



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL DE PEDIATRÍA
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

**BÚSQUEDA DE DELECCIONES EN EL GEN DE DISTROFINA
EN PACIENTES MASCULINOS PEDIÁTRICOS MEXICANOS
DIAGNOSTICADOS CON Distrofia Muscular de
Duchenne/Becker.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA ESPECIALIDAD EN
GENÉTICA MÉDICA

PRESENTA

Dr. Carlos Alberto Yam Ontiveros

Tutor.

Dr. Ramón M. Coral Vázquez.

Cotutor.

M. en C. Ana Claudia Velásquez Wong.

Asesor Metodológico.

Dra. Eunice López Muñoz.



MÉXICO, D.F.

2007



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.



HOSPITAL DE PEDIATRÍA
CENTRO MÉDICO
NACIONAL SIGLO XXI, IMSS.

UNIDAD DE INVESTIGACION MÉDICA EN GENÉTICA HUMANA

**BÚSQUEDA DE DELECCIONES EN EL GEN DE DISTROFINA EN PACIENTES
MASCULINOS PEDIÁTRICOS MEXICANOS DIAGNOSTICADOS CON
DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE/BECKER.**

Tesis de Especialidad en Genética Médica

Tesista.

Dr. Carlos Alberto Yam Ontiveros.^{1,2}

Tutor.

Dr. Ramón M. Coral Vázquez.¹

Cotutor.

M. en C. Ana Claudia Velásquez Wong.¹

Asesor Metodológico.

Dra. Eunice López Muñoz.¹

1. Unidad de Investigación Médica en Genética Humana. UMAE. Hospital de Pediatría. Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS.
2. Departamento Genética Médica. UMAE. Hospital de Pediatría. Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS.

SINODALES DEL EXAMEN DE POSGRADO

Dr. Fabio A. Salamanca Gómez.

Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana.
Profesor Titular de la Especialidad en Genética Médica.
Hospital de Pediatría. Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS.

Dr. Miguel Angel Villasís Keever

Director de Educación e Investigación en Salud.
Hospital de Pediatría. Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS.

Dr. Diego J. Arenas Aranda.

Investigador Asociado "C".
Unidad de Investigación Médica en Genética Humana.
Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS.

Dra. Maria Antonieta de Jesús Araujo Solís.

Jefe del Departamento de Genética Médica.
Profesor Adjunto de la Especialidad en Genética Médica.
Hospital de Pediatría. Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS.

Dr. Juan Carlos Huicochea Montiel.

Médico Especialista en Genética Médica adscrito al Departamento de
Genética Médica.
Hospital de Pediatría. Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS.

AGRADECIMIENTOS.

A **Rosa, Lalo y Luís**, mi equipo y mis pilares.

Al **Dr. Salamanca**, con toda la admiración y respeto, gracias por ser mi maestro, mi guía, mi amigo y mi ejemplo a seguir. Es un honor ser su alumno.

Al **Dr. Huicochea**, gracias por enseñarme que el verdadero conocimiento siempre se acompaña de nobleza.

A la **M. en C. Alicia Cervantes**, a ti Alicia te agradezco todo, gracias por sembrar en la mente y en el alma de nosotros tus alumnos el conocimiento y la gran fuerza que te caracteriza.

Al **Dr. Coral**, gracias por demostrarme que la ciencia está en nuestras manos y que definitivamente no hay límites ni fronteras.

Al **Dr. Oliver De La Torre**, gracias por tu invaluable amistad, sé que nos espera un futuro exitoso.

A **Carlos**, donde estés, creo que ahora te entiendo un poco...

FACTIBILIDAD Y ASPECTOS ÉTICOS

El presente estudio fue posible ya que se contó con pacientes que cubrieron los criterios de inclusión en la consulta externa del servicio de Genética Médica del Hospital de Pediatría de CMN SXXI y del servicio de Distrofia Muscular del Instituto Nacional de Rehabilitación

Este estudio fue evaluado y autorizado por la Comisión Nacional de Investigación Científica con número de registro 2003-718-0024.

ÍNDICE

	Página.
Resumen estructurado.	7
Antecedentes.	8
Distrofia Muscular de Duchenne/Becker (DMD/DMB)	9
Genética Molecular de la DMD/DMB.	11
Expresión Fenotípica.	15
Diagnóstico Molecular.	16
Justificación.	17
Objetivos.	18
Objetivo General.	18
Objetivo Particular.	18
Metodología y Diseño del Estudio.	18
Material y Métodos.	19
Procedimientos Clínicos.	20
Procedimientos de Laboratorio.	20
Resultados.	25
Fenotipo de los Pacientes.	25
Deleciones Encontradas.	26
Discusión.	30
Conclusiones.	31
Referencias Bibliográficas.	32
Anexos.	35

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

	Página.
Figura 1.	12
Figura 2.	13
Figura 3.	15
Figura 4.	16
Figura 5.	28
Figura 6.	29
Tabla 1.	19
Tabla 2.	20
Tabla 3.	22
Tabla 4.	23
Tabla 5.	25
Tabla 6.	26
Tabla 7.	27
Gráfica 1.	26

RESUMEN ESTRUCTURADO.

BÚSQUEDA DE DELECCIONES EN EL GEN DE DISTROFINA EN PACIENTES MASCULINOS PEDIÁTRICOS MEXICANOS DIAGNOSTICADOS CON DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE/BECKER.

Autores. Yam Ontiveros Carlos Alberto^{1,2}, Coral Vázquez Ramón¹, Velásquez Wong Ana Claudia¹. (1. Unidad de Investigación Médica en Genética Humana. 2. Departamento de Genética Médica, Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI)

Introducción. La Distrofia Muscular de Duchenne/Becker (DMD/DMB) afecta a 1 de 3500 varones nacidos vivos, se manifiesta clínicamente entre los 2 y los 6 años de edad, con pseudohipertrofia de los músculos gemelos, debilidad de las extremidades inferiores y músculos de la cintura pélvica, que progresa de forma simétrica hacia la cintura escapular y extremidades superiores, los pacientes quedan confinados a una silla de ruedas a la edad de entre 10 y 15 años, y fallecen alrededor de los 20 años por infecciones respiratorias o insuficiencia cardíaca. La DMD presenta un modelo de herencia recesivo ligado al cromosoma X. Un tercio de los casos se debe a mutaciones de novo, un tercio a la herencia de alteraciones por mujeres portadoras sin antecedentes familiares que son nuevas mutantes y un tercio por la herencia del gen presente desde las primeras generaciones de un linaje familiar. El gen *DMD* responsable de la enfermedad se localiza en Xp21, contiene 79 exones. La mayor parte de las mutaciones en el gen *DMD* son deleciones intragénicas y ocurren en el 65% de los pacientes, se agrupan en dos sitios calientes de recombinación: 70% en la región distal: exones 44 a 53 (Punto caliente mayor), 30% en la parte proximal de 5' de los exones 2 a 20 (Punto caliente menor). Hasta el 98% de todas las deleciones se pueden identificar a través de la técnica de PCR múltiple utilizando un mínimo de 19 exones.

Planteamiento del problema y justificación. Planteamiento del problema y justificación. Los métodos de diagnóstico en el estudio de pacientes con DMD/DMB en nuestro medio son generalmente los convencionales, realizando un abordaje clínico, estudio de genealogía, así como determinación de CPK, con lo anterior resulta muy difícil establecer una clasificación veraz del cuadro fenotípico observado y por tanto el médico se ve limitado para considerar la evolución del cuadro clínico. Nosotros realizamos la identificación de deleciones en el gen de distrofina causales del cuadro fenotípico de DMD/DMB y la correlación con el fenotipo.

Objetivos y Metodología. Objetivos y Metodología. Objetivo General. Identificar las deleciones en el gen *DMD* en pacientes masculinos diagnosticados clínicamente con Distrofia Muscular de Duchenne/Becker. Realizar la correlación fenotipo – genotipo en aquellos pacientes en los que se haya encontrado deleción en el gen *DMD*. Brindar un adecuado asesoramiento genético con un diagnóstico preciso. Se trató de un estudio observacional, descriptivo y transversal. Fueron incluidos pacientes pediátricos masculinos entre las edades de 2 a 16 años 9 meses con el diagnóstico clínico de DMD/DMB. Se excluyeron aquellos pacientes que presentaran cualquier alteración muscular secundaria a otras etiologías, se eliminaron del estudio los pacientes en los cuales no se encontraron deleciones en el gen de distrofina. El muestreo se realizó de forma no probabilística por conveniencia, de los pacientes que acudieron al servicio de genética médica del Hospital de Pediatría de Centro Médico Nacional Siglo XXI, así como al servicio de distrofias musculares del Instituto nacional de Rehabilitación durante el periodo correspondiente de Junio a Diciembre de 2006.

Resultados y conclusiones. 5 pacientes presentaron deleción en alguno de los 2 Set estudiados, lo cual correspondiente al 45.45 % de la muestra, concordando la literatura internacional. No fue posible realizar una correlación directa entre los datos fenotípicos de los pacientes que fueron estudiados y la deleción encontrada, nuestros resultados se correlacionan con los reportados por otros autores a nivel mundial, en donde a pesar de encontrar deleciones no es posible en todos los casos explicar el fenotipo observado. Resulta necesario identificar en nuestra población la forma en la cual otros mecanismos a nivel molecular influyen en el desarrollo del fenotipo.

BÚSQUEDA DE DELECCIONES EN EL GEN DE DISTROFINA EN PACIENTES MASCULINOS PEDIÁTRICOS MEXICANOS DIAGNOSTICADOS CON DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE/BECKER.

ANTECEDENTES.

Dentro de las enfermedades genéticas monogénicas se encuentran las distrofias musculares. El término distrofia muscular se aplica a miopatías degenerativas, primarias determinadas genéticamente, cuya manifestación clínica principal es el debilitamiento muscular progresivo secundario a una degeneración evidente de dicho tejido (1). Constituyendo entonces un grupo heterogéneo desde el punto de vista genético, ya que son al menos 30 los genes que causan esta enfermedad (1,2,3,4).

La evolución clínica es altamente variable, desde formas congénitas graves con progresión acelerada hasta formas moderadas de instauración más tardía y con un curso más lento. (1,4,5,6,7)

De acuerdo al patrón de herencia existen tres variedades de distrofias musculares:

1. Distrofias musculares ligadas al cromosoma X.
 - A. Distrofia muscular de Duchenne/Becker (DMD/DMB)
 - B. Distrofia Emery-Dreifus.

2. Distrofias musculares autosómico dominantes.
 - A. Distrofia muscular facioescapulohumeral.
 - B. Distrofia muscular miotónica.
 - C. Distrofia muscular distal.
 - D. Distrofia muscular ocular.
 - E. Distrofia muscular oculofaríngea.

3. Distrofias musculares autosómico recesivas.

A. Distrofia muscular LG.

DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE/BECKER. (DMD/DMB)

La DMD es la más común y grave de las distrofias musculares, presentó su primera descripción en 1868 por parte del Dr. Duchenne, definiéndola como una enfermedad donde ocurre un debilitamiento muscular progresivo, que afecta a niños en los inicios de su infancia.

La distrofia muscular (DM) ligada al cromosoma X se puede manifestar en forma grave (DMD) o intermedia (DMB). Los estudios de genética molecular así como el mapeo genético indican que ambas entidades resultan alélicas y que las mutaciones ocurren en el gen codificador para distrofina. (4,8,9)

La DMD afecta a 1 de 3500 varones nacidos vivos, se manifiesta clínicamente entre los 2 y los 6 años de edad, con pseudohipertrofia de los músculos gemelos, debilidad de las extremidades inferiores y músculos de la cintura pélvica, que progresa de forma simétrica hacia la cintura escapular y extremidades superiores. (2,5,10)

Como primeras manifestaciones se puede presentar dificultad para subir escaleras o levantarse del suelo, iniciando después de los 3 años de edad. Por lo cual constituye una enfermedad invalidante en la cual los pacientes quedan confinados a una silla de ruedas a la edad de entre 10 y 15 años, y fallecen alrededor de los 20 años por infecciones respiratorias o insuficiencia cardíaca. Hasta una cuarta parte de los pacientes presentan un CI de 70. (1,2,11,12)

La DMB presenta una evolución más benigna, con una progresión lenta y los varones afectados pueden reproducirse aún cuando la fertilidad suele estar disminuida. Los varones afectados transmitirán el gen anormal a todas sus hijas, resultando portadoras, mientras que sus hijos varones no se verán afectados por dicha mutación.

Dentro los estudios de laboratorio que se realizan en pacientes con DMD/DMB es la determinación de creatinofostocinasa (CPK) sérica. En aquellos varones que presenten el gen anormal en la etapa preclínica la determinación de CPK puede mostrar valores cien

veces mayores que los observados en recién nacidos normales. La cifra más elevada de CPK es demostrada alrededor de los 14 a 22 meses de edad; conforme el padecimiento progresa dicho valor tiende a disminuir. (1,2,12,13)

Otras enzimas de las cuales podemos encontrar niveles elevados en suero son la aldolasa (ALD), la transamina glutámico oxalacética (TGO) y la deshidrogenasa láctica (LDH). La CPK en al menos dos órdenes de magnitud con respecto al valor normal en la etapa preclínica es considerada prueba diagnóstica. Las alteraciones de ésta enzima también han sido utilizadas para el diagnóstico prenatal así como la detección de mujeres portadoras. Sin embargo los resultados que se obtienen son poco confiables ya que los niveles séricos de estas enzimas pueden variar por diversas razones como son el ejercicio, la edad, el ciclo menstrual y el embarazo, propiciando entonces la obtención de falsos positivos. (1,2,14,15,16,17,18)

El estudio electromiográfico demuestra la disminución de la duración media de los potenciales de unidad motora y aumento de las formas polifásicas que reflejan la pérdida de fibra muscular, difiriendo así de las neuropatías. Sin embargo no tiene valor en el diagnóstico diferencial para las diversas formas de distrofia muscular. (12,13)

El estudio histopatológico no establece exactamente el diagnóstico diferencial entre las diversas distrofias musculares, ya que los pacientes afectados la histología del músculo muestra variación en el tamaño de la fibra muscular, fibras hipertróficas y con degeneración, áreas focales de necrosis, fagocitosis e incremento en el tamaño de los núcleos, aunado a lo anterior en la fase preclínica puede observarse hialinización y aumento del tamaño fibrilar. (1). El reemplazo del músculo por grasa y tejido conjuntivo en los estadios finales presenta patrones similares al de otras enfermedades miodegenerativas.

La DMD presenta un patrón de herencia recesivo ligado al cromosoma X, es transmitido principalmente por mujeres portadoras y en algunos casos por hombres afectados (2). Se estima que un tercio de los casos se debe a mutaciones de novo, un tercio a la herencia de alteraciones por mujeres portadoras sin antecedentes familiares que son nuevas mutantes y un tercio por la herencia del gen presente desde las primeras generaciones de un linaje familiar. Debido a que el gen DMD está ligado al cromosoma X, y este sufre

una inactivación al azar, se calcula que las portadoras presentan las manifestaciones clínicas de esta miopatía. (6,8,19)

Genética molecular de la DMD/DMB

En el año de 1986 se localizó el gen responsable de la enfermedad DMD/DMB en una región específica del cromosoma X. Siendo ésta en Xp21. Este gen contiene más de 2, 000,000 de nucleótidos y un total de 79 exones, codifica para un transcrito de RNA mensajero (mRNA) de 141 kb y otros transcritos de 7 promotores diferentes con heterogeneidad, que deriva de un splicing alternativo, se ha identificado como un componente poco abundante en el mRNA del músculo esquelético (0.01% - 0.001%) y en cantidades mucho menores en músculo liso y tejido cerebral.

El gen de la distrofina es el más grande que se ha identificado hasta el momento en el humano correspondiendo a un total de 2.3 megabases (2300 kb), lo cual explica la tasa de mutación tan alta que presenta si lo comparamos con otros genes cuyo tamaño promedio se encuentra alrededor de 350kb. (6,8,17,20,21,)

El producto del gen *DMD* es la distrofina. El cDNA de la distrofina es relativamente pequeño >13,973 nucleótidos, los primeros 11,336 codifican para distrofina y el resto permanece sin traducir. (3,4,13,14,15)

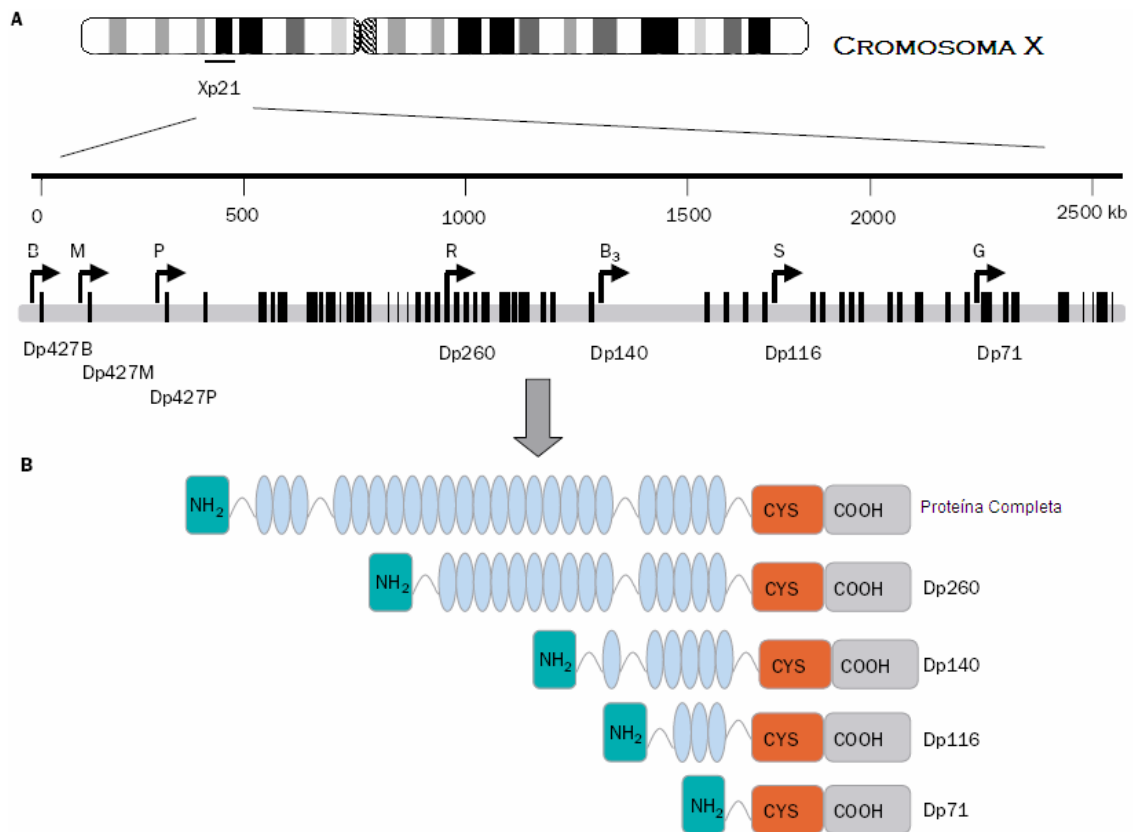


Figura.1. A. Organización genómica del gen de la distrofina. Las líneas verticales representan los 79 exones. Las flechas indican los 7 promotores: B cerebro, M Músculo, P Purkinje. R,B₃,S y G Dp260 Retina, Dp 140 cerebro, Dp116 Células de Schwann y Dp71 General. **B.** Composición de dominios de los diferentes tipos de Distrofina.

La estructura de la proteína producida por el gen DMD se ha deducido de la secuencia completa del cDNA de humano y codifica una proteína con un peso molecular de 427kd formada por 3,685 aminoácidos dispuestos en 4 dominios. Los tres primeros dominios se relacionan con porciones análogas de la proteína actinina, la cual se encuentra en el citoesqueleto de varios tipos celulares en diversos organismos. El dominio aminoterminal se compone por 240 aminoácidos y muestra una gran homología con el dominio de unión actina de la actina. El segundo dominio que comprende los aminoácidos 278 al 3080 presenta un patrón de repetición similar a los repetidos encontrados en actina y espectrina. El tercer dominio con más de 140 aminoácidos es rico en cisteína y contiene sitios de unión a Ca²⁺. El último dominio correspondiente a la región carboxiloterminal agrupa a 420 aminoácidos y no presenta analogía con alguna secuencia conocida. (6,7,22,24)

La distrofina es una proteína del músculo esquelético de la familia de las espectrinas que se localiza en la membrana celular y funciona manteniendo la integridad estructural

del citoesqueleto, así como para establecer conexión entre esta y la matriz extracelular. En condiciones normales la distrofina se expresa en el músculo esquelético del embrión y del adulto, en el músculo cardíaco, visceral y vascular liso y en el cerebro. Tiene una participación mecánica al forzar la fibra muscular y una función biológica que consiste en mantener una distribución espacial del complejo de glucoproteína permitiendo una integridad muscular. En el sistema nervioso es expresada fundamentalmente por las neuronas determinándose que los primeros 11 aminoácidos de la distrofina del músculo esquelético es reemplazada por tres aminoácidos en la isoforma que se encuentra en el cerebro. Esto sugiere que los promotores puedan ser considerados como tejidos específicos por lo cual las mutaciones en la expresión de la distrofina se traduce clínicamente por grados variables de retraso mental vinculado a la DMD. (11,13,14,15,25,)

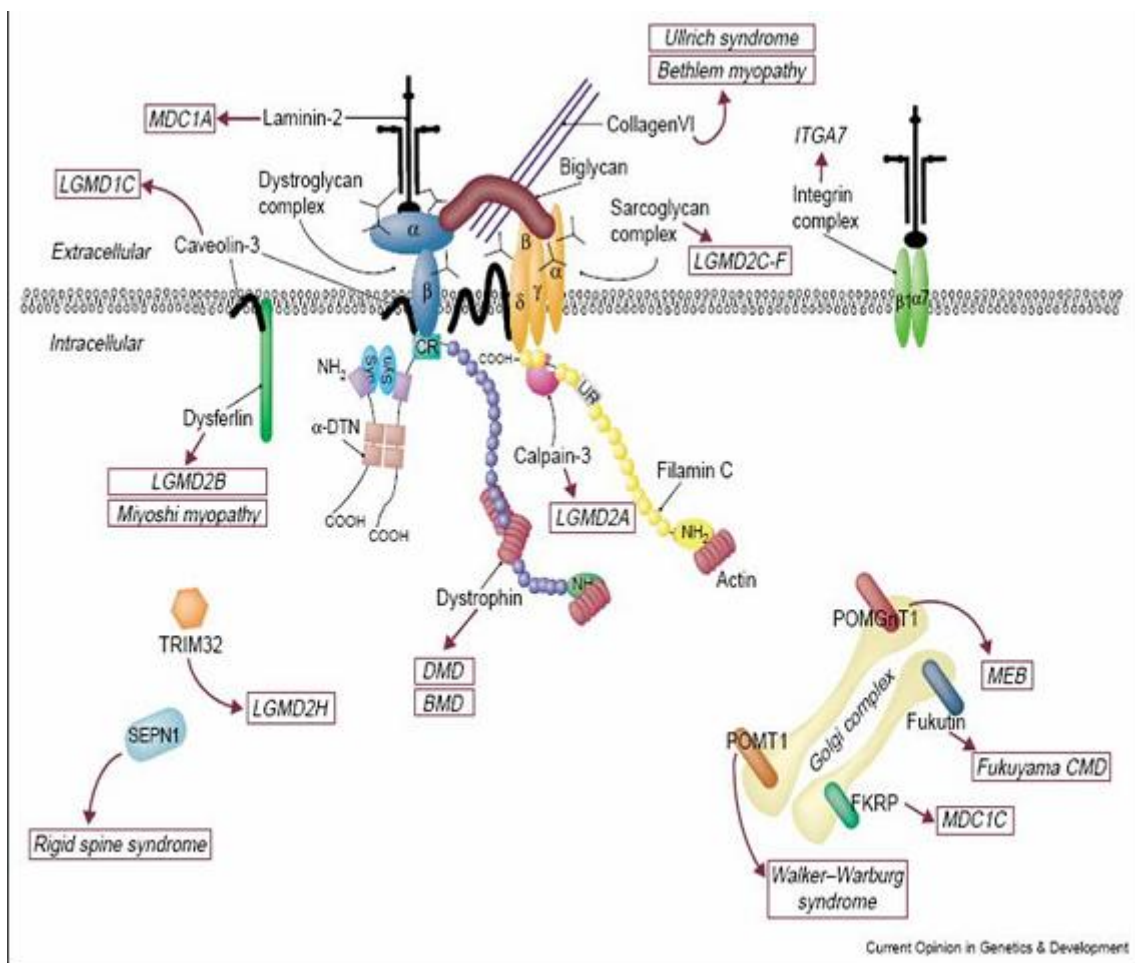


Figura.2. Organización del complejo proteico asociado a distrofina.

La distrofina se detecta en biopsias de tejido muscular mediante anticuerpos antidistrofina, su ausencia completa o cifras menores de 3% resultan específicas y características del fenotipo de DMD. Hasta en un 85% de los pacientes con DMB la distrofina tiene un peso molecular anormal ya sea más pequeño por deleciones (80%) o más grande por duplicacion (5%), la actividad de la distrofina puede ser 10 a 40% de lo normal. El fenotipo grave de la DMD producido por una deleción o duplicación da lugar a una proteína truncada o no funcional, mientras que en la DMB el fenotipo es intermedio y se producen mutaciones que no afectan el marco de lectura y que dejan intactas las dos partes terminales de la proteína.

Los modelos patogénicos de la DMD sugieren que este complejo forma un puente estructural entre la lámina basal externa y la interna del citoesqueleto, y cuando no existe distrofina se produce un defecto en la membrana que hace que el músculo resulte susceptible a roturas plasmalemales durante la actividad contráctil. Otro modelo indica que la distrofina como organizadora de la membrana del citoesqueleto con función de organización de canales de iones y receptores para neurotransmisores. (7,8,14,26)

La mayor parte de las mutaciones en el gen *DMD* son deleciones intragénicas y ocurren en el 65% de los pacientes, considerándose una incidencia muy alta y sin presentar una distribución al azar ya que se agrupan en dos sitios calientes de recombinación: 70% en la región distal: exones 44 a 53 (Punto caliente mayor), 30% en la parte proximal de 5' de los exones 2 a 20 (Punto caliente menor). La porción central es un sitio donde suceden preferentemente las deleciones uno de esos sitios es el intron 44. (4,6,16,24)

Debido a la agrupación de las deleciones en los dos puntos calientes previamente referidos es posible identificar hasta el 98% de todas las deleciones a través de la técnica de PCR múltiple utilizando un mínimo de 19 exones. (11,16,18). Sin embargo aún cuando ésta técnica es altamente efectiva para el diagnóstico molecular no puede utilizarse para identificar duplicaciones o pacientes mujeres portadoras (7,11,14,16).

En el 5% de los casos hay duplicaciones cuyo mecanismo son alteraciones en la recombinación en la línea de células germinales. Hasta en un 30% de los pacientes no es posible detectar deleciones o duplicaciones, siendo entonces mutaciones puntuales y

debido al enorme tamaño del gen es probable que dichas mutaciones reflejen errores en el splicing. (4,12,22,26,27)

Expresión Fenotípica.

Se ha comprobado por medio de múltiples estudios que no existe una relación directa entre el tamaño de la delección y el cuadro clínico resultante. Por ejemplo, delecciones pequeñas, como la del exón 44, resultan en el fenotipo clásico de DMD; en cambio, delecciones grandes que involucran a más del 50% del gen se han descrito en pacientes con DMB (8). Los dominios central y distal parecen ser casi dispensables para la funcionalidad de la proteína, ya que algunas delecciones en dichas regiones se asocian con mialgias y tetanias localizadas a ciertos grupos musculares, pero sin debilidad muscular; y solo algunos de éstos pacientes pueden presentar concentraciones elevadas de CPK en plasma, lo anterior se ha confirmado en pacientes con delecciones de los exones 32-44, 48-51 y 48-53 todos ellos con concentraciones de distrofina normales o cercanas a lo normal. (4,11). Por lo anterior se ha considerado que los efectos de la delección en el fenotipo dependen si alteran o no el marco de lectura y no de la extensión de la propia delección. (Ver figura 3).

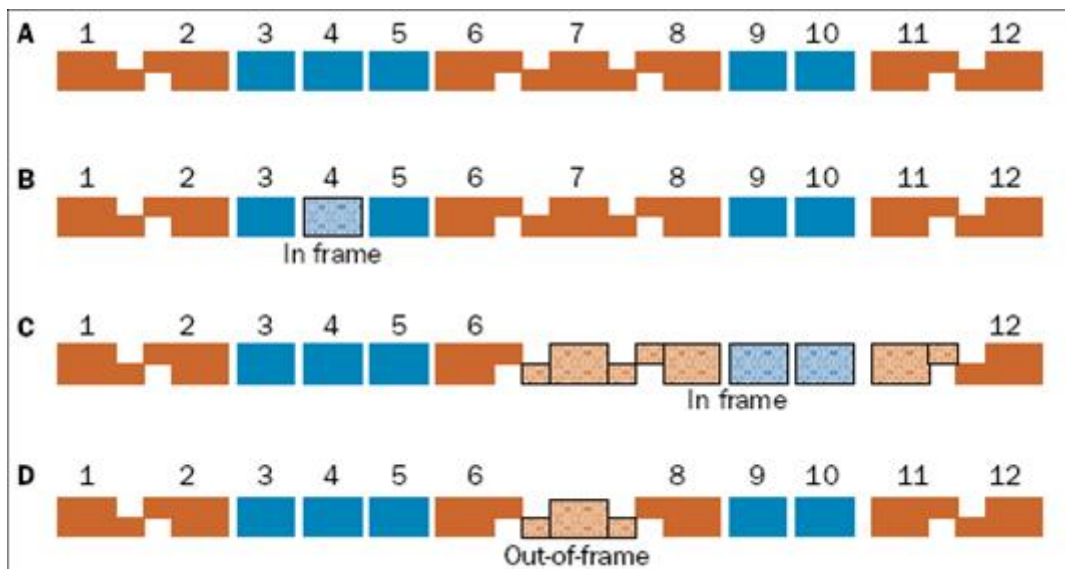


Figura.3. Efectos de las diferentes delecciones en el marco de lectura del gen *DMD*. **A.** Normal. **B.** Delección del exón 4. **C.** Delección de los exones 7 a 11 y se mantiene el marco de lectura abierto. **D.** Delección del exón 7 genera pérdida del marco de lectura.

Una gran variedad de estudios han demostrado que diferentes deleciones, en términos de tamaño y posición, pueden tener una gravedad fenotípica similar (11,13,26,). La razón de dicho efecto puede ser relacionada con la intervención de RNA antisentido, este fenómeno puede explicar el grado de preservación de la función de la distrofina, teniendo por lo tanto una variabilidad en la expresión fenotípica. (7,11,14,27,30).

Mutaciones que mantienen el marco de lectura (en marco) generalmente resultan en una proteína anormal pero parcialmente funcional asociada con DMB. En los pacientes con DMD, las deleciones alteran el marco de lectura (cambio en el marco) resultan en un RNA inestable que produce una proteína truncada de concentraciones casi indetectables. Esta hipótesis del marco de lectura se aplica para el 90% de los casos y es comúnmente usada tanto para el diagnóstico de confirmación de distrofinopatías como para el diagnóstico diferencial entre DMD y DMB. (11,14,25,30). (Ver figura 3).

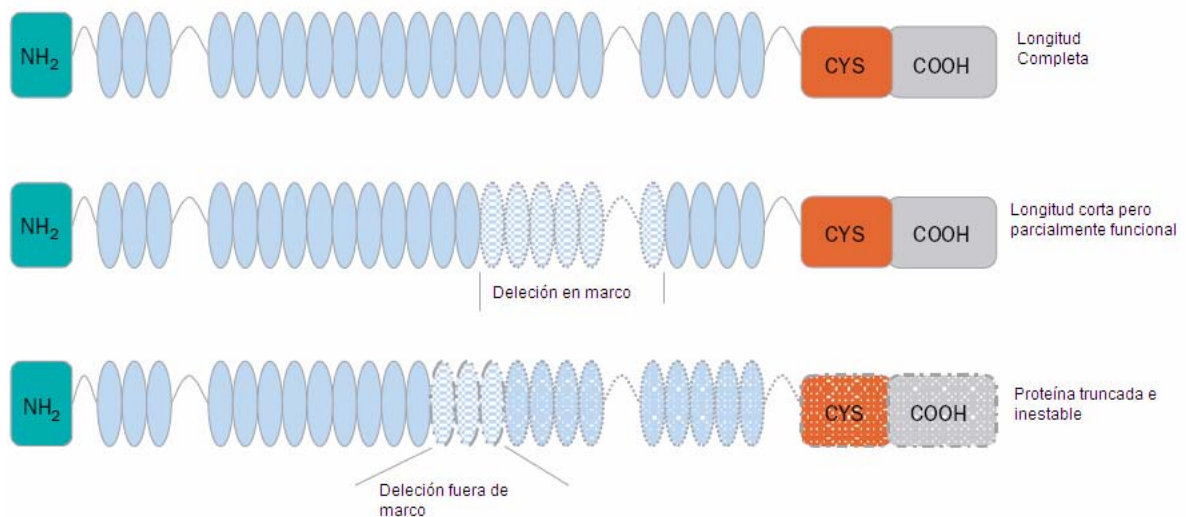


Figura 4. Efectos de diferentes mutaciones en el gen de distrofina. Proteína completa (arriba); Delección de una parte del dominio espectrina-like que genera una proteína corta pero funcional (en medio); Delección fuera de marco que resulta en una proteína truncada que se degrada rápidamente en el músculo (abajo).

Diagnóstico molecular

Las técnicas de diagnóstico molecular identifican de forma directa o indirecta la mutación con una mayor precisión diagnóstica en comparación con otros métodos de laboratorio. Dichas técnicas han favorecido tanto un diagnóstico oportuno y certero como un asesoramiento genético adecuadamente dirigido.

Entre las técnicas de diagnóstico molecular se encuentran las siguientes: las utilizadas para rearrreglos grandes con diagnóstico de delección duplicación, PCR y Southern. La técnica de PCR es útil en el diagnóstico de deleciones en un 70 a 98% de los casos, en el caso de las duplicaciones (75% de los casos) resulta útil también como prueba confirmatoria. Análisis de ligamiento (RFLP). Análisis de distrofina (Western). Estudio de distrofina (inmunohistoquímica) y diagnóstico de microdeleciones a través de polimorfismos conformacionales de una sola hebra (SSCP), heterodúplex (HDA) prueba de proteína truncada (STOP), desnaturalización por gradientes de electroforesis (DGGE). (1,8,10,24,27,30)

En el caso de cuadros fenotípicos de DMD/DMB resultantes de deleciones en gen de distrofina con las técnicas antes descritas es posible realizar una correlación fenotipo – genotipo entre la localización de la delección y el grado de afectación de los pacientes. (11,21,25).

JUSTIFICACIÓN.

Los métodos de diagnóstico en el estudio de pacientes con DMD/DMB en nuestro medio son generalmente los convencionales, realizando un abordaje clínico completo, con un estudio de genealogía estrictamente dirigido así como determinación de CPK. Sin embargo, como ya se ha referido en párrafos anteriores estos métodos presentan un margen de error que cobra considerable importancia en el momento de realizar el asesoramiento genético.

Con los métodos convencionales de diagnóstico resulta muy difícil establecer una clasificación veraz del cuadro fenotípico observado y por tanto el médico se ve limitado para considerar la evolución del cuadro clínico.

En el presente trabajo realizamos la identificación de deleciones en el gen de distrofina causales del cuadro fenotípico de distrofia muscular de Duchenne /Becker, así como la correlación con su expresión fenotípica.

Entre las técnicas de diagnóstico molecular se encuentran las siguientes: las utilizadas para rearrreglos grandes con diagnóstico de delección duplicación, PCR y Southern. La técnica de PCR es útil en el diagnóstico de delecciones en un 70 a 98% de los casos, en el caso de las duplicaciones (75% de los casos) resulta útil también como prueba confirmatoria. Análisis de ligamiento (RFLP). Análisis de distrofina (Western). Estudio de distrofina (inmunohistoquímica) y diagnóstico de microdelecciones a través de polimorfismos conformacionales de una sola hebra (SSCP), heterodúplex (HDA) prueba de proteína truncada (STOP), desnaturalización por gradientes de electroforesis (DGGE). (1,8,10,24,27,30)

En el caso de cuadros fenotípicos de DMD/DMB resultantes de delecciones en gen de distrofina con las técnicas antes descritas es posible realizar una correlación fenotipo – genotipo entre la localización de la delección y el grado de afectación de los pacientes. (11,21,25).

JUSTIFICACIÓN.

Los métodos de diagnóstico en el estudio de pacientes con DMD/DMB en nuestro medio son generalmente los convencionales, realizando un abordaje clínico completo, con un estudio de genealogía estrictamente dirigido así como determinación de CPK. Sin embargo, como ya se ha referido en párrafos anteriores estos métodos presentan un margen de error que cobra considerable importancia en el momento de realizar el asesoramiento genético.

Con los métodos convencionales de diagnóstico resulta muy difícil establecer una clasificación veraz del cuadro fenotípico observado y por tanto el médico se ve limitado para considerar la evolución del cuadro clínico.

En el presente trabajo realizamos la identificación de delecciones en el gen de distrofina causales del cuadro fenotípico de distrofia muscular de Duchenne /Becker, así como la correlación con su expresión fenotípica.

OBJETIVOS

Objetivo General.

- A. Identificar las deleciones en el gen *DMD* en pacientes masculinos diagnosticados clínicamente con Distrofia Muscular de Duchenne/Becker.

Objetivos Particular.

- A. Realizar la correlación fenotipo – genotipo en aquellos pacientes en los que se haya encontrado deleción en el gen *DMD*.

METODOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTUDIO.

Se trató de un estudio observacional, descriptivo y transversal. Fueron incluidos pacientes pediátricos masculinos entre las edades de 2 a 16 años 9 meses con el diagnóstico clínico de distrofia muscular de Duchenne/Becker, todos ellos bajo el consentimiento informado de los padres o tutores. Fueron excluidos del estudio aquellos pacientes que presentaran cualquier alteración muscular secundaria a otras etiologías, se eliminaron del estudio los pacientes en los cuales no se encontraron deleciones en el gen de distrofina. El muestreo se realizó de forma no probabilística por conveniencia, de los pacientes que acudieron al servicio de genética médica del Hospital de Pediatría de Centro Médico Nacional Siglo XXI, así como al servicio de distrofias musculares del Instituto Nacional de Rehabilitación durante el periodo correspondiente de Junio a Diciembre de 2006. Como variable independiente se tomó la presencia de deleción en el gen de distrofina y como variable dependiente el fenotipo clínico de distrofia muscular determinado por el tipo de deleción.

OBJETIVOS

Objetivo General.

- A. Identificar las deleciones en el gen *DMD* en pacientes masculinos diagnosticados clínicamente con Distrofia Muscular de Duchenne/Becker.

Objetivos Particular.

- A. Realizar la correlación fenotipo – genotipo en aquellos pacientes en los que se haya encontrado deleción en el gen *DMD*.

METODOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTUDIO.

Se trató de un estudio observacional, descriptivo y transversal. Fueron incluidos pacientes pediátricos masculinos entre las edades de 2 a 16 años 9 meses con el diagnóstico clínico de distrofia muscular de Duchenne/Becker, todos ellos bajo el consentimiento informado de los padres o tutores. Fueron excluidos del estudio aquellos pacientes que presentaran cualquier alteración muscular secundaria a otras etiologías, se eliminaron del estudio los pacientes en los cuales no se encontraron deleciones en el gen de distrofina. El muestreo se realizó de forma no probabilística por conveniencia, de los pacientes que acudieron al servicio de genética médica del Hospital de Pediatría de Centro Médico Nacional Siglo XXI, así como al servicio de distrofias musculares del Instituto Nacional de Rehabilitación durante el periodo correspondiente de Junio a Diciembre de 2006. Como variable independiente se tomó la presencia de deleción en el gen de distrofina y como variable dependiente el fenotipo clínico de distrofia muscular determinado por el tipo de deleción.

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE
Deleción	Pérdida de material genético en una región específica de un gen determinado.	Pérdida desde 1 nucleótido en adelante.	Cualitativa Nominal.
Fenotipo clínico de distrofia muscular DMD/DMB	Datos clínicos manifestados por pérdida progresiva de la fuerza muscular, debida exclusivamente a alteraciones en la conformación y función propia de la proteína distrofina.	DMD fenotipo grave, edad de inicio antes de los 4 años de edad. DMB fenotipo leve, edad de inicio alrededor de los 12 años de edad.	Cualitativa Nominal.

Tabla 1. Descripción de variables. En la tabla se muestra la definición conceptual, operacional y escala de medición de las dos variables de estudio.

El estudio se realizó en el Laboratorio de biología Molecular de la Unidad de Investigación Médica en genética Humana del Hospital de Pediatría de Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Material y métodos.

Contamos con el equipo y material mínimo necesario para la realización del presente proyecto, al disponer de materiales y reactivos para extracción de DNA, cámaras de electroforesis, kit para amplificación de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa múltiple, MPCR en humanos para DMD/DMB en set I y set II de maximbiotm. Documentador de imágenes para geles de agarosa marca Bio Rad. Cámara de luz Ultravioleta para PCR. Termociclador para PCR modelo T Gradient marca Biometra. Así mismo se contó con las muestras obtenidas de los pacientes tanto de la consulta externa de Genética Médica como de la consulta de Distrofias Musculares del

Instituto Nacional de Rehabilitación que cubrieron los criterios de inclusión y de los cuales sus padres aceptaron ingresar al estudio mediante consentimiento informado. Se contó con el personal humano mínimo para realizar el proyecto. Se dispuso de financiamiento parcial por parte de la Comisión Nacional de Investigación Científica con número de registro 2003-718-0024.

PROCEDIMIENTOS CLÍNICOS.

Fueron seleccionados 11 pacientes pediátricos, de los cuales únicamente 5 fueron incluidos en el estudio al cumplir los criterios establecidos. Se informó y se realizó la invitación a participar en el estudio a los padres de los pacientes, quienes firmaron la carta de consentimiento informado. Se realizó una historia clínica completa, así mismo una exploración física integral y posteriormente dirigida a la exploración física muscular utilizando la escala de examen manual muscular de Lovett de 5 puntos, exploración de arcos de movilidad, maniobras específicas.

Grado	Clasificación
0	Ninguna contracción
1	Contracción visible o palpable
2	Contracción que permite amplitud eliminando la gravedad
3	Amplitud normal en contra de la gravedad
4	Amplitud normal contra una resistencia
5	Fuerza muscular normal

Tabla 2. La tabla muestra la escala de examen manual muscular de Lovett, el la cual se consideran 5 grados por orden de gravedad

PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

Obtención de la muestra de sangre periférica.

Se obtuvieron 5 ml de sangre periférica mediante punción en vena periférica, y se colocó en tubos BD vacutainer TM K2 de etilen diamino tetra acetato al 0.5% (EDTA) de 5 ml. Se homogeneizó la sangre con el EDTA, posteriormente se realizó la extracción de DNA.

Extracción de DNA.

Se mezcló y centrifugó por 20 minutos a 3 500 rpm a partir de los 5 ml de sangre periférica colocados en tubos de 5 ml que contenían 500µl de etilen diamino tetra acetato al 0.5% (EDTA). Se recuperó la capa de glóbulos blancos de la fase intermedia mediante succión, se colocaron en un tubo Eppendorf y se agregaron 500 ul de RCLB (XX) para lisar los eritrocitos mezclados con los glóbulos blancos. La muestra se agitó y centrifugó 5 minutos a 4 000 rpm y se desechó el sobrenadante; dicho procedimiento se realizó tres veces por muestra para obtener la pastilla blanca de células blancas.

La pastilla de células blancas obtenida se resuspendió con 180 µl de NaCl 5 mM, se agitó vigorosamente, se adicionaron 80 µl de SDS al 10% para lisar la membrana nuclear de los leucocitos. La mezcla se agitó suavemente por 5 minutos y se agregó 615 µl de NaCl saturado, se homogeneizó y centrifugó 10 minutos a 10 000rpm. Se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo Eppendorf, desechando la pastilla de con los restos celulares. Se adicionaron al DNA de la fase acuosa dos volúmenes de etanol al 100% y se agitó suavemente, para precipitar el DNA. Se centrifugó 3 minutos a 10 000 rpm, se decantó el sobrenadante y se lavó dos veces con 500 µl de etanol al 70%, se agitó hasta separar la pastilla obtenida por la centrifugación. Posteriormente se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente hasta evaporar el etanol, posteriormente se resuspendió en 100 µl de agua hasta disolver en DNA. Las muestras fueron almacenadas a 20 °C para posteriormente amplificar las regiones específicas (31).

Determinación de la integridad del DNA

Para todas las muestras se determinó la integridad del DNA obtenido, en gel de agarosa al 1% en TBE 1X (Tris-base 89 mM, ácido bórico 89mM y EDTA 2mM) con 5 µl de bromuro de etidio. Una vez terminada la electroforesis se observó el gel en un transiluminador de UV de onda corta.

Se midió la concentración de DNA mediante espectrofotometría a longitudes de onda de 260 y 280 nm, con una densidad óptica que equivalió a 50 µg/ml. (31).

Amplificación de las regiones específicas del gen *DMD*.

Para realizar la amplificación de las regiones específicas en el gen *DMD/DMB* se utilizó el Kit MPCR para humanos *DMD/BMD New Set I+II* de maximbio™ mediante el siguiente procedimiento para ambos Sets (32, maximbio™):

1. Preparación de la reacción de mezcla. En la campana de luz UV para PCR se realizó la mezcla de reacción para PCR utilizando los buffers contenidos en el kit de MPCR así como las muestras obtenidas de DNA de los pacientes, en las siguientes concentraciones:

Volumen por muestra	Agente (en orden)
25.0 µl	2X MPCR BufferMixture
5.0 µl	10x MPCR Primers
0.5 µl	<i>Taq</i> DNA Polimerasa (5U/µl)
5.0 µl	Muestra de cDNA ó
14.5 µl	10x cDNA control del kit. H2O

Tabla 3. Preparación para la amplificación de los exones estudiados mediante reacción en cadena de la polimerasa.

SET I amplificó los exones: 8 (360 pb), 17 (481 pb), 19 (459 pb), 44 (289 pb), 45 (547 pb), 48 (506 pb), 12 (331 pb), 51 (388 pb), 4 (196 pb).

SET II amplificó los exones: 3 (410 pb), 6 (208 pb), 13 (238 pb), 43 (312 pb), 47 (181 pb), 50 (271 pb), 52 (113 pb), 60 (139 pb) promotor específico muscular (535 pb).

2. Reacción en termociclador de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Una vez hecha la mezcla se realizó la reacción en el termociclador para PCR modelo T Gradient marca Biometra, con la siguiente programación:

Temperatura Grados Centígrados	Tiempo	Num. de ciclos
94 oC	3 minutos	1 ciclo
94 oC	30 segundos	35 ciclos
53 oC	30 segundos	
65 oC	3 segundos	
70 oC	10 minutos	1 ciclo
20 oC		

Tabla 4. Programación de ciclos utilizados en este estudios de reacción en cadena de la polimerasa en el termociclador.

Electroforesis en gel de Agarosa.

Posterior a la reacción de amplificación de las secuencias específicas, las muestras fueron colocadas en gel de agarosa al 2% en una cámara de electroforesis y se observó mediante el documentador de imágenes para geles de agarosa la presencia o ausencia (delección) de los exones específicos de cada set.

1. Elaboración del Gel de Agarosa al 2%. Se pesó 1.4 gr de agarosa, de solución buffer TBS al 5% se diluyeron 100 ml con 400 ml de agua bidestilada. De dicha mezcla se tomaron 70 ml para agregarlos a la agarosa y se calentó en microondas hasta disolver la agarosa. Se agregó 0.1 µl de bromuro de etidio por cada 10 ml de preparación. Se agregó a la cámara de electroforesis para que el gel solidificara, colocando previamente el peine para formar los pozos donde se aplicaron las muestras; se dejó enfriar a temperatura ambiente para conseguir la polimerización del gel y posteriormente se agregaron las muestras a estudiar.

2. Se agregaron 2 μl de colorante 0.25% Cianol-Xileno 30% Glicerol a 10 μl de muestra de amplificación. Ese colorante se homogeneizó con la muestra y se colocó en cada pozo un volumen total de 12 μl . Una vez aplicadas todas las muestras por gel se realizó el corrimiento de las mismas a una diferencia eléctrica de 70 mVolts. Durante 60 minutos. Se agregó por cada grupo de muestras estudiadas un control marcador de 100 pares de bases (“escalera”).
3. Se observó cada gel en el documentador de imágenes para geles de agarosa, observando las regiones específicas (exones) de cada muestra y control (33).

Interpretación.

En cada gel colocado en el documentador para geles de agarosa se observó la integridad genética de los exones estudiados en cada set. Con lo cual fue posible determinar la presencia y localización exacta de las deleciones encontradas en cada muestra (33).

RESULTADOS.

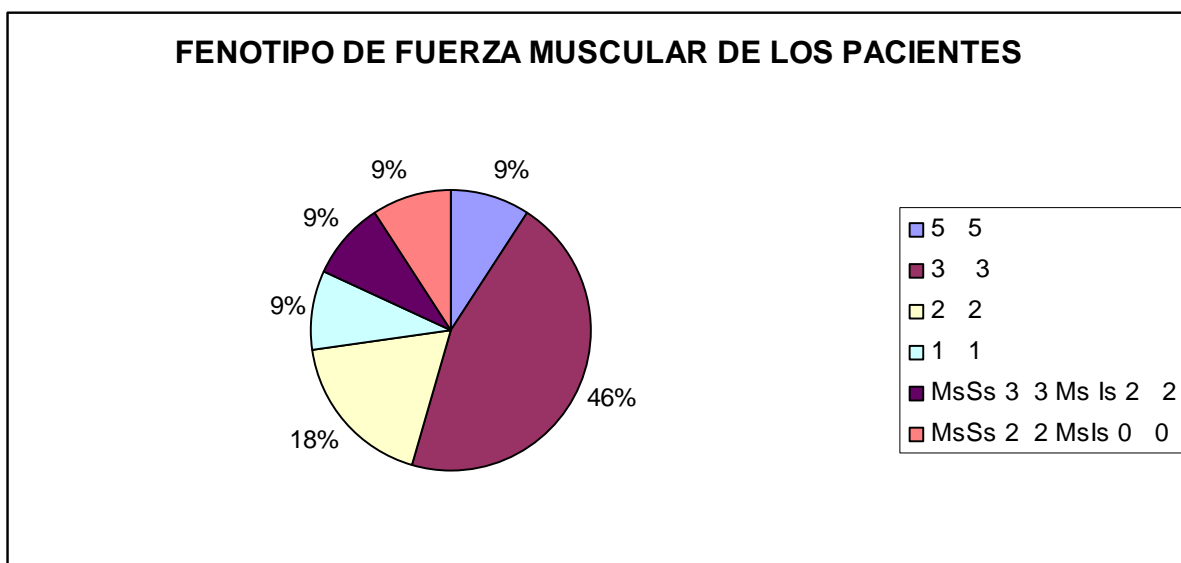
Fenotipo de los pacientes.

En la siguiente tabla se resumieron los datos más importantes de cada uno de los 11 pacientes que fueron seleccionados. Se consideran las iniciales, el número con el cual fue procesada su muestra en el laboratorio, la edad, los antecedentes de importancia, los niveles de CPK en Unidades por litro (U/L), y el fenotipo de fuerza muscular (FM) de acuerdo a la escala de examen manual muscular de Lovett de 5 puntos, correspondiendo el primer valor al hemicuerpo derecho y el segundo valor separado por la diagonal al hemicuerpo izquierdo.

FENOTIPO DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS

Nombre	No.	Edad	Antecedentes	Hipotonía al nacer	Desarrollo psicomotor	Edad de inicio de sintomatología	Dato Inicial	Signo de Gowers	Alteración de movimientos faciales	Disnea	Disartria	Reflejos osteotendinosos	Nistagmus	Pseudohipertrofia de músculos gemelos	Patron de electromiografía	Biopsia muscular positiva para deficiencia de distrofina	CPK UL	Fuerza Muscular
F.O.P.1	1	6 años	Tío materno finado con DMD	No	Normal	2 años 3 meses	Dificultad para la marcha	Positivo	Si	Si	No	Hiporeflexia	Si	Si	Miopático	Si	13,750	FM global 3/3
V.E.A	2	6 años	Hermano de 8 años con DMD	No	Normal	2 años	Dificultad para la marcha	Positivo	No	Si	No	Hiporeflexia	Si	Si	Miopático	Si	12,200	FM global 3/3
M.R.R	3	2 años	3 tíos maternos con DMD	No	Normal	1 año 9 meses	Dificultad para la marcha	Negativo	No	No	No valorable	Normal	No	No	No realizada	No realizada	5,450	Tono muscular y trofismo conservado
V.G.M.A	4	16 años	Hermano finado con DMD	No	Normal	5 años	Dificultad para la marcha	No valorable	No	Si	Si	Hiporeflexia	Si	Si	Miopático	No realizada	18,300	Silla de ruedas. FM global 2/2
O.B.J.R	5	16 años	Hermano de 8 años con DMD, 2 tíos maternos finados con DMD	No	Normal	2 años	Dificultad para la marcha	No valorable	Si	Si	No	Hiporeflexia	Si	Si	Miopático	Si	15,000	Silla de ruedas. FM global 1/1
P.F.A	6	8 años	Tío materno finado con DMD	No	Normal	4 años	Dificultad para la marcha	Positivo	No	No	No	Normal	No	Si	Miopático	No realizada	13,400	FM MsSs 3/3 MsIs 2/2
O.L.J.E	7	15 años	Hermano de 10 años con DMD	No	Retraso en el lenguaje	3 años	Dificultad para la marcha	No valorable	No	Si	No	Hiporeflexia	No	Si	Miopático	No realizada	14,400	Silla de ruedas. FM MsSs 2/2 MsIs 0/0
A.E.L.M	8	6 años	3 tíos maternos con DMD	Si	Retraso en sostén cefálico, sedestación, demabulación y lenguaje	6 meses	No hay sostén cefálico ni inicio de sedestación	Positivo	No	No	No	Normal	Si	Si	Miopático	No realizada	12,000	FM global 3/3
R.M.S	9	14 años	Ninguno	No	Normal	3 años	Dificultad para a marcha	No valorable	Si	Si	Si	Hiporeflexia	Si	Si	Miopático	No realizada	19,300	Silla de ruedas. FM global 2/2
A.D.E.I	10	11 años	Ninguno	Si	Normal	2 años	Dificultad para a marcha	Positivo	No	Si	No	Normal	Si	Si	Miopático	No realizada	17,350	FM proximal 2/2 distal 3/3
G.M.	11	4 años	Tío materno finado con DMD	No	Normal	3 años	Dificultad para a marcha	Positivo	No	No	No	Normal	No	No	No realizada	No realizada	560	FM global 3/3

Tabla 5. Fenotipo y evolución de los pacientes incluidos (no todos presentaron delección). Se especifica el número que fue asignado para cada muestra de DNA amplificada, la edad en años, los antecedentes de importancia para el padecimiento, los datos fenotipicos estudiados, los niveles sanguíneos de CPK en UI/L y el grado de afectación muscular de acuerdo a la escala de Lovett. DMD: Distrofia Muscular de Duchenne, FM. Fuerza Muscular, MsSs Miembros Superiores, MsIs Miembros Inferiores.



Gráfica 1. Número de pacientes con fenotipo de fuerza muscular (FM). Escala de Lovett. El primer número indica el hemicuerpo derecho y el segundo número el hemicuerpo izquierdo. 5/5: 1 paciente, 3/3: 5 pacientes, 2/2: 2 pacientes, 1/1: 1 paciente, MsSs 3/3 y MsIs 2/2: 1 paciente, MsSs 2/2 y MsIs 0/0: 1 paciente. (MsSs Miembros superiores, MsIS Miembros inferiores).

DELECCIONES ENCONTRADAS.

En las tablas siguientes muestran los exones amplificados con su respectivo número de pares de bases (pb) y posteriormente las deleciones encontradas mediante el uso del Kit MPCR para humanos DMD/BMD New Set I+II de maximbio™ en cada una de las muestras de DNA obtenidas de cada paciente.

Set I

Set II

Exon	Pb
45	547
48	506
17	481
19	459
51	388
8	360
12	331
44	289
4	196

Exon	Pb
P. E. M	535
3	410
43	312
50	271
13	238
6	208
47	181
60	139
52	113

Tabla 6. Exones amplificados por cada Set Kit MPCR para humanos DMD/BMD New Set I+II de maximbio™, los exones se ordenan decrecientemente de acuerdo al número de pares de bases que los componen. P.E.M: Promotor específico muscular. P.E.M: Promotor específico muscular.

DELECCIONES ENCONTRADAS EN LOS PACIENTES

No. De Paciente	Delección (exón)	
	SET I	SET II
6	45, 48	PEM, 3
7	45, 48	50
9	51	Sin delección
10	8,12	PEM, 13
11	19	Sin delección

Tabla 7. Pacientes que presentaron delecciones en el gen de distrofina. Se especifica el número de paciente estudiado y las delecciones encontradas en los exones en cada uno de ambos Set estudiados.

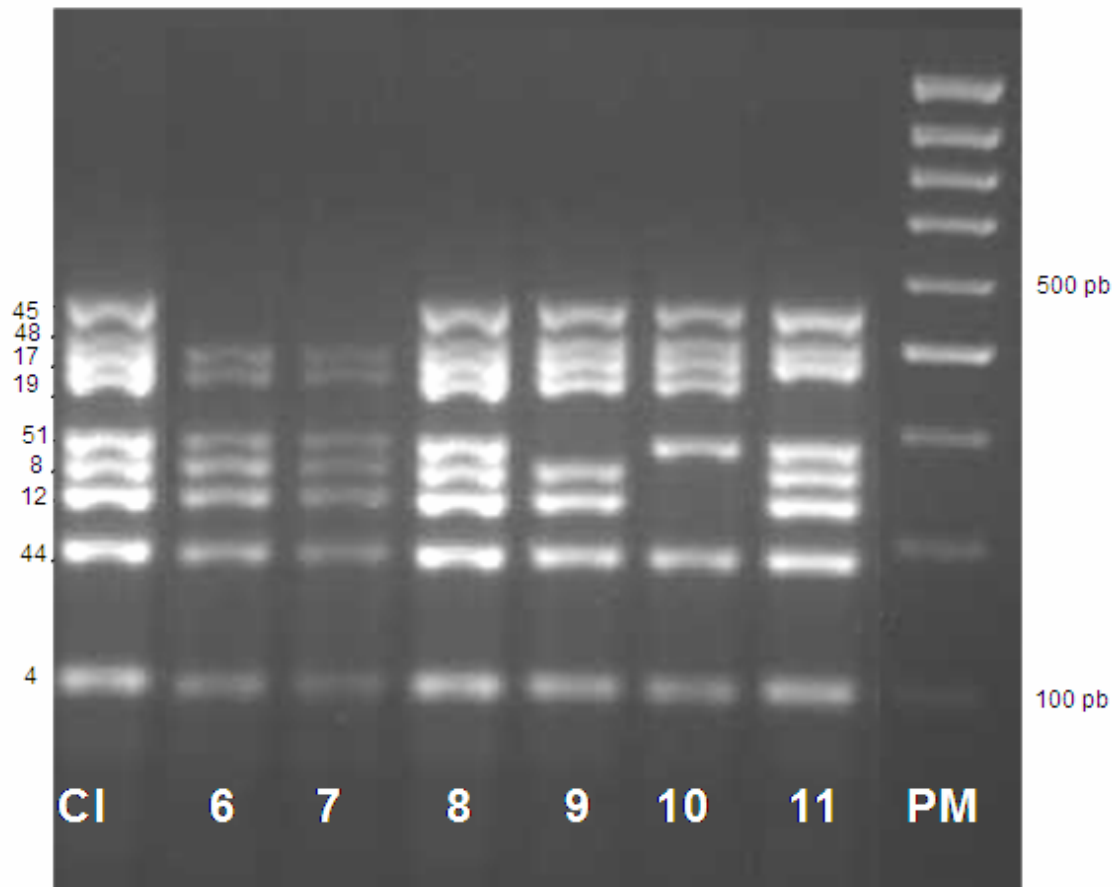


Figura 5. Gel de electroforesis para el Set I. Del lado izquierdo se muestran los exones estudiados, localizados en relación al número de pares de bases que los componen (ver tabla correspondiente). El paciente asignado con el número 8 no presenta delección en ninguno de ambos Set estudiados. En la fila inferior se enumeran cada uno de los pacientes que presentaron delección. CI. Control del Set I, PM. Marcador de peso molecular de 100 pb del lado derecho.

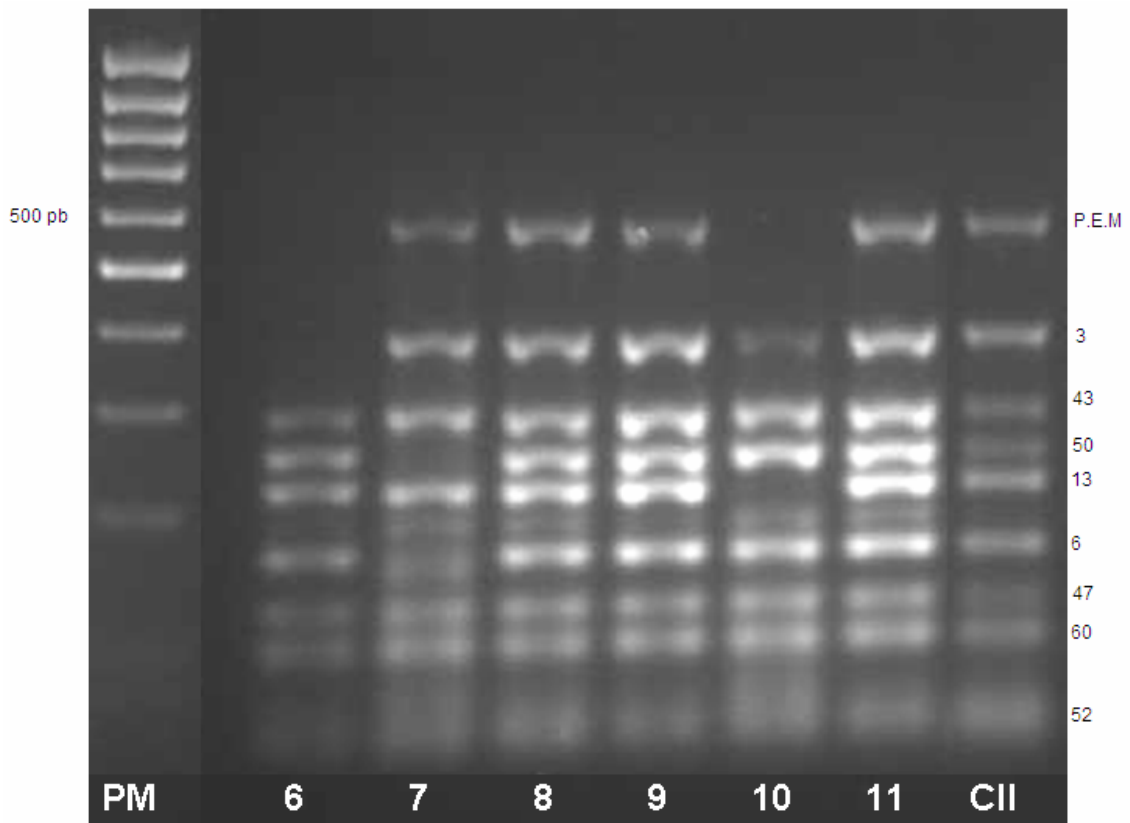


Figura 6. Gel de electroforesis para el Set II. Del lado derecho se muestran los exones estudiados, localizados en relación al número de pares de bases que los componen (ver tabla correspondiente). El paciente asignado con el número 8 no presenta deleción en ninguno de ambos Set estudiados. En la fila inferior se enumeran cada uno de los pacientes que presentaron deleción. CII. Control del Set II, PM. Marcador de peso molecular. P.E.M Promotor específico muscular.

DISCUSIÓN.

De los 11 pacientes que fueron seleccionados únicamente 5 presentaron delección en alguno de los 2 Set estudiados, lo cual corresponde al 45.45 % de la muestra, lo anterior concuerda con los hallazgos de la literatura internacional, ya que en este estudio únicamente se analizaron 18 de los 79 exones que conforman al gen de la distrofina, siendo los primeros los más frecuentemente encontrados delecionados en los pacientes con DMD/DMB, y de acuerdo a los reportes internacionales el 20% restante de las delecciones se encuentran distribuidas en todo el gen, lo cual genera un total de 65% de exones delecionados en los pacientes afectados por DMD/DMB. (16,17,20,24,29).

Destacando que todos los pacientes que fueron estudiados cubrieron los criterios clínicos para ser diagnosticados con distrofia muscular de Duchenne, no fue posible realizar una correlación directa entre los datos fenotípicos de los pacientes que fueron estudiados y la delección encontrada, ya que como se observa en la tabla I el grado de afectación es discretamente homogéneo entre los pacientes, desde las concentraciones de CPK que van de 13, 400 UI/L a 19, 300 UI/L, y particularmente en cuanto al grado de afectación muscular se observó que cada paciente se comporta de forma diferente. El paciente No. 6 presenta una fuerza muscular, de acuerdo a la escala de Lovett, en miembros superiores de 3/3 y en miembros inferiores de 2/2 y la delecciones que presenta son en los exones PEM, 3, 45 y 48, mientras que el paciente No. 7 presenta fuerza muscular en miembros superiores 2/2 y en inferiores 0/0 por lo cual utiliza silla de ruedas y presenta delecciones de los exones 45,48 y 50, y aun cuando las delecciones en ambos pacientes afectan el marco de lectura la repercusión fenotípica es diferentes, sin embargo es necesario considerar la edad de los mismos. Lo anterior ocurre con el resto de los pacientes de este estudio, en nuestro país no se han realizado otros estudios semejantes al que nosotros presentamos en donde el objetivo se centre en la correlación genotipo-fenotipo, nuestros resultados se correlacionan con los reportados por otros autores a nivel mundial, en donde a pesar de encontrar delecciones no es posible en todos los casos explicar el fenotipo observado (14,23,26,29). Diversos estudios en el mundo se orientan hacia la hipótesis del marco de lectura, ya que los pacientes que han estudiado presentan delecciones que afectan al marco de lectura con una progresión más destructiva de las fibras musculares, sin embargo existen reportes de pacientes con datos fenotípicos evidentes de DMD en los cuales no existe alteración del marco de lectura, es

aquí donde entran excepciones a la hipótesis previamente referida, siendo la explicación más aceptada hasta el momento el evento de salto de exón el cual hasta la fecha dicho mecanismo se encuentra muy poco entendido ya que puede ser generado por diversos factores (8,9,13,25,28). Con los resultados obtenidos es resulta necesario considerar que el fenotipo puede tener una relación más directa con la cantidad y la calidad de distrofina que se exprese en el tejido afectado como resultado tanto de la mutación que presente cada paciente así como la consideración de factores reguladores pretranscripcionales y postraduccionales. (14,15,18,28,30).

Finalmente es necesario considerar la edad de los pacientes que fueron estudiados en el presente trabajo ya que la progresión del fenotipo en base a la historia natural de la enfermedad varía considerablemente de acuerdo a la edad de cada paciente.

CONCLUSIONES.

Nosotros concluimos que las deleciones encontradas en este estudio se correlacionan con las reportadas a nivel internacional, localizándose preferentemente en los dos puntos calientes considerados mundialmente para DMD/DMB. No es posible realizar una correlación fenotipo – genotipo basándose únicamente en el defecto molecular estudiado, en este caso deleción, y la repercusión en el cuadro clínico, resulta necesario valorar primero la repercusión nivel traduccional para conocer el nivel de expresión de la distrofina y la calidad de la misma para posteriormente tener la posibilidad de una aproximación hacia la presentación fenotípica.

Es imprescindible identificar en nuestra población la forma en la cual otros mecanismos a nivel molecular influyen en el desarrollo del fenotipo ya que únicamente estudiando las deleciones se deja fuera a un considerable número de pacientes. Por lo anterior sugerimos considerar dichos mecanismos relacionados con el desarrollo de DMD/DMB para continuar generando el conocimiento de la presentación de ésta patología en nuestro país

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Guizar-Vazquez J. *Genética Clínica Diagnóstico y Manejo de las Enfermedades Hereditarias*. Manual Moderno, México, 2001 230-238.
2. Vainzof M, et al. Protein defects in neuromuscular diseases. *Brazilian Journal of Medical Biology Research*.2003;36(5): 543-553.
3. Coral-Vazquez R, et al. Pattern of Deletions of the Dystrophin Gene in Mexican Duchenne/Becker Muscular Dystrophy Patients: The Use of New Desegned Primers for the Analysis of the Major Deletion “Hot Spot” Region. *American Journal of Medical Genetics*. 1997;70:240-246.
4. Rando T. The Dystrophin-Glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle and Nerve*.2001;24: 1575-1594.
5. Coral-Vazquez R. *Estudio Molecular de Alteraciones en el Gen DMD Presentes en Familias Mexicanas con distrofia Muscular de Duchen/Becker*. Tesis Doctorado. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional departamento de Genética y Biología Molecular. 1995.
6. McKusick, V. A. OMIM [en línea] *Muscular dystrophy, duchenne type; DMD*. [9/30/2005] disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=310200>
7. Fai-man I, et al. A different spectrum of DMD gene mutation in local Chinese patients with Duchenne/Becker muscular Dystrophy. *Chinese Medical Journal*. 2006;119 (12): 1079-1087.
8. Emery E. The muscular dystrophies. *The Lancet*. 2002;359 (23): 687-693.
9. Dalkilic I, et al. Muscular dystrophies: genes to pathogenesis. *Current Opinion in Genetics and development*. 2003;13: 231-238.
10. Ehmsen J, et al. The dystrophinassociated Protein complex. *Journal of cell science*. 2002; 115: 2801-2803.
11. Muntoni F, et al. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurology*. 2003; 2: 731-740.
12. Annemieke A, et al. Entries in the leiden duchenne muscular Dystrophy mutation database: an Overview of mutation types and Paradoxical cases that confirm The reading-frame rule. *Muscle and nerve*. 2006; 34: 135-144.

13. Anderson J, et al. The involvement of oxidative stress in determining the severity and progress of pathological processes in dystrophin-deficient muscles. *Brain*. 2002; 125: 4-13.
14. Tidball J. Damage and inflammation in muscular dystrophy: potential implications and relationships with autoimmune myositis. *Current Opinion in Rheumatology*. 2005; 17:707 – 713.
15. O'Brien K, et al. Dystrophin and Muscular Dystrophy: Past, Present, and Future. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2001; 74: 75–88.
16. Jasmin J, et al. Multiple regulatory events controlling the expression and localization of utrophin in skeletal muscle fibers: insights into a therapeutic strategy for Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Physiology – Paris*. 2002; 96: 31–42.
17. Nudel U, et al. Alternative Promoters: Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) Gene. *Encyclopedia of life sciences*. 2005, 11:8-12.
18. Calvano S, et al. Detection of dystrophin deletion carries using FISH analysis. *Clinical Genetics*. 1997;52:17-22.
19. Deconinck N. Pathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy: Current Hypotheses. *Pediatric Neurology*. 2007; 36: 1-17.
20. Prior T. Experience and Strategy for the Molecular Testing of Duchenne Muscular Dystrophy. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2005;7(3):317-326
21. Niebrój-Dobosz I. The involvement of oxidative stress in determining the severity and progress of pathological processes in dystrophin-deficient muscles. *Acta Biochimica Polonica*. 2005; 52 (2): 449-452.
22. Fadic R. Cell surface and gene expression regulation molecules in dystrophinopathy: *mdx* vs. Duchenne. *Biology research*. 2005; 38: 375-380.
23. Kanagawa M, et al. The genetic and molecular basis of muscular dystrophy: roles of cell-matrix linkage in the pathogenesis. *Journal of Human Genetics*. 2006 51:915-926
24. Scott E, et al. Measurement in Duchenne muscular dystrophy: considerations in the development of a neuromuscular assessment tool. *Developmental Medicine and Child Neurology*. 2006, 48: 540–544.
25. Rafael J, et al. Dystrophin and Utrophin: Genetic Analyses of Their Role in Skeletal Muscle. *Microscopic research and technique*. 2000;48:155-166

26. Emery E. Muscular dystrophy into the new millennium. *Neuromuscular Disorders*. 2002; 12: 343–349.
27. Petrof B. Molecular Pathophysiology of Myofiber Injury in Deficiencies of the Dystrophin-Glycoprotein Complex. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*. 2002; 81 (Suppl): S162-S164.
28. Perkins K. The role of utrophin in the potential therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*. 2002;12: S78–S89.
29. Nowak K. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *European Molecular Biology Organization*. 2004; 5: 872-876.
30. Davies K, et al. Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) Gene. *Encyclopedia of life sciences*. 2005, 12:1-5.
31. Mingfu L. DNA: Methods for Preparation. *Encyclopedia of life sciences*. 2001, 12:1-3.
32. Henegariu O, et al. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *BioTechniques*. 1997, 23:504-511.
33. Chrambach, A. Gel Electrophoresis: One-dimensional. *Encyclopedia of life sciences*. 2001, 13: 5-8.

ANEXO 1

Búsqueda de deleciones en el gen de distrofina en pacientes masculinos pediátricos mexicanos diagnosticados con distrofia muscular de Duchenne/Becker.

Unidad de Investigación Médica en Genética Humana. Hospital de Pediatría CMNSXXI IMSS.

Investigador Responsable: Dr. Ramón M. Coral Vázquez. Tesista: Dr. Carlos A. Yam Ontiveros.

HOJA DE CAPTACION DE DATOS

Nombre: _____

No. de cédula: _____

Sexo: _____ Edad: _____

Domicilio: _____

Teléfono: _____

Edad de la madre: _____ Edad del Padre: _____

Consanguinidad: _____ Endogamia: _____

Otros familiares afectados: _____

Edad de inicio de primeros signos: _____

Tiempo de extensión de signos: _____

Con afección a: _____

Valoración cardiológica: _____

A la fecha del estudio: marcha independiente _____ silla de ruedas _____

Enzimas: _____

Datos de EMG: _____

Datos de biopsia muscular: _____

Estudio inmunohistoquímico: _____

Estudio genético molecular: _____

ANEXO 2

Búsqueda de deleciones en el gen de distrofina en pacientes masculinos pediátricos mexicanos diagnosticados con distrofia muscular de Duchenne/Becker.

Unidad de Investigación Médica en Genética Humana. Hospital de Pediatría CMNSXXI IMSS.

Investigador Responsable: Dr. Ramón M. Coral vázquez. Tesista: Dr. Carlos A. Yam Ontiveros.

CUESTIONARIO. Distrofia muscular de Duchenne/Becker.

INSTITUCION.- _____

FECHA.- _____

REGISTRO.- _____

Nombre.- _____

Edad.- _____

Fecha de nacimiento.- _____

Lugar de origen.- _____

Lugar de residencia.- _____

Dirección.- _____

Teléfono.- _____

Origen de 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 _____

Hablar _____

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 fáciles _____

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 (diplopia).- (no) (si), inicio _____

Alteración de movimientos faciales.- (no) (si), inicio _____

Dificultad para deglutir (disfagia).- (no) (si), inicio _____

Dificultad para hablar (disartría) .- (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 _____
 Mioglobinuria (orina roja asociada o no a mialgias).- (no) (si),
 inicio/describir _____
 Calambres.- (no) (si),
 inicio/localización _____
 Problema visual.- (no) (si), inicio _____
 Problema auditivo .- (no) (si), inicio _____
 Miotonia.- (no) (si),
 inicio/especificar _____

EXPLORACIÓN.-

Debilidad (distribución y grado).- _____
 Reflejos.- (normales) (anormales), especificar _____
 Respuesta plantar.- (normal) (anormal), especificar _____
 Sensibilidad.- (normal) (anormal), especificar _____
 Movimientos oculares.- (normal) (anormal), especificar _____
 Ptosis.- (no) (unilateral) (bilateral)
 Afección facial.- (no) (si)
 Alteraciones ortopédicas.- (no) (si), especificar _____
 Otros hallazgos.- _____

EMG.- (no realizada) (normal) (Miopática) (Neuropática)

CPK.- (no realizada) (normal) (anormal), _____

Biopsia Muscular (no realizada) (normal) (anormal) Fecha _____
 Músculo _____
 Institución _____
 No. de biopsia _____

Tratamiento (no) (si), especificar _____

Rehabilitación.- (no) (si) _____

Árbol genealógico:

ANEXO 3. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN	
Lugar y fecha	Unidad de Investigación Médica en Genética Humana. Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS México DF, en los meses de Junio a Diciembre de 2006.
Por medio de la presente autorizo que mi	Hijo (a)
participe en el protocolo de investigación titulado:	BÚSQUEDA DE DELECCIONES EN EL GEN DE DISTROFINA EN PACIENTES MASCULINOS PEDIÁTRICOS MEXICANOS DIAGNOSTICADOS CON Distrofia Muscular de DUCHENNE/BECKER.
Registrado ante el Comité Local de Investigación o la CNIC con el número:	2003-718-0024
El objetivo del estudio es	Identificar las deleciones en el gen <i>DMD</i> en pacientes masculinos diagnosticados clínicamente con Distrofia Muscular de Duchenne/Becker.
Se me ha explicado que mi participación consistirá en	Toma de muestra de sangre venosa periférica para la obtención de DNA el cual será amplificado mediante PCR específico para 18 exones del gen <i>DMD</i> .
Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes:	
<p>El Investigador Responsable se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento.</p> <p>Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento, en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto Mexicano del Seguro Social.</p> <p>El Investigador Responsable me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera hacerme cambiar de parecer respecto a mi permanencia de mi representado (a) en el mismo.</p>	
Nombre y firma de ambos padres o tutores o del representante legal	
Nombre, firma y matrícula del Investigador Responsable.	
Dr. Ramón M. Coral Vázquez	
Números telefónicos a los cuales se puede comunicar en caso de emergencia y/o dudas y preguntas relacionadas con el estudio:	