (65°C, 30 seg.) y una extensión final de 65°C por 5 min.

Los productos obtenidos se analizaron por electroforesis en geles horizontales de agarosa al 2%, teñidos con Bromuro de Etidio [10mg/ml] y se digitalizaron en un analizador de imágenes con el programa Digital Imaging System; En todos los casos se incluyó un control positivo, un control negativo y un marcador de peso molecular (escalera de 100 pb).

#### **4.4. Aislamiento de RNA total de linfocitos de sangre periférica**

El RNA total de la mujer utilizada como control sano, la portadora obligada y el de las posibles portadoras se obtuvo de linfocitos de sangre periférica, utilizando el método de extracción fenólica con TRIZOL (Invitrogen®) descrito a continuación:

Un volumen de sangre se mezcló con dos volúmenes de Ficoll-Hipaque (densidad 1.077) en un tubo cónico de 15 ml estéril y libre de RNAsas y se centrifugó a 1500 r.p.m./30min. Se separaron los linfocitos de la interfase con una pipeta Pasteur y se realizó un lavado con RCLB preparado con agua DEPC 1% (DiEtil PiroCarbonato) para compactar la pastilla. Posteriormente el paquete celular se resuspendió en 1ml de TRIZOL frío (Fenol-sales de guanidina) y se centrifugó 2500 r.p.m./5 min. a 4° C para precipitar restos celulares y proteínas. El sobrenadante se transfirió a un tubo estéril libre de RNAsas previamente enfriado y se le agregó 0.1 ml. de cloroformo frío, se agitó vigorosamente por 15 seg. y se incubó en hielo por 5 min., posteriormente se centrifugó por 15 min. a 9500 r.p.m. a 4° C para separar por diferencia de densidad la fase fenólica de la acuosa. La fase acuosa, la cual contiene al RNA, se transfirió a un nuevo tubo y se le agregó un volumen de isopropanol frío para precipitar el RNA. De esta solución se tomó una alícuota de 200µl se transfirió a un tubo estéril y se incubó a 4° C al menos por 45 min. El resto de la solución se almacenó a -70° C hasta su uso.

La alícuota de 200 µl se centrifugó 15 min. a 9500 r.p.m. a 4° C para compactar la pastilla de RNA. Transcurrida la centrifugación se desechó el sobrenadante y se lavó el RNA un par de veces con etanol al 75%. La pastilla se dejó secar a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió en 10 µl de agua DEPC (DiEtilPiroCarbonato).



Se verificó la integridad del RNA por medio de electroforesis corriendo 5 µl de éste en geles horizontales de agarosa al 1% teñidos con Bromuro de Etidio [10 mg/ml] utilizando como amortiguador TBE 1X (Tris-base 89mM, ácido bórico 89mM y EDTA 2mM) (Maniatis et al., 1989), a un voltaje de 70 V. Las cámaras de electroforesis se lavaron durante 15 min. con una solución de NaOH 0.2N y se enjuagaron con agua DEPC.

Todas las soluciones y reactivos empleados se prepararon con agua DEPC con la finalidad de inactivar RNAsas.

Las muestras de RNA obtenidas se cuantificaron espectrofotométricamente a 260nm con luz UV.

Sabiendo que  $1 \text{ D.O.}_{260} = 40 \text{ ng}/\mu\text{l}$  de RNA,  
la concentración se calculó con la siguiente formula:

$$[\text{RNA}] \text{ ng}/\mu\text{l} = A_{260} (\text{dilución}^{-1}) (40 \text{ ng}/\mu\text{l})$$

#### **4.5. Transcripción Reversa acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)**

A partir del RNA total de las posibles portadoras se sintetizó cDNA (DNA complementario) por medio de transcripción reversa utilizando el método de oligonucleótidos al azar el cual se realizó en dos pasos:

1º Una vez cuantificado el RNA se obtuvieron 2 µg de RNA total y se resuspendieron en 10 µl de agua DEPC. Esta solución se mezcló con 0.5 µl de oligonucleótidos al azar (0.3µg/µl) y agua para llevar el volumen final de ambos pasos de la reacción a 20 µl.

Esta mezcla se desnaturalizó a 72° C durante 3 min. en un termociclador y al final de este ciclo, mientras disminuía la temperatura, se le agregó la siguiente mezcla:

2º 4µl de buffer de transcriptasa reversa 5x (50 mM de Tris-HCl pH 8.3, 75 mM de KCl y 3mM de MgCl<sub>2</sub>)

1µl de solución de dNTP's 10mM

2 µl de detergente DTT 0.1M (dithiothreitol) como inhibidor de RNAsas y

1 µl de transcriptasa reversa M-MLV 200U/µl (virus de la leucemia murina de Moloney).

Una vez que se adicionó esta mezcla se sometió a un ciclo de síntesis de cDNA durante 60 min. a 37° C y finalmente, un ciclo de 6 min. a 94° C.

Para la PCR se utilizaron 2.5  $\mu$ l de cDNA y se preparó de la manera descrita anteriormente usando los oligonucleótidos de los exones que flanquean la eliminación, el exón 44 y el exón 46, y se incubó a las condiciones descritas en el apartado C. En la reacción se incluyó un control sano (una mujer sana sin eliminaciones en el gen *DMD*), un testigo (portadora obligada) y un control negativo (PCR sin el paso de formación de cDNA).

Los productos obtenidos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con Bromuro de Etidio [10mg/ml] incluyendo un marcador de peso molecular (escalera de 100 pb).

## 5. Resultados

### 5.1. Amplificación individual por PCR de un hombre sano sin DMD/DMB, utilizado como control positivo.

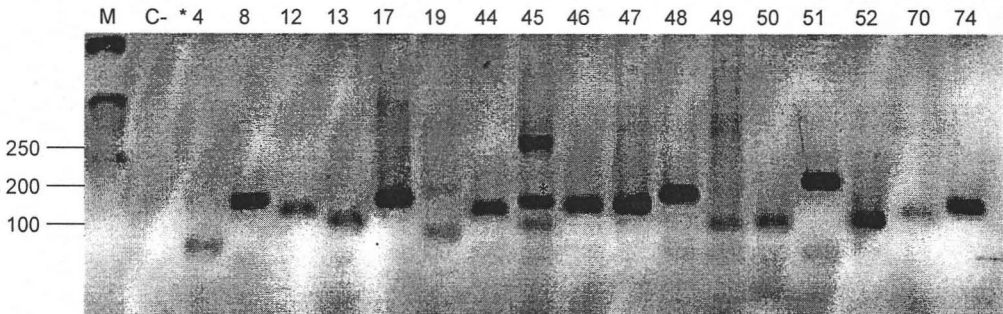
Para comprobar que los 17 pares de oligonucleótidos que amplifican los exónes del "punto caliente" mayor y menor del gen *DMD* utilizados en este estudio funcionaran correctamente, se procedió a amplificar el DNA genómico de un varón sano sin DMD/DMB y sin antecedentes familiares de ésta con los 17 pares de oligonucleótidos de manera individual por PCR, de la manera ya descrita.

Los productos de amplificación obtenidos se corrieron en geles horizontales de agarosa al 2% teñidos con Bromuro de Etidio. La figura 4 muestra que todos los oligonucleótidos utilizados funcionan correctamente ya que se obtuvieron los productos de reacción esperados.

### 5.2. Identificación de deleciones en el gen *DMD* en pacientes mexicanos con diagnóstico DMD/DMB.

Una vez que se comprobó que los juegos de oligonucleótidos funcionaran correctamente, el DNA genómico de los 20 pacientes con diagnóstico DMD/DMB se utilizó para realizar reacciones de amplificación simultánea multiplex.

Se detectaron deleciones en el gen de distrofina en 7 pacientes (35%) (Tabla II). No se encontraron eliminaciones hacia el extremo 5' del gen ni tampoco hacia el extremo 3' ya que el 100% de las eliminaciones se agruparon en la región media del gen a la que se le ha denominado "punto caliente" mayor. Entre los 7 pacientes con deleciones, 3 tienen eliminaciones solamente en un exón: p12, deleción en el exón 45 (Figura 6. panel B, carril 7), p13, deleción en el exón 44 (Figura 6. panel A, carril 8) y p18, deleción en el exón 51 (Figura 6. panel C, carril 11). Se encontraron 2 pacientes con deleción de dos exónes: p9, deleciones en los exónes 46 y 47 (Figura 6. panel A y B, respectivamente, carril 4) y p10, deleciones en los exónes 48 y 49 (Figura 6. panel A, carril 5) y finalmente se encontró un par de pacientes con 5 ó más exónes deletados: el p7, presenta una deleción que abarca los exónes 45 al 52 (Figura 6. panel A, B y C, carril 2) y el p16 con deleción de los exónes 46 al 50 (Figura 6. panel A, B y C, carril 9).

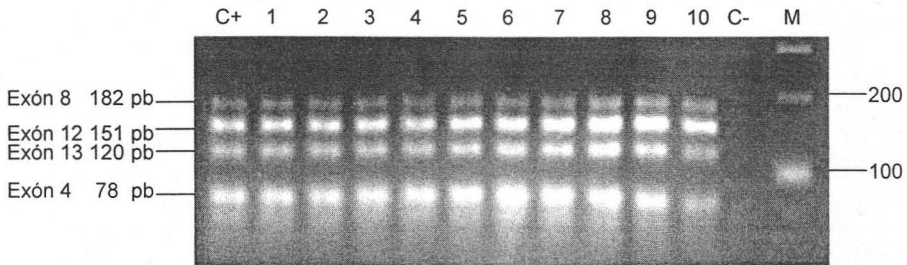
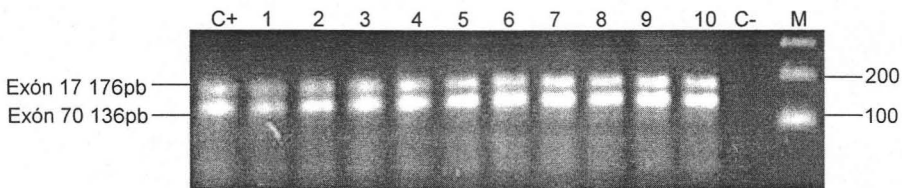
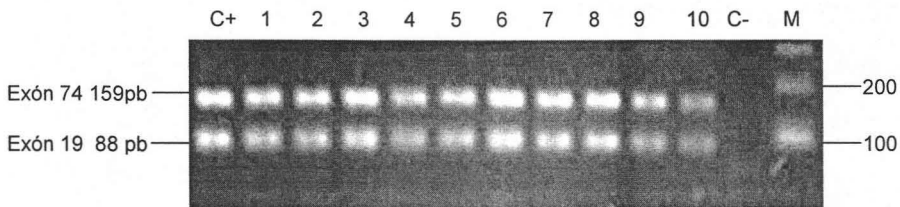


**M:** marcador de peso molecular

**C-:** control negativo

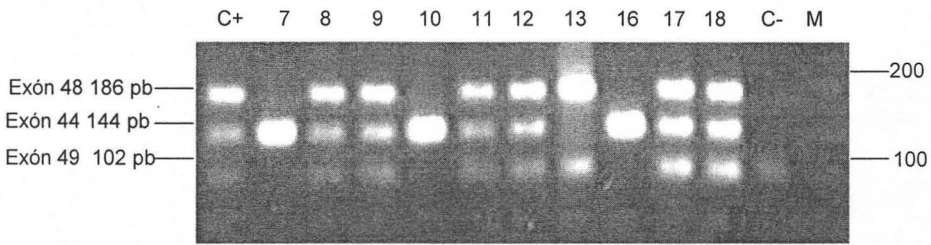
\*Los números en los carriles designan a los diferentes exónes

**FIGURA 4.** Gel horizontal de agarosa al 2% que muestra el correcto funcionamiento de los 17 pares de oligonucleótidos utilizados para amplificar los exónes de los "puntos calientes" menor y mayor del gen *DMD*, por la técnica de PCR. Se amplificó el DNA genómico de un varón sano (sin deleciones en el gen *DMD*) que se utilizó en todas las reacciones como control positivo. En la reacción se incluyó un control negativo (reacción sin DNA) y para el corrimiento electroforético se utilizó un marcador de peso molecular (escala de 100pb).

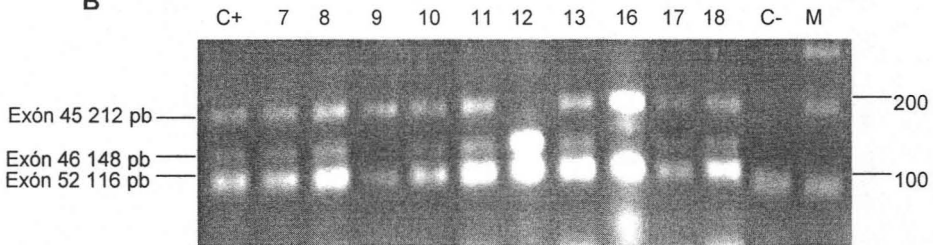
**A****B****C**

**FIGURA 5.** Gel horizontal de agarosa al 2% que muestra la amplificación por PCR multiplex de DNA genómico de 10 pacientes de algunos exónes del "punto caliente" menor (Panel A. exónes 4/13/12/8; panel B. Exón 17 y panel C. exón 19) y de los exónes 70 y 74 ( panel B. Exón 70 y panel C. exón 74) que son los que codifican para el extremo carboxilo de la proteína distrofina. En todos los casos se incluyó un control positivo (C+: varón sin mutaciones en el gen *DMD*), un control negativo (C-: reacción sin DNA) y marcador de peso molecular (M: escalera 100 pb)

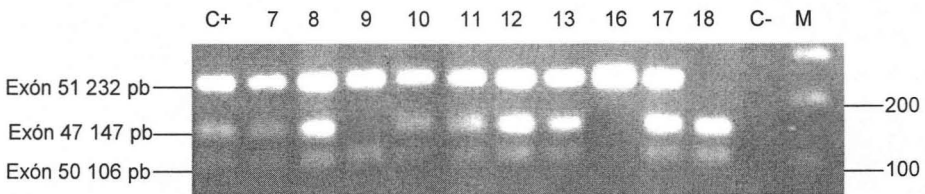
**A**



**B**



**C**



**FIGURA 6.** Gel horizontal de agarosa al 2% que muestra la amplificación por PCR multiplex de DNA genómico de 10 pacientes de los exónes del "punto caliente" mayor (panel A. exónes 49/44/48; panel B. exónes 52/46/45 y panel C. exónes 50/47/51). En todos los casos se incluyó un control positivo (C+: varón sin mutaciones en el gen *DMD*), un control negativo (C-: reacción sin DNA) y marcador de peso molecular (M: escalera 100 pb).

### **5.3. Delimitación de las deleciones situadas en el “punto caliente” mayor y correlación clínico-molecular**

De estos 7 pacientes con eliminaciones se pudo delimitar la extensión de éstas únicamente en 5 de ellos (pacientes 9, 10, 12, 15 y 18).

En la figura 7 se representa el “punto caliente” mayor del gen *DMD* y se esquematizan las deleciones identificadas en los 7 pacientes y los límites de las mismas.

La delimitación de las eliminaciones se utilizó para observar el efecto de éstas en el marco de lectura del gen empalmado los exónes que quedan adyacentes debido a la deleción y poder establecer una correlación clínico-molecular. De acuerdo a este análisis, únicamente el paciente 16 mostró una excepción a la “hipótesis del marco de lectura”, ya que la eliminación de los exónes 46 al 50 sugiere un marco de lectura fuera de fase, pero el paciente presenta un fenotipo Becker.

La tabla II resume el registro de las deleciones encontradas en los 20 pacientes analizados, así como la correlación que existe entre éstas y la gravedad de la enfermedad.

Paciente	exónes eliminados	Marco de lectura <sup>a</sup>	Diagnóstico <sup>b</sup>
1	-	-	DMB
2	-	-	DMD
3	-	-	DMD
4	-	-	DMD
5	-	-	DMD
6	-	-	DMD
7	45-52	Desconocido	DMD
8	-	-	DMD
9	46-47	FF	DMD
10	48-49	EF	DMB
11	-	-	DMD
12	45	FF	DMD
13	44	Desconocido	DMD
14	-	-	DMD
15	-	-	DMD
16	46-50	FF	DMB
17	-	-	DMD
18	51	EF	DMB
19	-	-	DMD
20	-	-	DMD

**TABLA II.** Registro de deleciones y correlación clínico-molecular en pacientes con DMD/DMB

<sup>a</sup>**FF:** marco de lectura fuera de fase.

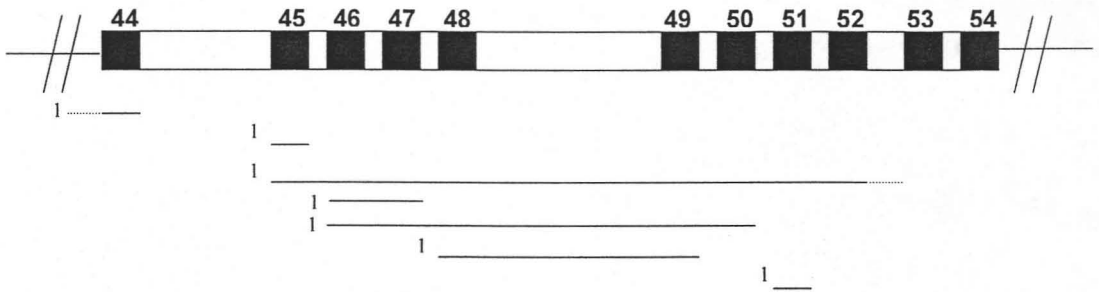
**EF:** marco de lectura en fase.

**Desconocido:** no se pudo determinar los límites de la deleción.

<sup>b</sup>**DMD.** Distrofia Muscular de Duchenne.

**DMB.** Distrofia Muscular de Becker.





**FIGURA 7.** Representación esquemática del “punto caliente” mayor del gen *DMD* y la distribución de las deleciones encontradas en los pacientes mexicanos con diagnóstico DMD/DMB analizados en este estudio. Los cuadros blancos representan los intrones y los negros los exones. Las líneas continuas debajo del gen representan la posición, extensión y los límites de las deleciones. Las líneas discontinuas representan las eliminaciones que no se pudieron delimitar. Los números a la izquierda indican el número de pacientes que presentan esos exones eliminados.

#### 5.4. Diagnóstico molecular de mujeres portadoras de la DMD/DMB.

Para la detección de portadoras se estudió una familia con antecedentes de DMD, en esta familia se sabía por medio de un estudio realizado con anterioridad (Coral-Vázquez, Tesis doctoral, 1995) que la madre era portadora obligada con una delección del exón 45 en uno de los alelos. Este alelo fue heredado por los dos hijos varones de la familia ya que ambos presentaban un fenotipo DMD y al realizar el estudio molecular por PCR multiplex se encontró una eliminación en el exón 45 además, existen 3 hijas con riesgo de haber heredado el alelo dañado con la mutación en el exón 45 del gen *DMD*.

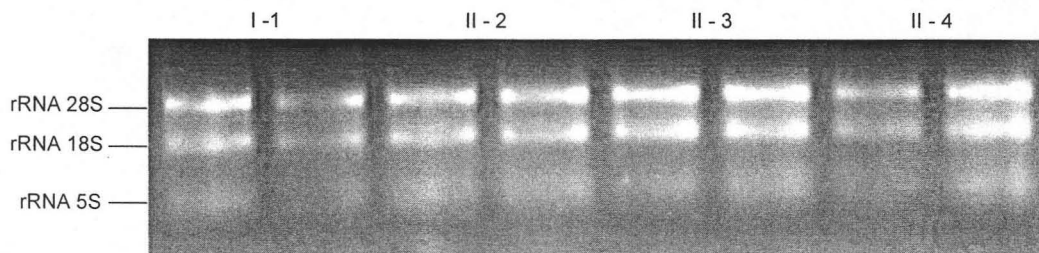
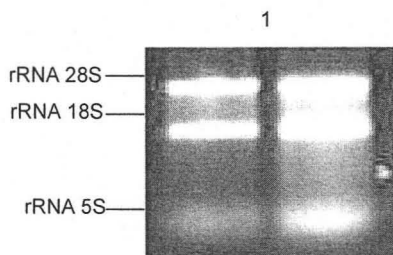
Para conocer el estado de portadora/no portadora de estas tres mujeres se implementó la metodología de RT-PCR amplificando RNAm de linfocitos de sangre periférica. Esta técnica permite obtener una hebra doble de DNA complementario (cDNA) sin los intrones presentes en el DNA genómico a partir de RNAm de tejido el cual funciona como molde, utilizando la enzima transcriptasa reversa y oligonucleótidos al azar. El RNA total se aisló, se cuantificó y se verificó su calidad, de la manera como se indica en materiales y métodos. En la Figura 8 se observa el corrimiento electroforético de los RNAs totales obtenidos a partir de linfocitos de la madre, las tres hijas y una mujer sana.

Una vez obtenido el cDNA de estas 5 mujeres, éste se amplificó por PCR utilizando el oligonucleótido S (sentido) del exón 44 y el oligonucleótido A (antisentido) del exón 46 utilizados en la PCR multiplex, ya que como se mencionó, estos fueron diseñados en los extremos 5' y 3' de los exónes.

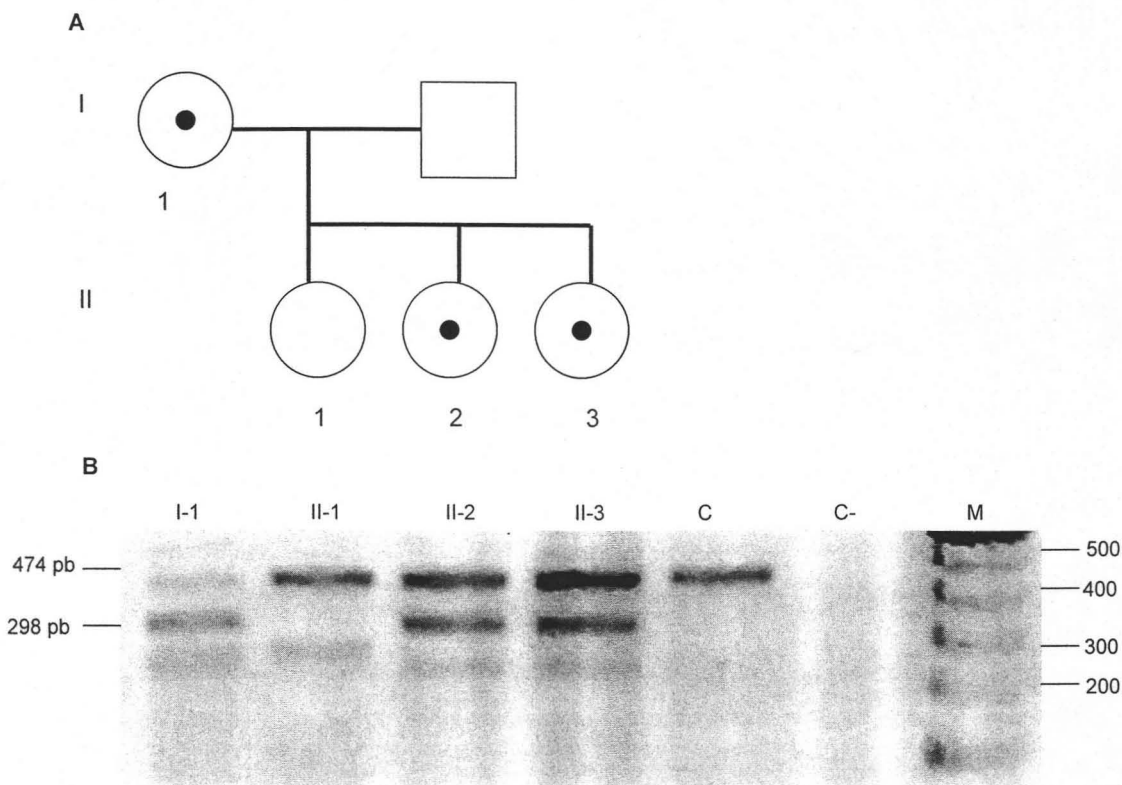
Al no tener presentes intrones en la molécula de DNA amplificada por esta técnica, al momento de amplificar por PCR utilizando los oligonucleótidos 44S y 46S, en el caso de la portadora obligada (I-1, carril 1; figura 9), se obtuvieron dos productos de reacción separados por más de 150 pb. La banda superior que se observa corresponde a la suma de los exónes 44(148 pb), 46 (150 pb), que son los que flaquean la delección, y al exón 45(176 pb) que empalmados producen un fragmento de 474 pb, este producto de amplificación obtenido proviene del RNAm integro sintetizado por el alelo normal del gen *DMD*, mientras que el producto de menor tamaño proviene del RNAm que transcribe el alelo que acarrea la eliminación que abarca al exón 45 y permite que se empalmen los exónes 44 y 46, excluyendo los pares de bases aportados por el exón 45, dando como resultado un fragmento de 298 pb. Esto se confirmó al momento de analizar al control sano (C, carril 5; figura 9), en éste se observó claramente solo la banda de 474 pb, lo que significa que al tener ambas copias del gen *DMD* normales estos se transcriben en un único RNAm que se traduce en la producción normal de la distrofina.

En la figura 9 se observa que las tres hijas presentan la banda de 474 pb al igual que la madre y el control sano, pero en dos de ellas (II-2 y II-3. Carril 3 y 4, respectivamente) se observó la banda adicional de 298 pb que aparece en la portadora obligada. Esto sugiere que las mujeres II-2 y II-3 son portadoras como su madre, lo que implica un riesgo del 50% para ambas de tener un hijo afectado con DMD y un 50% de probabilidad de tener una hija portadora; mientras que la mujer II-1(carril 2), que solo presenta la misma banda de 474 pb que se observa en el cDNA de la mujer sana, se considera su estado: como no portadora.

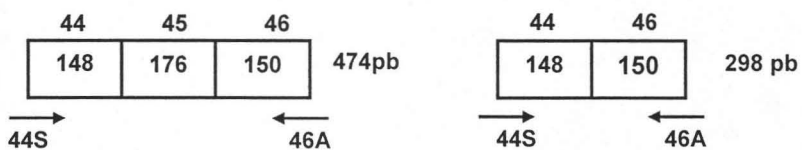
En la figura 10 se hace una representación de los 2 productos obtenidos por RT-PCR con los oligonucleótidos 44S (sentido) y 46A (antisentido), utilizados para detectar la delección en uno de los alelos del gen *DMD*, en la figura se indican el tamaño de cada exón individualmente y el tamaño de los productos finales.

**A****B**

**FIGURA 8.** A) Corrimiento electroforético en gel horizontal de agarosa al 1% para verificar la integridad del RNA total extraído de linfocitos de sangre periférica de una familia analizada con antecedentes DMD donde la madre es portadora obligada. El RNA total se extrajo por duplicado para asegurar la calidad de las muestras. I -1: portadora obligada; paciente II-1; carril 5 y 6: paciente II-2; carril 7 y 8: paciente II-3. B) Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1% para verificar la integridad del RNA total extraído de linfocitos de sangre periférica de una mujer sin mutaciones en el gen *DMD* utilizada como control sano.



**FIGURA 9.** A) árbol genealógico de la familia con antecedentes de DMD. Los círculos marcados con los puntos negros indican a las portadoras y el círculo sin marcar indica a la no portadora. B) gel de agarosa al 2% que muestra los productos de amplificación obtenidos por RT-PCR de RNAm de la familia con antecedentes DMD, para detectar posibles portadoras. En el carril I-1 (portadora obligada) se observan dos productos: el primero es de 474 pb que corresponde a los exónes 44, 45 y 46 y representa la copia normal del gen *DMD*; el segundo de 298 pb corresponde a la suma de los exónes 44 y 46 y representa la copia del gen *DMD* que acarrea la eliminación del exón 45. Se observa que las pacientes II-2 y II-3 heredaron el alelo mutado ya que se observa en ambas el producto de 298 pb. La paciente II-1 muestra solo la banda de 474 pb al igual que el control sano lo que indica que ambas copias del gen *DMD* se transcriben en un solo RNAm. Se incluyó un control negativo (reacción sin formación de cDNA) y marcador de peso molecular (escala de 100pb).



**FIGURA 10.** Representación de los productos obtenidos por RT-PCR. Los rectángulos representan los exónes amplificados indicando el número de exón en la parte superior, el número dentro de los rectángulos indica el tamaño de cada exón. Los números a la derecha indican el tamaño del producto final amplificado. Las flechas indican el sentido de los oligonucleótidos utilizados.

## 6. Discusión

La distrofia muscular de Duchenne/Becker es una enfermedad que se hereda de forma recesiva ligada al cromosoma X y se caracteriza por debilidad muscular progresiva y degeneración muscular. Esta enfermedad se produce por mutaciones en el gen *DMD*. El gen de distrofina es el más grande conocido hasta ahora, cuenta con 79 exónes distribuidos sobre aprox.  $2.5 \times 10^6$  pb. Dentro de las mutaciones a las que está sujeto este gen, las deleciones son el tipo de mutaciones más frecuentes (65%). Estas deleciones se localizan principalmente en la región proximal y distal del gen, denominadas "punto caliente" menor y mayor, respectivamente.

En este estudio se analizaron 20 pacientes por la técnica de PCR multiplex y se encontró que 7 de ellos (35%) tenían deleciones en el gen *DMD*. Estas eliminaciones no fueron al azar, sino que se agruparon dentro de la región que se denomina "punto caliente" mayor, no se encontró ningún paciente con deleciones dentro del "punto caliente" menor ni en los exónes 70 y 74, que son los que codifican para el extremo carboxilo de la proteína. El porcentaje de estas deleciones y su distribución están por debajo de las cifras reportadas con anterioridad en la población mexicana y ligeramente menor a lo que se puede encontrar en estudios realizados en otros países. Este porcentaje se debe al número de pacientes analizado. Si el tamaño de la muestra fuera más grande, los porcentajes aumentarían y es probable que se encuentre algún paciente con deleciones dentro del "punto caliente" menor. La distribución de las deleciones halladas en nuestra población confirma que no hay diferencias étnicas en la distribución de las deleciones en el gen *DMD* (Banerjee et al., 1997; Coral-Vázquez et al., 1997; Öngent et al., 2000; Aziza et al., 2002; Kumari et al., 2003).

El 100% de las deleciones encontradas en estos pacientes fueron dentro del llamado "punto caliente" mayor. Esta distribución de deleciones pudiera ser a que se analizaron más exónes en este punto en comparación de los 6 exónes analizados en el "punto caliente" menor. Otra explicación de esta distribución particular de deleciones podría ser que existan secuencias de DNA que se mantengan y se vayan acumulando dentro de una población en particular y finalmente, den origen a eliminaciones y mutaciones (Cooper y Krawezak, 1991; Danieli et al., 1993; Krawezak y cooper, 1993; Florentin et al., 1995).

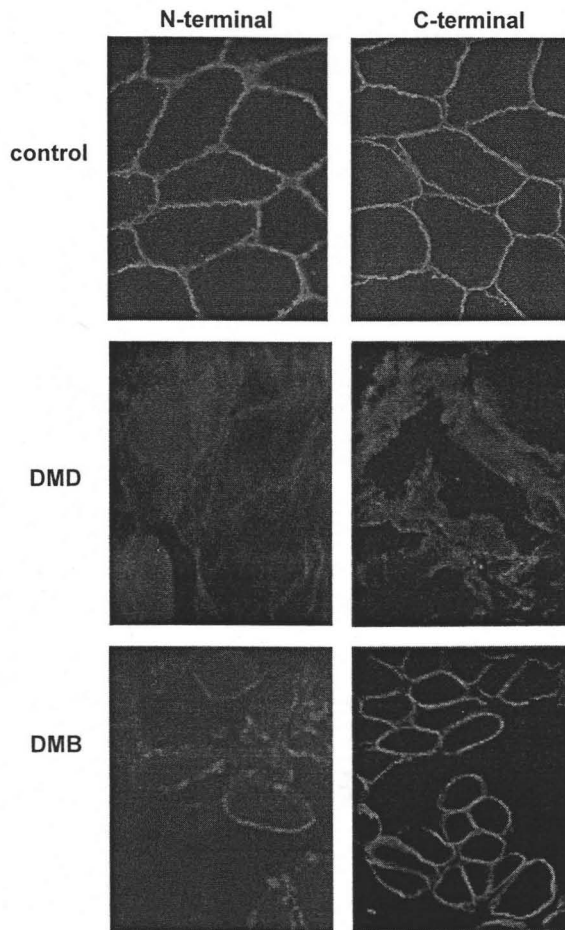
Los pacientes analizados en este trabajo forman parte de un protocolo de investigación y se les realizaron otro tipo de análisis para confirmar el diagnóstico DMD/DMB. A 16 de los

20 pacientes se les tomó una biopsia muscular para realizar un análisis de la distrofina por técnicas de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos comerciales (Novocastra Laboratories Ltd) marcados con fluorescencia (Hernández V. Angélica y Gómez D. Benjamín. Tesis de maestría en proceso). Estos anticuerpos son el NCL-DYS3 y el NCL-DYS2. El primero va dirigido a la región amino-terminal de la proteína distrofina, entre los aminoácidos 321 y 494 y el segundo reacciona fuertemente con el dominio carboxi-terminal de la proteína, específicamente entre los aminoácidos 3669 y 3685. La figura 11 sirve de ejemplo para mostrar como se observan en el microscopio de fluorescencia las fibras musculares de un varón sano utilizado como control, un paciente con DMD y un paciente con DMB. Estos estudios sirvieron para apoyar los resultados obtenidos por PCR multiplex.

De los 13 pacientes donde no fue posible detectar eliminaciones 10 de ellos contaban con biopsia muscular. El paciente 1 fue diagnosticado con DMB y se confirmó el diagnóstico al encontrar disminuida a la distrofina en el estudio inmunohistoquímico, pero al realizar la amplificación de los exones de los "puntos calientes" no se pudo localizar la delección. El primer estudio indica que a pesar de que la delección no se identificó si existe una mutación en el gen, y sugiere que ésta no afecta de manera grave la estructura conformacional de la proteína permitiendo que se exprese en las células musculares.

El análisis de distrofina con los anticuerpos NCL-DYS3 y NCL-DYS2 mostró que los pacientes 2, 3, 4, 6, 8, 11, 15, 17 y 20 tienen ausencia total de distrofina, todos ellos fueron diagnosticados con DMD, muestran debilidad generalizada en menor o mayor grado, aún caminan y ninguno de ellos rebasa todavía los 12 años de edad. Es posible que en estos pacientes y en los tres a los que no se les realizó biopsia muscular, la mutación se encuentre en otras regiones no analizadas del gen que conduzcan a una terminación prematura de la traducción, dando origen a una proteína trunca no funcional o bien que presenten mutaciones puntuales que en lugar de un cambio de un aminoácido por otro, den origen a un codón de paro, ya que se sabe que este tipo de mutaciones, junto con pequeñas eliminaciones no detectables por PCR multiplex, son las responsables de un tercio de los casos de DMD/DMB (Chamberlain et al., 1988; Beggs et al., 1990; Bulman et al., 1991; Lenk et al., 1993; Roberts et al., 1992). Actualmente se han desarrollado diferentes metodologías para detectar este tipo de mutaciones, como son: el análisis de cadena sencilla (SSCP), análisis heteroduplex (HA), análisis químico disparejo





**FIGURA 11.** Análisis de Distrofina por técnica de inmunohistoquímica utilizando los anticuerpos NCL-DYS3 y NCL-DYS2 en biopsias de músculo de un varón utilizado como control, un paciente con diagnóstico DMD y un paciente con diagnóstico DMB (Hernández V. Angélica y Gómez D. Benjamín. Tesis de maestría en proceso).

(CMC), HPLC, secuenciación del DNA, etc. Pero el porcentaje de éxito de estas técnicas es limitado, debido a que estas pequeñas eliminaciones y mutaciones puntuales se distribuyen a lo largo de todo el gen y éste es muy grande. (Prior et al., 1996; Mendell et al., 2001; Roberts et al., 1992).

A los pacientes 9, 10, 12, 16 y 18 se les pudo delimitar el tamaño de las deleciones para establecer la correlación que existe entre éstas y la severidad de la enfermedad.

La "hipótesis del marco de lectura" propuesta por Monaco (1988) y Koenig (1989), menciona que la severidad de la enfermedad no está dada por el tamaño de la deleción, sino por el efecto de ésta en el marco de lectura del gen. En la DMD, las deleciones provocan que el marco de lectura se rompa (fuera de fase; FF) y evitan que se produzca una proteína estable, mientras que en la DMB, las deleciones dejan el marco de lectura abierto (en fase; EF), provocando solamente cambios de un aminoácido por otro y dando como resultado una proteína estable y parcialmente funcional. Aproximadamente el 92% de las deleciones confirman esta hipótesis (Baumbach et al., 1989; Blake et al., 2002).

Los resultados obtenidos, con excepción del paciente 16, concuerdan con los estudios realizados en otras poblaciones (Kumari et al., 2003; Baumbach et al., 1991) y están en concordancia a lo encontrado por el análisis de inmunofluorescencia en los pacientes donde fue posible obtener la biopsia muscular.

La Figura 12 explica la "hipótesis del marco de lectura" y su excepción. El paciente 10 presentó eliminación de los exónes 48 y 49. Al llevarse a cabo el procesamiento para eliminar a los intrónes y dar origen al pre-RNA<sub>m</sub>, y posteriormente al RNA<sub>m</sub> maduro, los exónes adyacentes a la deleción se empalman y al momento de que se lleva a cabo la traducción de la proteína distrofina el marco de lectura se mantiene en fase y solamente se pierden los 96 aminoácidos codificados por estos dos exónes, que forman parte del repetido 19 del dominio central, dando origen a una proteína estable y parcialmente funcional tal y como se observa en el análisis inmunohistoquímico donde existe señal para ambos extremos, carboxilo y amino, de la distrofina. En cambio la eliminación de los exónes 46 y 47 que presentó el paciente 9 rompe el marco de lectura introduciendo un codón de paro (TAA) cuando se lleva a cabo la traducción, expresándose en una proteína trunca e inestable que deja de producirse con el paso del tiempo provocando la degeneración y necrosis de las células musculares, que es el evento principal de la DMD. Este paciente presentó un fenotipo Duchenne y fue confirmado por ensayos realizados

con los anticuerpos fluorescentes NCL-DYS2 y NCL-DYS3 en donde la señal de la distrofina fue negativa para ambos.

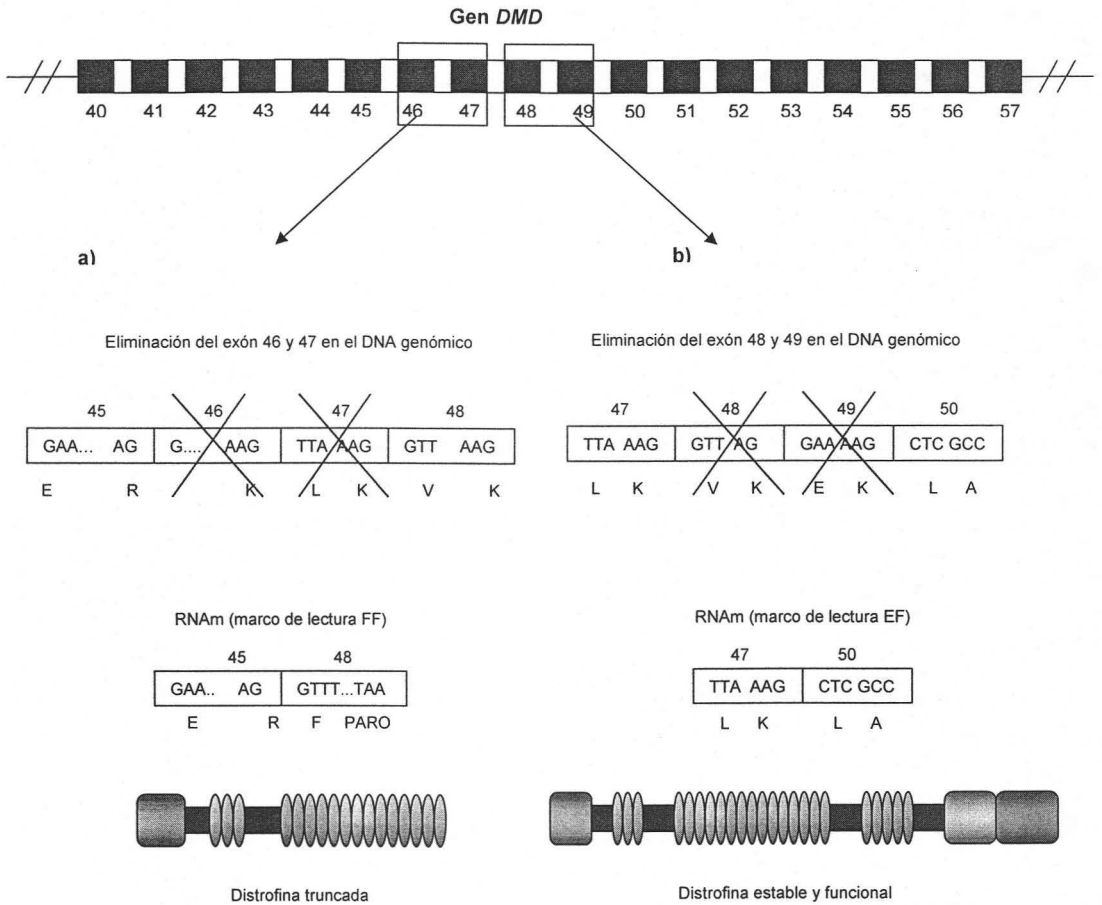
Como ya se indicó, el paciente 16 no cumplió con la hipótesis del marco de lectura; en este paciente se encontró una eliminación que va desde el exón 46 hasta el exón 50, estas eliminaciones rompen el marco de lectura interrumpiendo la traducción de la distrofina tempranamente. Sin embargo, el curso de la enfermedad de éste paciente es más parecido a DMB que a DMD. Las primeras manifestaciones de la enfermedad iniciaron a la edad de 6 años, actualmente el paciente cuenta con 10 años de edad, aún camina y tiene una debilidad ligera generalizada. Estudios realizados con anterioridad reportan que procesamientos alternativos del gen *DMD* pueden producir una secuencia codificante impredecible (Kumari et al., 2003; Chelly 1990; Canizales S., Tesis de maestría, UNAM. 1998). En el paciente 16, un procesamiento alternativo del exón 45 o del exón 51 podría explicar la excepción a la "hipótesis del marco de lectura", ya que cualquiera de los dos que se elimine por un procesamiento alternativo permite que se mantenga en fase el marco de lectura. Este procesamiento alternativo sugiere que cualquiera de los dos exones que se elimine es suficiente para reducir la gravedad de la enfermedad y que la región que codifican los exones 45 al 51, que es la de los repetidos 18 al 20 del dominio central de la distrofina, no es esencial para su funcionamiento. El análisis de la biopsia muscular apoya este fenómeno: el análisis muestra presencia de la distrofina en el extremo amino con el anticuerpo NCL-DYS3 y ausencia en el extremo carboxilo con el anticuerpo NCL-DYS2.

Para tener la certeza de que realmente se está presentando este fenómeno, es necesario recurrir a un análisis del RNAm de linfocitos de sangre periférica con los oligonucleótidos adecuados para amplificar por la técnica de RT-PCR fragmentos de RNAm que contengan a los exones 45 y 51 y de esta manera poder conocer con seguridad cual de los dos exones está siendo eliminado por un procesamiento alternativo.

Finalmente, para los dos pacientes que no se les pudo delimitar el tamaño de las deleciones el análisis de biopsia muscular fue de valiosa ayuda para determinar si las mutaciones intragénicas en el gen *DMD* alteran o no el marco de lectura.

El paciente 7 presentó una eliminación de los exones 45 al 52, una deleción de 7 exones. Probablemente esta deleción se extiende a más exones hacia el extremo 3', pero como no se cuenta con los pares de oligonucleótidos subsiguientes al exón 52 fue imposible determinar el límite de la eliminación. En el caso del paciente 13, solamente se detectó la

delección de un único exón, el 44, mientras que los demás exones del "punto caliente" mayor fueron positivos para la amplificación por PCR multiplex hacia el extremo 3', pero no se pudo determinar si la delección fue solamente en un exón o si ésta abarcó más exones debido a que no se cuenta con pares de oligonucleótidos que amplifiquen los exones ubicados a la izquierda de el exón 44. Sin embargo, el fenotipo Duchenne que presentan ambos pacientes y la ausencia total de distrofina por análisis inmunohistoquímico sugiere que las eliminaciones dentro del gen *DMD* están alterando el marco de lectura de éste y están interrumpiendo la expresión de distrofina en las células musculares.



**FIGURA 12.** a) Esquema que muestra como la eliminación de los exónes 46 y 47 rompe el marco de lectura (fuera de fase) y ocasiona un codón de paro que se traduce en una proteína truncada. b) en este esquema se muestra como la eliminación de los exónes 48 y 49 no afectan el marco de lectura del gen manteniéndolo en fase y en la traducción solo se pierden los 96 a.a. que forman parte del repetido 19 del dominio central.

La DMD/DMB es el padecimiento muscular de origen genético más común en varones. Debido a la falta de un tratamiento para contrarrestar los efectos progresivos de esta enfermedad y a la falta de una rehabilitación eficiente, el asesoramiento genético y el diagnóstico prenatal son opciones que los genetistas pueden ofrecer actualmente, basando su decisión en la determinación del estado de portadora. Prácticamente, si la madre de un hijo afectado (caso índice) tiene otro hijo con DMD/DMB, se le considera como portadora obligada.

En México, la mayoría de los centros nacionales de salud utilizan el análisis de linaje, mediciones en suero de la enzima muscular creatinina fosfocinasa (CPK) y análisis Bayesiano para predecir estadísticamente el estado de portadora/no portadora (Alcántara et al., 2001).

El propósito de este estudio fue desarrollar una técnica simple y confiable, basada en el RNA, para la detección directa de portadoras de la DMD/DMB que pueda utilizarse fácilmente como alternativa de diagnóstico en aquellas mujeres sospechosas de acarrear una mutación en el gen *DMD*.

En la familia estudiada, la madre sirvió como testigo al ser portadora obligada; su estado se definió anteriormente por medio de un análisis de ligamiento y la presencia de la delección del exón 45 fue corroborada en este trabajo, permitiendo validar el estudio por RT-PCR realizado a las 3 mujeres emparentadas con ella.

Por los hallazgos encontrados en la madre y en el control sano se pudo establecer el estado de portadora/no portadora para las tres mujeres de la familia analizada.

Dentro de las ventajas que presenta esta técnica, se pueden mencionar las siguientes: a) los pares de oligonucleótidos utilizados se pueden combinar de manera distinta para detectar otras eliminaciones sin necesidad de sintetizar nuevos oligonucleótidos para realizar la PCR, porque se utilizan los mismos oligonucleótidos empleados en la detección de delecciones en varones, ya que estos oligonucleótidos fueron diseñados en los extremos 5' y 3' de cada uno de los exones, excluyendo cualquier fragmento de intrón, b) ofrece la posibilidad de utilizarse como un control de calidad interno en el diagnóstico: después de la identificación de la delección, se puede realizar un segundo ensayo utilizando una diferente combinación de oligonucleótidos para amplificar un producto de mayor tamaño que abarque los exones amplificados en el primer ensayo, c) la extracción de RNA total se puede realizar de manera sencilla en linfocitos de sangre periférica, evitando el empleo de métodos más invasivos y traumáticos, como lo es la biopsia

muscular y d) no se necesita contar con equipo especial, ya que se utilizan los mismos aparatos que se emplean en una reacción de PCR convencional. Sin embargo, como la mayoría de las técnicas actuales, ésta tiene algunas desventajas, siendo la principal que no se puede utilizar como una técnica de rutina, porque su uso está limitado a los casos donde se ha detectado y delimitado la delección en los miembros varones de la familia, porque de lo contrario sería imposible establecer que exónes son los que se encuentran ausentes, debido a que se han reportado una gran variedad de eliminaciones y duplicaciones que difieren en su localización y extensión.

Dentro de las perspectivas de este trabajo está el aplicar el uso de la técnica de RT-PCR a las familias de los pacientes estudiados donde se detectaron delecciones, para poder determinar si la madre es portadora/no portadora o si es una delección *de novo* y poder brindar un asesoramiento genético adecuado, además de poder extender este estudio a mujeres emparentadas con los pacientes y poder determinar su estado de portadoras/no portadoras.

Otra de las perspectivas es aumentar el número de pacientes analizados por amplificación simultánea multiplex para poder determinar con certeza si en población mexicana abierta son más frecuentes las delecciones dentro del llamado "punto caliente" mayor o encontrar pacientes con eliminaciones en el "punto caliente" menor que cambien los porcentajes encontrados en este estudio. El aumentar el número de pacientes también servirá para encontrar más pacientes con excepciones a la "hipótesis del marco de lectura" y poder reforzar la misma.

En los pacientes donde no se detectaron mutaciones por PCR multiplex pero los análisis por inmunohistoquímica confirmaron que no existía distrofina o estaba disminuida, refuerzan la idea de nuestro grupo de trabajo de que es necesario desarrollar nuevas y diferentes técnicas que, juntas, permitan un análisis integral de la distrofina, para que de esta manera sea posible brindar un diagnóstico certero a los pacientes y asesorar de manera adecuada a los familiares.

## 7. Conclusiones

Las deleciones encontradas en los pacientes analizados se localizan dentro del "punto caliente" mayor.

La gravedad de la enfermedad no está dada por la extensión de las deleciones, sino por el efecto de éstas en el marco de lectura del gen *DMD*.

El estudio de los pacientes con DMD/DMB debe ser integral, para poder brindarles un diagnóstico correcto que lleve a un asesoramiento médico adecuado.

La técnica de RT-PCR representa una alternativa para la identificación de portadoras emparentadas con pacientes DMD/DMB donde es posible detectar la deleción.



**8. Anexo**  
**CUESTIONARIO GENERAL DE MIOPATIAS**

INSTITUCIÓN \_\_\_\_\_

FECHA \_\_\_\_\_

REGISTRO \_\_\_\_\_

Nombre \_\_\_\_\_

Edad \_\_\_\_\_

Fecha de nacimiento \_\_\_\_\_

Lugar de origen \_\_\_\_\_

Lugar de residencia \_\_\_\_\_

Dirección \_\_\_\_\_

Teléfono \_\_\_\_\_

Origen de los padres \_\_\_\_\_

Consanguinidad	(no)	(si)		
Historia familiar	(no)	(si)	especificar	_____
Antecedentes perinatales	(no)	(si)	especificar	_____
Hipotonía al nacer	(no)	(si)	evolución	_____
Desarrollo psicomotor	(normal)	(anormal)	Sostén cefálico	_____
			Edad de caminar	_____
			habla	_____
Desempeño escolar	(bueno)	(regular)	(malo)	evolución _____

Edad de inicio \_\_\_\_\_

Primer síntoma \_\_\_\_\_

Miembros inferiores (edad)	Dificultad para subir escaleras	_____
	Levantarse de una silla	_____
	Levantarse del decúbito dorsal	_____
	Levantarse de cuclillas (Gowers)	_____
	Pararse de puntas	_____
	Caídas faciales	_____
	Limitación del perímetro de marcha	_____
Miembros superiores (edad)	Dificultad para levantarlos	_____

			Cargar pesos	_____
			Doblarlos (flexión)	_____
			Extenderlos (extensión)	_____
			Cerrar o abrir manos	_____
			Abrir frascos o botellas	_____
Debilidad de cuello	(no)	(si)	inicio	_____
Visión doble (diplopía)	(no)	(si)	inicio	_____
Alteración de movimientos faciales	(no)	(si)	inicio	_____
Dificultad para deglutir (disfagia)	(no)	(si)	inicio	_____
Dificultad para hablar (disartria)	(no)	(si)	inicio	_____
Falta de aire (disnea)	(no)	(si)	inicio	_____
Pérdida de masa muscular (atrofia)	(no)	(si)	inicio y localización	_____
Dolor muscular (mialgias)	(no)	(si)	inicio y localización	_____
Mioglobulinuria (orina roja asociada o no a mialgias)	(no)	(si)	inicio	_____
Calambres	(no)	(si)	inicio y localización	_____
Problema visual	(no)	(si)	inicio	_____
Problema auditivo	(no)	(si)	inicio	_____
Miotonia	(no)	(si)	inicio/especificar	_____

#### EXPLORACIÓN

Debilidad (distribución y grado)

Reflejos	(normal)	(anormal)	especificar	_____
Respuesta plantar	(normal)	(anormal)	especificar	_____
Sensibilidad	(normal)	(anormal)	especificar	_____
Movimientos oculares	(normal)	(anormales)	especificar	_____
Ptosis	(no)	(unilateral)	(bilateral)	_____
Afección facial	(no)	(si)		_____
Alteraciones ortopédicas	(no)	(si)	especificar	_____
Otros hallazgos				_____

EMG	(normal)	(miopática)	(neuropática)
VCN	(normal)	(anormal)	
CPK	(normal)	(anormal)	

Biopsia muscular (normal) (anormal)

Fecha

Músculo \_\_\_\_\_

Institución

No. de biopsia

Tratamiento (no) (si) especificar \_\_\_\_\_

Rehabilitación (no) (si)

Primer servicio que atendió al paciente \_\_\_\_\_

Árbol genealógico:

## 9. Referencias

- AHN AH, AND KUNKEL LM (1993). The structural and functional diversity of dystrophin. *Nature Genet* 3:283-290.
- ALCÁNTARA MA, GARCÍA-CAVAZOS R, HERNÁNDEZ-U E, GONZÁLEZ-DEL ANGEL A, CARNEVALE A AND OROZCO L (2001). Carrier detection and prenatal molecular diagnosis in a Duchenne muscular dystrophy family without any affected relative available. *Anna Genet* 44:149-153.
- APPEL S AND ROSES A (1983). The muscular dystrophies. In *stanbury E. The metabolic basis of inherited disease*. 5 ed. Mc graw-Hill.
- ARKAR G AND SOMMER SS (1989). Access to a messenger RNA sequence or its protein product is not limited by tissue or species specificity. *Science* 244: 331-334.
- AZIZA S, ELKERCH F AND SEFIANI A (2002). Analysis of dystrophin gene deletions by multiplex PCR in moroccan patients. *Journal of medicine and biotech* 2(3):158-160.
- BANERJEE M AND VERMA I (1997). Are there ethnic differences in deletions in the dystrophin gene? *Am J Med Genet*. 68 (2): 152-157.
- BARKHAUS P AND GILCHIRST J (1989). Duchenne muscular dystrophy manifesting carriers. *Arch Neurol* 46:673-675.
- BARNEA E, ZUK D, SIMANTOV R, NUDEL U, AND YAFEE D (1990). Specificity of the expression of the muscle and brain dystrophin gene promoters in muscle and brain cells. *Neuron* 5:881-888.
- BAUMBACH L, CHAMBERLAIN J AND WARD P (1989). Molecular and clinical correlations of deletions leading to Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Neurology* 39:465-474.
- BEGGS AH, KOENING M, BOYCE FM AND KUNKEL LM (1990). Detection of 98% of DMD/DMB deletions by PCR. *Hum Genet*. 86:45-48.
- BERTORINI TE, CORNELIO F, BHATTACHARYA SK, PALMIERI GM, DONES I, DWORZAK F, AND BRAMBATI B (1984). Calcium and magnesium content fetuses at risk and pre-necrotic Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 34:1436-1440.
- BLAKE DJ, LOVE DR, TINSLEY J, MORRIS GE, TURLEY H, GATTER K, DICKSON G, EDWARDS YH AND DAVIES KE (1992). Characterization of a 4.8 Kb transcript from the duchene muscular dystrophy locus expressed in Schwannoma cells. *Human Mol genet* 1:103-109.
- BLAKE DJ, TINSLEY JM, DAVIES KE, KNIGHT AE, WINDER SJ AND KENDRICK-JONES J (1995). Coiled-coil regions in the carboxi-terminal domains of dystrophin and related proteins: potentials for protein-protein interctions. *Trends biochem Sci* 20:133-135.

- BLAKE DJ AND KROGER S (2000). The neurobiology of Duchenne muscular dystrophy : learning lessons from muscle? *Trends Neurosci* 23:92-99.
- BLAKE DJ, WEIRA, NEWAY SE AND DAVIES KE (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev* 82:291-329.
- BLAKE DJ, NAWROTZKI R, PETERS MF, FROEHNER SC AND DAVIES KE (1996). Isoform diversity of dystrobrevin, the murine 87-kDa postsynaptic protein. *J Biol Chem* 271:7802-7810.
- BORK P AND SUDOL M (1994). The WW domain: a signalling site in dystrophin? *Trends biochem Sci* 19:31-533.
- BOYCE FM, BEGGS AH, FENNERC AND KUNKEL LM (1991). Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1276-1280.
- BULMAN DE, MURPHY EG, ZUBRZYCKA-GAARN EE, WORTON RG AND 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.
- BUSHBY KM (1999). The limb-girdle muscular dystrophies-multiple genes, multiple mechanisms. *Human Mol genet* 8:1875-1882.
- BYERS TJ, LIDOV HG AND KUNKEL LM (1993). An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nat Genet* 4:77-81.
- CALVANO S, MEMEO E, PIEMONTESE MR, MELCHIONDA S, BISCEGLIA L AND GASPARINI P (1997). Detection of dystrophin deletion carriers using FISH analysis. *Clin Genet* 52:17-22.
- CAMPBELL KP (1995). Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 80: 675-679.
- CANIZALES SAMUEL (1998). Estudio molecular del gen *DMD* y su transcrito en pacientes con distrofia muscular de Duchenne/Becker. Tesis de maestría, UNAM. Méx.
- CLEMENS PR, FENWICK RG, CHAMBERLAIN JS, GIBBS RA, DE ANDRADE M, CHAKRABORTY R AND CASKEY CT (1991). Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy families, using dinucleotide repeat polymorphisms. *Am J Hum genet* 49:951-960.
- COHN RD AND CAMPBELL KP (2000). Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 23:1456-1471.
- CORAL-VAZQUEZ RM, ARENAS D, CSNEROS B, PEÑALOZA L, SALAMANCA F, KOFMAN S, MERCADO R AND MONTAÑEZ C (1997). Pattern of deletions of the dystrophin gene in mexican Duchenne/Becker muscular dystrophy patients: the use of new designed primers for the analysis of the major deletion "hot spots" region. *Am J Med Genet* 70:240-246.

CORAL-VAZQUEZ RM (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, Méx.

CROSBIE RH, HEIGHWAY J, VENZKE DP, LEE JC AND CAMPBELL KP (1997). Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem* 272:31221-31224.

CROSS RA, STEWARD M AND KENDRICK-JONES J (1990). Structural predictions for the central domain of dystrophin. *FEBS Lett.* 262:87-92.

CHAMBERLAIN JS, GIBBS RA, NGUYEN PN AND CASKEY CT (1988). Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic acids res.* 16:11141-11156.

CHAMBERLAIN JS, GIBBS RA, RAINER JE AND CASKEY CT (1989) Multiple PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. In PCR protocols, a guide to methods and applications. *Academic Press* 272-281.

CHAMBERLAIN JS (1992). X-linked dystrophies: from gene localization to gene therapy. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 5:610-614.

CHELY J, CONCORDET JP, KAPLAN JC, KAHN A AND BERWALD-NETTER Y (1986). Illegitimate transcription: Transcription of any gene in any cell type. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2617-2691.

CHELY J, HAMARD G, KOULAKOFF A, KAPLAN JC, KAHN A AND BERWALD-NETTER Y (1990). Dystrophin gene transcribed from different promoters in neural and glial cells. *Nature* 344: 64-65.

CHELY J, KAPLAN JC, MARIE P, GAUTRON S AND KAHN A (1988). Transcription of the human dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues. *Nature* 333:858-860.

CHELLY J, GILGENKRANTZ H AND LAMBERT H (63). Effect of the dystrophin gene deletions on mRNA levels and processing in Duchenne and Becker Muscular dystrophy. *Cell* 63:1239-48.

CHELLY J, GILGENKRANTZ H, HUGNOT JP, HAMARD G, LAMBERT M, RECAN D, AKLI S, COMETTO M, KAHN A AND KAPLAN JC (1991). Illegitimate transcription: application to the analysis of truncated transcripts of the dystrophin gene in non-muscle cultured cells from Duchenne and Becker patients. *J. Clin. Invest.* 88:1161-1166.

COFFEY AJ, ROBERTS RG, GREEN DE, COLE CG, BUTLER R, ANAND R, GIANELLI F AND BENTLEY DR (1992). Construction of a 2.6-Mb contig in yeast artificial chromosomes spanning the human dystrophin gene using a STD-based approach. *Genomics* 12:474-484.

D'SOUZA VN, NGUYEN TM, MORRIS GE, KARGES W, PILLERS DA AND RAY PN (1995). A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Human Mol genet* 4:837-842.

DANIELI GA, MIONI F, MULLER CR, VITIELLO R, MOSTACCIUOLO ML AND GRIMM T (1993). Pattern of deletions of the dystrophin gene in different European populations. *Hum Genet* 91:342-3436.

DEN DUNNEN JT, BAKKER E, KLEIN-BRETELER EG, PEARSON PL AND NAN OMMEN GJB.(1987) Direct detection of more than 50% Duchenne muscular dystrophy mutations by fields inversion gels. *Nature* 329:640-642.

DEN DUNNEN JT, GROOTSCHOLTEN PM, BAKKER E AND BLONDEN LAJ 1(1989). Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 asses reveals 115 deletions and duplications. *Am J Med Genet* 45:835-847.

DURBEEJ M, JUNG D, HJALT T, CAMPBELL KP AND EKBLUM P (1997). Transient expression of Dp 140, a product of Duchenne muscular dystrophy locus, during kidney tubulogenesis. *Dev Biol* 181:156-157.

EMANUEL BS, ZACKAI EH AND 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.

EMERY AEH (1993).Duchenne muscular dystrophy. *Oxford monographs on medical genetics* (2<sup>nd</sup> ed.).Oxford, UK: Oxford University Press, vol.xv, p.392.

EMERY AEH (1977). Muscle histology and creatine kinase levels in the fetus in Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 266:472-473.

EMERY AEH (2002). The muscular dystrophies. *The lancet* 359:687-695.

ERVASTI JM AND CAMPBELL KP (1993). A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker laminin and actin. *J Cell Biol* 22:809-823.

ERVASTI JM, OHLENDIECK K, KAHL SD, GAVER MG AND CAMPBELL KP (1990). Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* 345:315-319.

ESTRADA MENA JAVIER (1998). Diagnóstico molecular de portadoras de la Distrofia Muscular de Duchenne mediante la amplificación por PCR de secuencias intragénicas STR. Tesis de maestría. UNAM, Méx.

FLORENTIN L, MAVROU A, KEKOU K AND METAXOTOU C (1995). Deletions patterns of Duchenne and Becker muscular dystrophies in Greece. *J Med Genet* 32:48-51.

FORREST SM, CROSS GS, FLINT T, SPEER A, ROBSON KJH AND DAVIES KE (1988). Further studies of gene deletions that cause Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Genomics* 2:109-114.

GRUEMER HD, MILLERWGB, CHINCHILLI VM, LESHNER RT, BLASCO PA AND HASSLER CR (1985).Prediction of Carrier status in Duchenne dystrophy by creatine kinase measurement. *Am J Clin Pathol* 84:655-658.

GORECKI DC, MONACO AP, DERRY JM, WALKER AP, BARNARDEA AND BARNARD PJ (1992). Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Human Mol genet* 1:505-510.

GUTMAN DH AND FISCHBECK HH (1989). Molecular biology of Duchenne and Becker muscular dystrophy: clinical applications. *Ann Neurol* 26:189-194.

HACK AA, GROH ME AND MCNALLI EM (2000). Sarcoglycans in muscular dystrophy. *Microscopy Research and Technique* 23:1456-1471.

HODGSONS, HART KA, ABBS S, HECKMATT J, RODILLO E, BROBOW C AND DUBOWITZ V (1989). A correlation of clinical and deletion data in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *J Med Genet* 26:682-693.

HOFFMAN EP, BROWN RH AND KUNKEL LM (1987a). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51:919-928.

HOFFMAN EP, MONACO AP, FENEER CC AND KUNKEL LM (1987b). Conservation of Duchenne muscular dystrophy gene in mice and humans. *Science* 238:347-359.

HOFFMAN EP, HUDECKY MS, ROSENBERG PA, POLLINA C AND KUNKEL LM (1988). Cell and fiber type distribution of dystrophin. *Neuron* 1:411-420.

HOLDER E, MAEDA M AND BIES RD (1996). Expression and regulation of the dystrophin Purkinje promoter in human skeletal muscle, heart and brain. *Hum Genet* 97:232-239.

HOWARD PL, DALLY GY, DITTA SD, AUSTIN RC, WORTON RG, KLAMUT HJ AND RAY PN (1999). Dystrophin isoforms Dp71 and Dp 427 have distinct roles in myogenic cells. *Muscle Nerve* 22:16-27.

HOWARD PL, DALLY GY, WONG MH, HO A, WELEBER RG, PILLERS DA AND RAY PN (1998). Localization of dystrophin isoform Dp71 to the inner limiting membrane of the retina suggest a unique functional contribution of Dp 71 in the retina. *Human Mol genet* 7:1385-1391.

HU X, BURGHESE AHM, RAY PN, THOMPSON MW, MUROYH EG AND WORTON RG (1988). Partial gene duplication in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *J med Genet* 25:369-376.

HUGNOT JP, GILGENTKRANTZ H, VINCENT N, CHAFEY P, MORRIS GE, MONACO AP, BERWALD-NETTER Y, KOULAKOFF A, KAPLAN JC, KAHN A AND CHELLY J (1992). Distal transcript of the dystrophin gene initiated from an alternative first exon and encoding a 75-kDa protein widely distributed in nonmuscle tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7506-7510.

IBRAGHIMOV-BESKROVNAYA O, ERVASTI JM, LEVEILLE CJ, SLAUGHTER CA, SERNET SW AND CAMPBELL KP (1992). Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 355:696-702.



KLAMUT , GANGOPADHYAY S, WORTON R AND RAY P (1990). Molecular and functional analysis of the muscle-specific promoter region of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Mol Cell Biol* 10:193-205.

KLAMUT HJ, ZUBRZYCKA-GAARN EE, BULMAN DE, MALHOTRA SB, BEDRUG SE, WORTON RG AND RAY PN (1989). Myogenic regulation of dystrophin gene expression. *Br Med Bull* 45:681-702.

KOENIG M AND KUNKEL LM (1999). Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J. Biol Chem* 265:4560-4566.

KOENIG M, HOFFMAN EP, BERTELSON CJ, MONACO AP, FEENER C AND KUNKEL LM (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50:509-517.

KOENIG M, MONACO AP AND KUNKEL LM (1988). The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 53:219-226.

KOENING M, BEGGS A AND MOYER M (1989). The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet* 45:498-506.

KRAWEZAK M AND COOPER DN (1993). Gene deletions causing human disease: mechanism of mutagenesis and the role of the local DNA sequence environment. *Hum Genet* 91:342-346.

KUMARI D, MITAL A, GUPTA M AND GOYLE S (2003). Deletion analysis of the dystrophin gene in Duchenne and Becker muscular dystrophy patients: Use in carrier diagnosis. *Neurology India* 51:223-226.

KUNKEL LM AND HOFFMAN EP (1989). Duchenne/Becker muscular dystrophy: A short overview of the gene, the protein, and current diagnostics. *Br Med Bull* 45:630-643.

LEDERFEIN D, LEVY Z, AUGIER N, MORNET D, MORRIS G, FUCHS O, YAFFE D AND NUDEL U (1992). A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscle tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5346-5350.

LENK U, HANKE R, THIELE H AND SPEER A (1993). Point mutations at the carboxy terminus of the human dystrophin gene: implications for and an association with mental retardation in DMD patients. *Human Mol Genet* 2:1877-1881.

LIDOV HG, SELIG S AND KUNKEL LM (1995). Dp 140: a novel 140-kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Human Mol Genet* 4:329-335.

LIECHTI-GALLATI S, KOENING M, KUNKEL LM, FREY D, BOLTSHAUSER E, SCHNEIDER V, BRAGA S AND MOSER H (1989). Molecular Deletion patterns in Duchenne and Becker type muscular dystrophy. *Hum Genet* 81:343-348.

LIM LE AND CAMPBELL KP (1998). The sarcoglycan complex in limb-girdle muscular dystrophy. *Curr Opin Neurol* 11:443-452.

LOTZ BP AND ENGEL AG (1987). Are hypercontracted muscle fibers artifacts and do they cause rupture of the plasma membrane? *Neurology* 37:1466-1475.

LOVE DR, FORREST SM, SMITH TJ, ENGLAND S, FLINT AND DAVIES KE (1989). Molecular analysis of Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Br Med Bull* 45:659-680.

MAKOVER A, ZUK D, BREAKSTONE J, YAFFE D AND NUDEL U (1991). Brain-type and muscle-type promoters of the dystrophin gene differ greatly in structure. *Neuromuscular disorders* 1:39-45.

MANIATIS T, FRITSCH EF AND SAMBROOK J (1989). A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

MEHLER MF (2000). Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. *Brain Res* 32:277-307.

MENDELL J, BUZIN C, FENG J, YAN J, SERRANO C, SANGANI D, WALL C AND PRIOR T (2001). Diagnosis of Duchenne muscular dystrophy by enhanced detection of small mutations. *Neurology* 57:645-650.

MONACO A, BERTELSON C AND LIECHTI-GALLATI S (1988). An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletion of the DMD locus. *Genomics* 2:90-95.

MONACO AP, BERTELSON CJ, COLLETTI-FENNER C AND KUNKEL LM (1987). Localization and cloning of Xp21 deletion breakpoints involved in muscular dystrophy. *Hum Genet* 75:221- 227.

MONACO AP, NEVE RL, COLLETTI-FENNER C, BERTELSON CJ, KURNIT DM AND KUNKEL LM (1986). Isolation of a candidate cDNAs for portions of Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* 323:646-650.

Multicenter study group (1992): Diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophies by polymerase Chain reaction: A multicenter study. *JAMA* 267: 2609-15.

NUDEL U, ZUC D, EINAT P, ZEELON E, LEVY Z AND YAFE D (1989). Duchenne muscular dystrophy gene product is not identical in muscle and brain. *Nature* 337:76-78.

ÖNERGUT S, KAVASLAR GN AND BATTALOGLU E (2000). Deletion pattern in the dystrophin gene in Turks and comparison with european and indians. *Ann Hum Genet* 64(pt1):33-40.

OUDET C, HANAVER A, CLEMENS P, CASKEY CT AND MANDEL JL (1992). Two hot spots of recombination in the DMD gene correlates with the deletion prone regions. *Hum Mol Genet* 1:599-603.

PANIGRAHI I AND MITTAL B (2001). Carrier Detection and prenatal diagnosis in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Indian pediatrics* 38: 631-639.

PERLOFF JK (1984). Cardiac rhythm and conduction in Duchenne's muscular dystrophy. A prospective study of 20 patients. *J AM Coll Cardio* 3:1263-1268.

PORTER JD (2000). Introduction to Muscular Dystrophy. *Microscopy Research and Technique* 48:127-130.

PRIOR TW, BARTOLO C, PAPP AC, SNYDER PJ, SEDRA MS, BURGHESE AH AND MENDELL JR (1996). Nonsense mutations in a Becker muscular dystrophy and an intermediate patient. *Hum Mut* 7:72-75.

ROBERTS RG, COFFEY AJ, BORROW M AND BENTLEY DR (1993). Exon structure of the human dystrophin gene. *Genomics* 16:536-538.

ROBERTS RG, MARTÍN B AND BENTLEY D (1992). Point Mutation in the dystrophin gene. *Genetics* 89:2331-35.

SADOLET-PUCCIO HM, KHURANA TS, COHEN JB AND KUNKEL LM (1996). Cloning and characterization of the human homologue of a dystrophin related phosphoprotein found at the Torpedo electric organ post-synaptic membrane. *Human Mol genet* 5:489-496.

SADOLET-PUCCIO HM, RAJALA M AND KUNKEL LM (1997). Dystrobrevin and dystrophin: and interaction through coiled coil motifs. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:12413-12418.

SARIG R, MEZGERLALLEMAND V, GITELMAN I, DAVIS C, FUCHS O, YAFFE D AND NUDEL U (1999). Targeted inactivation of Dp71, the mayor nonmuscle product of the DMD gene: differential activity of the Dp71 promoter during development. *Human Mol genet* 8:1-10.

SCHOFIELD JN, BLAKE DJ, SIMMONS C, MORRIS GE, TINSLEY JM, DAVIES KE AND EDWARDS YH (1994). Apo-dystrophin-1 and apo-dystrophin-2, products of the Duchenne muscular dystrophy locus: expression during mouse embryogenesis and in cultured cell lines. *Human Mol Genet* 3:1309-1316.

SWAIMAN KF AND SMITH SA (1989). Progressive muscular dystrophies. In: *pediatrics neurology: principles and practice*. 1<sup>st</sup> edn. Ed. Swaiman KF. St. Louis, the C.V. Mosby company 1139-1149.

TAYJSH, LOW PS AND LEE WS (1990). Dystrophin function: calcium related rather than mechanical. *Lancet* 335:983-987.

THOMAS AR (2001). The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle and Nerve* 24: 1575-1594.

WEINTRAUB H, DAVIES R, TAPSCOTT S, THAYER M, KRAUSE M BENEZRA R, BLACKWELL TK, TURNER D, RUPP R, HOLLENBERG S, ZHUANG Y AND LASSAR A (1991). The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* 251:761-766.

WEISSENBACH J (1993). Microsatellite polymorphisms and the linkage map of the human genome. *Curr Op Genet Develop* 3:414-417.

WHITE S, KALF M, LIU Q, VILLERIUS M, ENGELSMA D, KRIEK M, VOLLEBREGT E, BAKKER B, VAN OMMEN GB, BREUNING MH AND DEN DUNNEN JT (2002). Comprehensive detection of genomic duplications and deletions in DMD gene, by use of multiplex amplifiable probe hybridization. *Am J Hum Genet* 71:365-374.

WORTON RG AND THOMPSON MW (1988). Genetics of Duchenne muscular dystrophy. *Annu Rev Genet.* 22:601-629.

YAU SC, BOBROW M, MATHEW CG AND ABBS SJ (1996). Accurate diagnosis of carriers of deletions and duplications in Duchenne/Becker muscular dystrophy by fluorescent dosage analysis. *J Med genet* 33:550-558.

YOSHIDA M AND OZAWA E (1990). Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma. *J Biochem* 108: 748-752.

YOSHIDA M, SUSUKI A, YAMAMOTO H, NOGUCHI S, MIZUNO Y AND OZAWA E (1994). Dissociation of the complex of dystrophin and its associated proteins into several unique groups by *n*-octyl beta-D-glucoside. *Eur J Biochem* 222:1055-1061.