

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD AUTONOMA
METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD



CASA ABIERTA AL TIEMPO

ESTUDIO MOLECULAR DE LAS DISTROFIAS
MUSCULARES TIPO DUCHENNE Y TIPO BECKER
Y DETECCION DE PORTADORAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL
P R E S E N T A
ESPERANZA GABRIELA GUTIERREZ REYES

MEXICO, D. F.

DICIEMBRE DE 1996

U.A.M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

La maestría en Biología Experimental de la UAM-Iztapalapa está en el padrón de posgrado de excelencia de CONACyT y cuenta con el apoyo por medio del convenio PEPX/66/92

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Genética, en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, bajo la dirección de la Dra. Lorena Orozco Orozco.

Con mucho cariño para:

 Mi madre, la señora Ines por todo el amor, apoyo y comprensión que siempre me ha brindado.

 A mi esposo, José Luis por toda la paciencia, cariño, comprensión y tu gran colaboración para la realización de esta tesis.

 A mis tías Sara y Pola, mi eterno agradecimiento por el estímulo que siempre me han brindado para superarme intelectualmente.

 A mis hermanos, Rosario, Marcos, Miguel Angel, Martín, Armando y Marina y a sus esposas (os) por la confianza y el cariño que siempre me han demostrado.

 A mi padre, que aunque ya no este a mi lado siempre será un faro de luz en mi camino

AGRADECIMIENTOS

A mis maestros los Drs. Lorena Orozco Orozco, Hector Serrano y Rocio Ortiz por la dirección de esta tesis y su apoyo desinteresado. Por despertar en mí el interés a la investigación científica. Por su amistad y estímulo que siempre me brindaron.

A mi esposo por su apoyo y estímulo incondicional

A mis padres Cruz e Ines por su amor, ejemplo y confianza.

A mis compañeros de laboratorio y de generación por sus contribuciones en el desarrollo de este trabajo, especialmente a Manuel.

A mis asesores por sus observaciones en la revisión de esta tesis.

Al CONACyT por el apoyo económico que me brindo para realizar mis estudios de Maestría.

A Dan Green por la asesoría brindada.

A todos los que en algún momento me escucharon y me ayudaron a salir adelante,... GRACIAS.

Muy especial, para la Dra. Ma Concepción Gutiérrez R., por su gran apoyo, estímulo, paciencia y cuidado desde el momento en que la conocí.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	VI
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABLAS	XI
I. RESUMEN	XII
II. INTRODUCCION	1
1. Fisiología del músculo	1
II. Patología: Distrofia Muscular	10
Distrofia Muscular Duchenne	10
Distrofia Muscular Becker	12
Clonación del gen DMD	13
Distrofina	18
Isoformas de la distrofina	31
Mutaciones que afectan al gen DMD	36
Detección de portadoras y diagnóstico prenatal	41
OBJETIVOS	45
HIPOTESIS	46
MATERIALES Y METODOS	47
ESTRATEGIA GENERAL	47
I. Población objetivo	49
II. Historia clínica	49
III. Obtención de muestras	49
IV. Extracción de DNA	50
V. Cuantificación del DNA	50
VI. Síntesis de Oligonucleótidos	51
VII. PCR múltiple	53
VIII. Electroforesis en geles de agarosa	58
IX. Análisis de RFLPs	58
X. Electroforesis en geles de poliacrilamida	60
XI. Correlación Fenotipo-Genotipo	60
XII. Análisis Estadístico	60

RESULTADOS.....	61
I. Cuadro clínico	61
II. Creación de un banco de DNA	61
III. Detección de deleciones por M-PCR	62
IV. Detección de portadoras	77
V. Frecuencia de polimorfismos TaqI y XmnI en pacientes	80
VI. Frecuencia de RFLPs en madres de los casos indice.....	80
VII. Frecuencia de Recombinación	85
VIII. Asesoramiento Genetico	88
DISCUSION	93
Anexo 1	101
Anexo II . (Reactivos y Soluciones).....	103
REFERENCIAS	106

ABREVIATURAS

A. Adenina

aa. aminoácido

ADD. Agua destilada desionizada.

AP. Persulfato de amonio

b. bases

RCLB. Buffer de lisis para células rojas.

C. Citocina

cols. colaboradores

DAG. Glucoproteínas asociadas a Distrofina

DMD. Distrofia Muscular tipo Duchenne.

DMB. Distrofia Muscular tipo Becker.

DNA. Acido desoxirribonucleico

DO. Densidad óptica

DAP. Proteína asociada a distrofina

EDTA. ácido etilen- diamino tetracético.

F. forward

G. Guanina.

GCAT mix. mezcla de guanina, citocina, adenina y timina.

kb. Kilobases

kDa. Kilodaltons

mM. milimoles

M-PCR. Reacción en cadena de la polimerasa múltiple

MgCl₂ Cloruro de magnesio

nm. nanómetros.

pb. pares de bases.

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa.

R. Reverse

RFLPs. Fragmentos de restricción de longitud polimórfica.

RNA. Acido ribonucleico

mRNA. RNA mensajero

SDS. Duodecil sulfato de sodio

SSCP. Polimorfismos conformacionales de cadena sencilla.

T. Timina

TBE. Tris-borato-EDTA.

TE. Tris-EDTA

TEMED. N,N,N',N'-Tetrametiletlenodiamino.

V. Volts

μg . microgramos

μm . micrometros

μl . microlitros

WCLB. Buffer de lisis para células blancas.

LISTA DE FIGURAS

	página.
Figura 1	2
Figura 2	4
Figura 3	6
Figura 4	8
Figura 5	14
Figura 6	16
Figura 7	20
Figura 8	23
Figura 9	24
Figura 10	27
Figura 11	30
Figura 12	32
Figura 13	33
Figura 14	37
Figura 15	63
Figura 16	64
Figura 17	65
Figura 18	66
Figura 19	69
Figura 20	70
Figura 21	71
Figura 22	72
Figura 23	73
Figura 24	74
Figura 25	78
Figura 26	89
Figura 27	90
Figura 28	92

LISTA DE TABLAS.

	página.
Tabla 1	17
Tabla 2	25
Tabla 3	29
Tabla 4	40
Tabla 5	42
Tabla 6	52
Tabla 7	54
Tabla 8	55
Tabla 9	56
Tabla 10	57
Tabla 11	59
Tabla 12	68
Tabla 13	75
Tabla 14	76
Tabla 15	79
Tabla 16	81
Tabla 17	82
Tabla 18	83
Tabla 19	84
Tabla 20	86
Tabla 21	87

RESUMEN

Las distrofias musculares tipo Duchenne (DMD) y tipo Becker (DMB), son desordenes degenerativos del músculo esquelético, que se heredan de forma recesiva ligada al X. Se caracterizan por debilidad muscular progresiva, pseudohipertrofia de los gemelos y elevación de la creatininfosfocinasa (CPK). La DMD se presenta con una incidencia de 1 en 3,500 varones nacidos vivos, mientras que la DMB afecta a 1 en 30,000. Ambos padecimientos son ocasionados por mutaciones en el gen DMD, que se encuentra en el brazo corto del cromosoma X, en la banda Xp21. El gen consta de 79 exones y 2400 kb, siendo este el más grande de los descritos hasta el momento. El producto del gen es una proteína de 427 kDa denominada distrofina que forma parte del citoesqueleto, se localiza en la cara interna del sarcolema del músculo. Sus niveles más altos se encuentran en el músculo esquelético y cardíaco.

Varios autores han propuesto que las mutaciones que ocasiona DMD conducen a la falta de síntesis de la distrofina, mientras que en la DMB se genera una proteína con función residual.

En el gen de la distrofina, las deleciones se han localizado con mayor frecuencia en el extremo 5' y en el dominio que comprende los exones 44-55.

En la presente tesis se propuso: 1) Caracterizar las deleciones que afectan al gen DMD en pacientes diagnosticados clínicamente con DMD y DMB; 2) Determinar la frecuencia de las deleciones y su localización; 3) Detectar a las portadoras en las familias informativas; 4) Establecer si existe correlación entre el genotipo encontrado y el

fenotipo del paciente. La población objetivo esta constituida 56 pacientes con DMD, 5 pacientes con DMB y sus familiares de primer grado.

La extracción del DNA se realizo por el método de fenol-cloroformo. Se cuantificó en un espectrofotómetro con luz UV, la integridad se corroboró en un gel de agarosa al 0.8% . Para el análisis de las deleciones se empleo la técnica de PCR-M; se utilizaron 19 pares de iniciadores las cuales se dividieron en cuatro grupos de acuerdo al tamaño de los productos de la amplificación. Para la detección de portadoras se empleo el estudio de haplotipos detectando los polimorfismos intragénicos para las enzimas TaqI y XmnI (RFLPs). Se definió la frecuencia de los haplotipos pERT87.15-XmnI y pERT87.8-TaqI presentes en la población y se estableció la estrategia para la detección de portadoras.

El 54.1% de los pacientes presentó deleción en uno o varios exones, encontrandose una mayor frecuencia en la región central del gen que comprende del exón 44-55. De la eliminaciones encontradas en pacientes con DMD en el 80% de los casos ocasionó cambio del marco de lectura. El análisis de los polimorfismos se encontró que en el 54.1% de las madres fue heterocigota para alguno de los polimorfismos. El análisis de los haplotipos mostró que el 75.4% de la población fue informativa para la detección de portadoras.

De nuestro resultados concluimos que la estrategia utilizada permite la caracterización y el mapeo de las deleciones del gen y por otra parte la combinación del análisis de los RFLPs estudiados, tienen un alto potencial en la detección de portadoras.

fenotipo del paciente. La población objetivo esta constituida 56 pacientes con DMD, 5 pacientes con DMB y sus familiares de primer grado.

La extracción del DNA se realizo por el método de fenol-cloroformo. Se cuantificó en un espectrofotómetro con luz UV, la integridad se corroboró en un gel de agarosa al 0.8%. Para el análisis de las deleciones se empleo la técnica de PCR-M; se utilizaron 19 pares de iniciadores las cuales se dividieron en cuatro grupos de acuerdo al tamaño de los productos de la amplificación. Para la detección de portadoras se empleo el estudio de haplotipos detectando los polimorfismos intragénicos para las enzimas TaqI y XmnI (RFLPs). Se definió la frecuencia de los haplotipos pERT87.15-XmnI y pERT87.8-TaqI presentes en la población y se estableció la estrategia para la detección de portadoras.

El 54.1% de los pacientes presentó deleción en uno o varios exones, encontrándose una mayor frecuencia en la región central del gen que comprende del exón 44-55. De la eliminaciones encontradas en pacientes con DMD en el 80% de los casos ocasionó cambio del marco de lectura. El análisis de los polimorfismos se encontró que en el 54.1% de las madres fue heterocigota para alguno de los polimorfismos. El análisis de los haplotipos mostró que el 75.4% de la población fue informativa para la detección de portadoras.

De nuestro resultados concluimos que la estrategia utilizada permite la caracterización y el mapeo de las deleciones del gen y por otra parte la combinación del análisis de los RFLPs estudiados, tienen un alto potencial en la detección de portadoras.

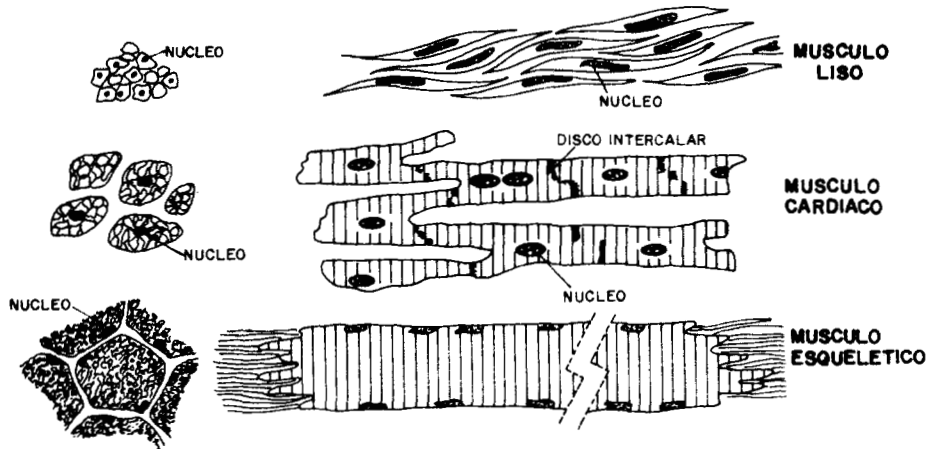
INTRODUCCION.

I. FISIOLOGIA DE MUSCULO.

Las principales funciones del cuerpo son producidas por la actividad muscular o tienen relación con ella. El movimiento es la manifestación más directa de esta actividad, aunque puede efectuarse trabajo muscular sin movimiento evidente como en la conservación del equilibrio. También interviene en la producción de calor corporal, en la circulación de la sangre, en la actividad de los sistemas nervioso, digestivo, respiratorio, etc. (1).

Aproximadamente el 40% del cuerpo está formado por el músculo esquelético o estriado, y el 10% por músculo liso y cardíaco. El tejido muscular está constituido por las fibras musculares, caracterizadas por la presencia de gran cantidad de filamentos citoplasmáticos (2). De acuerdo con sus características morfológicas y funcionales en los mamíferos se pueden diferenciar tres tipos de tejido muscular: 1) el músculo liso está formado por aglomerados de células fusiformes que no poseen estrias transversales. Sus contracciones son lentas y su control es involuntario; 2) el músculo estriado lo conforman haces de células cilíndricas muy largas y multinucleadas, que presentan estrias trasversales. Tienen contracción rápida, vigorosa y están sujetas a control voluntario y 3) el músculo cardíaco, que también presenta estrias transversales, está formado por células alargadas y ramificadas que se unen longitudinalmente a las células vecinas formando una red, estas fibras presentan contracción involuntaria, vigorosa y rítmica (Fig. 1)(3,4).

El músculo liso reviste el intestino, vasos sanguíneos etc., y tiene tipos similares de proteínas contráctiles, sin embargo no tiene una organización regular y aparece más uniforme al microscopio, este está formado por la asociación de células largas fusiformes dispuestas en capas que pueden tener una longitud de 80 a 200 μm , una red muy delicada de fibras reticulares y una capa de glicoproteínas (glicocalix). En el músculo liso también encontramos vasos y nervios que penetran y se ramifican entre las células (2-4).



CORTES TRANSVERSALES

CORTES LONGITUDINALES

FIGURA 1. Esquema que ilustra los tres tipos de músculo. Arriba, el músculo liso, en el medio el cardíaco, y abajo el músculo estriado. A la izquierda, el aspecto de estos tejidos vistos en cortes transversales y a la derecha en cortes longitudinales. Tomado de Junqueira 1993 (5)

La actividad contráctil característica del músculo liso está relacionada con la estructura y organización de los filamentos de actina y de miosina que contienen una trama de filamentos intermedios que constituyen una especie de matriz. En los puntos donde estos filamentos se unen a la membrana celular existen cuerpos densos y alargados que se unen unos con otros. La fibra lisa no posee sistema T y su retículo sarcoplasmático (regulador del flujo de calcio) es escaso. Las vesículas de pinocitosis son numerosas y están relacionados con la entrada y salida del ión calcio (3,4).

Las membranas (plasmalemas) de las células musculares forman uniones estrechas, que participan en la transmisión intercelular del impulso y mantienen la unión entre ellas (5).

El término estriado se debe al patrón microscópico de striaciones o bandas que resultan de la organización celular de proteínas contráctiles en dos tipos de filamentos. Dentro del músculo estriado existen grupos de células musculares o fibras largas, cilíndricas y multinucleadas que colectivamente son referidas como fascículo, estos están rodeados por vasos sanguíneos y tejido conectivo, y se insertan en los tendones (tejido conectivo especializado) en cada extremo del músculo. Dependiendo de la función del músculo, los fascículos y fibras tienen arreglos en varios patrones y por último se insertan a los huesos (Fig. 2). El músculo entero está envuelto por una capa de tejido conectivo llamada epimisio.

A los tabiques de colágena que penetran desde el epimisio al interior del músculo y que rodean a cada fascículo se les llama perimisio y al retículo que reviste cada fibra muscular endomisio. El tejido conectivo sirve para reunir las unidades contráctiles y permite cierta libertad de movimiento entre ellas. De tal manera que cada una es independiente de las otras. Aún más este tejido determina la distribución de los nervios y los vasos sanguíneos en todo el músculo y está asociado con el tipo de anclaje que los músculos necesitan para producir la tracción de los huesos y de otras partes móviles. Los vasos sanguíneos que irrigan al músculo esquelético transcurren por el perimisio y se ramifican para formar una abundante red capilar en torno a cada una de las fibras musculares (2-6).

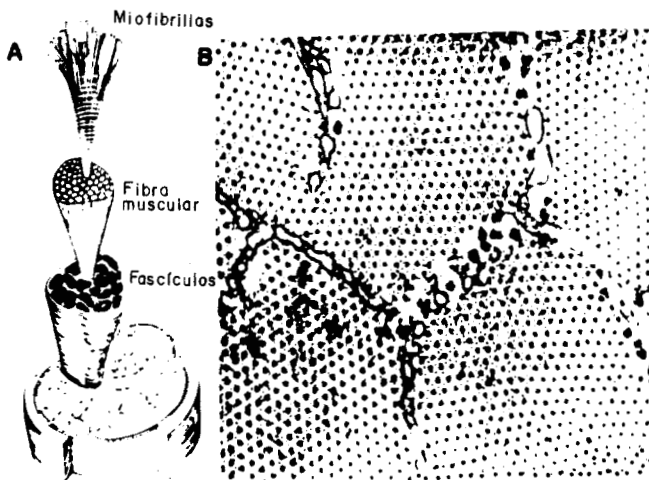


Figura 2. Estructura del músculo. A) Diagrama de un corte muscular mostrando su organización. B) Micrografía electrónica de varias miofibrillas rodeadas por retículo sarcoplásmico. Dentro de cada miofibrilla se observa un arreglo hexagonal de filamentos delgados y gruesos. (Tomado de Stein 1983).

En una sección longitudinal del músculo se observan bandas claras y densas. Las regiones densas se conocen como bandas A, contienen tanto filamentos delgados como gruesos y aparecen anisotrópicas al microscopio de luz. La región central de las bandas A se denomina como zona H. En contraste con las bandas claras denominadas bandas I aparecen isotrópicas y se asocian a la presencia de filamentos delgados. En el centro de la banda I hay una región densa: la línea Z que contiene proteínas como la alfa actinina y proporcionan puntos de unión para los filamentos delgados. La línea Z es la responsable del mantenimiento de los arreglos ordenados observados en el músculo estriado y sirve como marcador para definir la estructura básica del músculo, la sarcómera, con una longitud de 2 μm , que es la distancia entre una línea Z y otra (Fig 3) (1-5).

Dentro de cada fibra muscular hay un gran número de fibrillas (miofibrillas), con arreglos hexagonales de filamentos delgados y gruesos que están rodeados por una serie de túbulos conocidos como retículo sarcoplásmico, éste almacena y libera iones calcio para la contracción muscular. Existen evidencias de que complementa mentalmente la integración eléctrica de la fibra muscular e interviene en el cambio energético inherente a la contracción de la fibra. El sarcolema es una red de fibras reticulares y un revestimiento externo constituido por numerosas fibrillas de colágena, glucoproteínas y polisacáridos. El sarcoplasma está constituido por una matriz citoplásmica típica, miofibrillas, gran cantidad de aparato de Golgi y mitocondrias (1,2,6). El sarcoplasma contiene una proteína fijadora de oxígeno, la mioglobina, que cuando la necesidad de oxígeno aumenta se disocia y queda disponible para las oxidaciones (3-5).

Los núcleos de la célula muscular estriada son numerosos y dependen de la longitud del músculo, en mamíferos se localizan en la periferia de la fibra inmediatamente por debajo del sarcolema. Estos tienen 1 o 2 nucléolos y una cromatina moderadamente abundante. Hay un número pequeño de otros núcleos de forma alargada pero de cromatina más densa, que están en estrecha relación con la superficie de las fibras musculares. Tales núcleos pertenecen a las células satélite (células madre) que están aplanadas contra la fibra muscular.

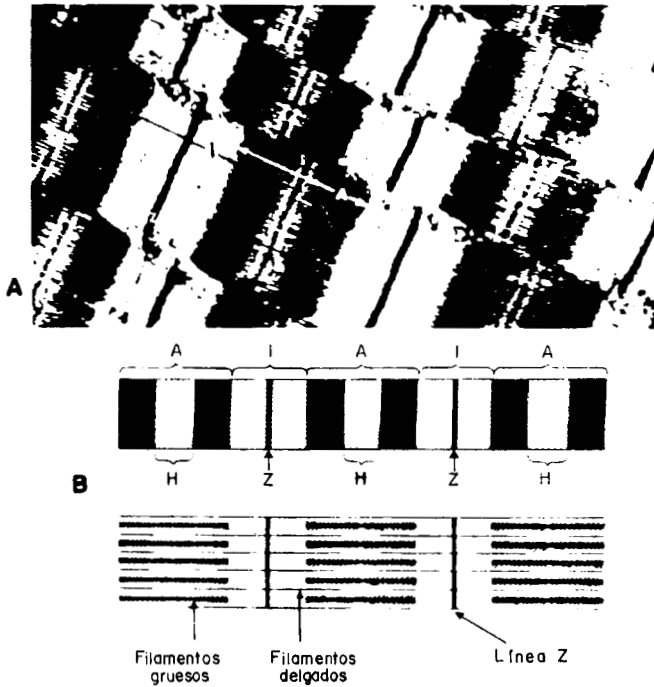


Figura 3. Corte longitudinal del músculo, donde se muestran sus características bandas claras y oscuras. A) Micrografía electrónica de un corte longitudinal del músculo esquelético de un conejo. Existe un patrón regular de bandas claras y oscuras en cada miofibrilla. B) Diagrama de filamentos delgados y gruesos dentro de una miofibrilla. La estructura básica es llamada sarcomera, que es la distancia entre una línea Z y la siguiente. (Tomado de Stein 1983)

Estas se fusionan a miofibras adyacentes durante el crecimiento postnatal y es una fuente de células para formación de músculo nuevo durante la regeneración muscular reparando o reemplazando miofibras dañadas (7). Las células satélite juegan un papel importante en el músculo esquelético posnatal, su función es proporcionar mionúcleos en el sitio que está estrechamente acoplado al crecimiento de la miofibra. En los músculos jóvenes, aproximadamente el 30% de los núcleos de la miofibra corresponden a las células satélite. Conforme se incrementa la edad del músculo su número disminuye, así en un músculo maduro representan únicamente del 2 al 5% (3,4,6-8).

La formación del músculo esquelético puede dividirse en cinco estadios: 1) conversión de las células mesenquimatosas indiferenciadas en mioblastos mononucleares que contienen un núcleo; 2) fusión de mioblastos, los cuales se dividen rápidamente y forman una colonia celular y posteriormente se fusionan y producen miocitos multinucleados y miotubos; 3) síntesis continua de miofilamentos e integración en miofibrillas, la formación del retículo sarcoplásmico y el sistema tubular transverso; 4) crecimiento de miotubos por asimilación de nuevos mioblastos y formación de miofibrillas adicionales y 5) inervación y organización funcional de actividad contráctil (3,5).

Cada fibra muscular contiene entre cientos y miles de miofibrillas constituidos por unos 1,500 filamentos gruesos de miosina y 3,000 filamentos delgados de actina, que son polímeros proteicos responsables de la contracción muscular (Fig. 4) (2-5).

El líquido del sarcoplasma contiene grandes cantidades de potasio, magnesio, fosfato y enzimas. También hay gran cantidad de mitocondrias situadas entre las miofibrillas, que indica la necesidad de grandes cantidades de ATP para la contracción. El retículo sarcoplásmico contiene una elevada concentración de iones calcio que son de gran importancia en el control de la contracción muscular. Los iones calcio se liberan continuamente y retornan a los túbulos sarcoplásmicos gracias a la actividad permanente de la bomba de calcio situada en las paredes del retículo sarcoplásmico.

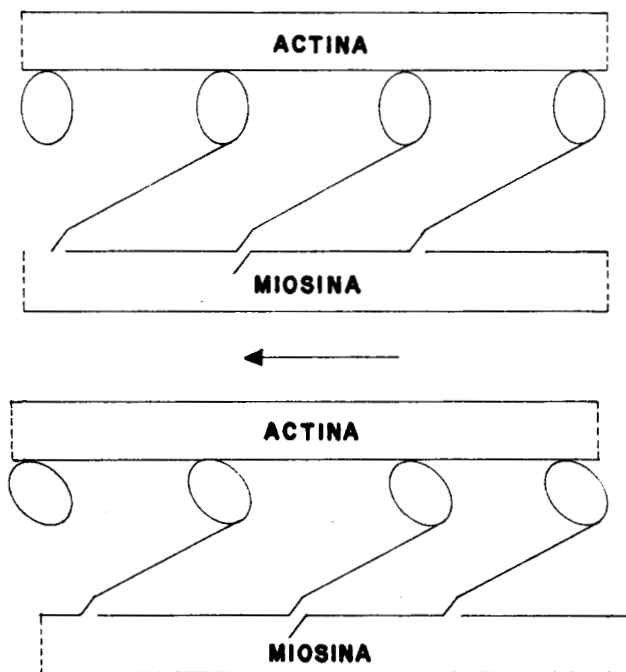


Figura 4. Esquema de la estructura de una miofibrilla. La contracción muscular ocurre por la rotación de la cabeza de miosina. Esta rotación puede producir un movimiento del filamento delgado que contiene a la actina con respecto al filamento grueso que contiene la miosina. (Tomado de Romer 1983)

Esta bomba puede concentrar hasta 10,000 veces los iones calcio en el interior del retículo donde se encuentra la calsecuestrina, una proteína fijadora de calcio (2-4,6,8,9)

Los filamentos gruesos tienen alrededor de 1.6 μm de longitud y están constituidas principalmente por moléculas de miosina. La miosina está compuesta de dos subunidades, una porción semejante a una varilla delgada, llamada meromiosina ligera, con un peso molecular de 150 kDa que forma el tallo de la molécula y confiere estructura al filamento y un fragmento más corto y globular conocido como meromiosina pesada, con un peso molecular de 340 kDa. La meromiosina pesada puede ser dividida enzimáticamente en dos fragmentos: S1 y S2 se puede proyectar fuera del filamento y hacer uniones o enlaces cruzados con la molécula de actina en los filamentos delgados (2-4). Estos últimos tienen de longitud alrededor de 1 μm , contienen tres proteínas: actina, tropomiosina y troponina. La actina se encuentra en mayor cantidad y es una molécula globular con un peso molecular de 50 kDa y, está arreglada en forma de doble hélice (2).

II. PATOLOGIA: Distrofia Muscular

Dentro de las patologías del músculo se encuentran las distrofias musculares que son un grupo de enfermedades que afectan al músculo esquelético y se caracterizan por debilidad muscular progresiva, pseudohipertrofia de los gemelos, histología miopática degenerativa y elevación de la creatinincinasa (CPK)(8,10-15). Existen un grupo de distrofias que se heredan de forma recesiva ligada al cromosoma X y se clasifican de acuerdo con la severidad de sus manifestaciones clínicas en tipo Duchenne(DMD) y tipo Becker (DMB), siendo la primera la más severa (12-15).

En la década de los 50s, Duchenne estableció los criterios diagnósticos que permitieron distinguir a las DMD/DMB de otras enfermedades neuromusculares y en 1980 el gen responsable fue identificado por clonación posicional (12,16).

La DMD es el padecimiento muscular más común en el hombre, se presenta con una incidencia de 1 por cada 3,500 varones nacidos. La DMB es menos frecuente, y afecta a sólo 1 por cada 30,000 (15-17). Ambos padecimientos son ocasionados por mutaciones en el mismo gen (gen DMD) y se estima que una tercera parte de los casos son mutaciones de novo (8,10,12,16,18).

Distrofia Muscular Tipo Duchenne

La DMD se manifiesta alrededor de los 2 años de edad en forma progresiva de tal manera que a la edad de 4-5 años pueden tener dificultad para subir las escaleras y elevarse del suelo a una posición erecta (signo Gowers); la caminata se hace anormal (marcha de pato) y la capacidad para brincar está severamente alterada, la mayoría de los pacientes pierden la deambulaci3n entre los 7 y 13 años de edad (8,12,19-21).

Cerca del 20% de los pacientes presentan retraso mental y el 30% tiene alguna forma de desequilibrio intelectual. El músculo liso o cardiaco está también afectado causando cardiopatía que se caracteriza inicialmente por taquicardia sinuosa débil y electrocardiografía

anormal (EKG). El compromiso del músculo liso es menos aparente, pero puede causar malestar gastrointestinal, dilatación gástrica aguda o retención urinaria. En la mayoría de los pacientes la muerte sobreviene por insuficiencia respiratoria o cardíaca generalmente durante la segunda o tercera década de la vida (8,10-12,14,22).

El fenotipo DMD se asocia con rearrreglos gruesos del gen en el 65% de los casos y pequeñas mutaciones (principalmente mutaciones puntuales) que pueden ocasionar la terminación prematura de la traducción o ausencia de proteína (19,23-27).

En los últimos años el diagnóstico de los pacientes con DMD y DMB involucra el análisis de DNA para determinar la naturaleza de la mutación y/o el análisis de proteínas para determinar la calidad y la cantidad de distrofina en biopsias musculares y en sangre periférica. Antes del desarrollo de pruebas de diagnóstico molecular, el diagnóstico se confirmaba por determinación de los niveles séricos de CPK, por histología muscular, y por electromiografía (EMG) (8,12,21).

En estos pacientes los niveles de CPK sérico se encuentran elevados de 50 a 100 veces del nivel normal por el escape de la isoforma muscular del sarcoplasma al torrente sanguíneo. Aunque otras enzimas sarcoplásmicas están elevadas en estados tempranos de la enfermedad, la CPK es la más confiable para el diagnóstico. Existen otras enfermedades como la Rabdomiolisis y el Hipotiroidismo que pueden estar asociadas con niveles muy altos de CPK, sin embargo estas condiciones pueden ser fácilmente diferenciadas por criterios clínicos (8,28).

La CPK se encuentra elevada al nacimiento en la DMD y la DMB, pero la alta frecuencia de niveles altos en neonatos normales hace que la determinación en sangre del cordón umbilical sea incierto para la evaluación del diagnóstico. Al final de la primera semana el rango normal es menos variable, así que un valor alto en este tiempo puede ser diagnóstico de enfermedad muscular (8,14). La medición de CPK en portadoras no es confiable ya que en algunas mujeres portadoras los valores están dentro del intervalo normal (14,28).

La histología muscular muestra evidencia de degeneración y regeneración de fibras musculares, se puede observar necrosis de fibras y fagocitosis y en estadios finales hay una imagen de degeneración por el reemplazamiento del músculo por tejido graso y conectivo (9,14,15,17,29,30). Las membranas deficientes en distrofina, la degeneración tiene una discontinuidad, en ciertas condiciones la entrada de Calcio intracelular ocasiona la destrucción de miofibrillas, esta degeneración es precedida por fibrosis muscular predominantemente por colagéna tipo III involucra el endomisio y perimisio. La fibrosis puede ser evidente en estados tempranos y progresa con la enfermedad (29,30).

La EMG es característica de un patrón miopático, con una reducción en la duración y amplitud de los potenciales de acción y una frecuencia incrementada de potenciales polifásicos (12).

DISTROFIA MUSCULAR TIPO BECKER.

La distrofia muscular tipo Becker, se diferencia de la DMD en la edad de inicio de los síntomas y la progresión de la enfermedad. La diferencia aceptada a nivel internacional es que los pacientes con DMB permanecen ambulatorios hasta los 16 años y en algunos casos los pacientes pueden llevar una vida normal hasta los 40 o 50 años (10,11,20,21,31). El dolor muscular relacionado al ejercicio es una prominente característica importante de DMB. En este grupo de pacientes no se presenta retraso mental. La imagen física se asemeja a DMD, con una combinación de debilidad, una tendencia a la marcha de pato y pseudohipertrofia muscular. Los estudios de laboratorio son similares, incluyendo elevación de CPK y cambios miopáticos en EMG. Las características de las biopsias musculares son un poco diferentes, aunque se observan variaciones en el tamaño de las fibras, fibrosis muscular, necrosis y basofilia (8,12). El 85% de los casos con DMB, se asocia con mutaciones que conservan el marco de lectura traduccional, sin embargo existe una reducción en la calidad y/o cantidad de la distrofina (32)

CLONACION DEL GEN DMD

El gen DMD fue uno de los primeros que se clonó por “genética reversa” o “clonación posicional” donde el conocimiento de la posición en el cromosoma fue el factor crítico. El locus DMD se encuentra en el brazo corto del cromosoma X, en la banda 21 (Xp21) (10,12,17). Las primeras evidencias de su localización fueron obtenidas a partir de translocaciones balanceadas entre un autosoma y el cromosoma X t(X;21) en mujeres con fenotipo DMD, análisis de ligamiento genético en familias con DMD y DMB con sondas de DNA del cromosoma X humano que detectan fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs, son usualmente reconocidos debido a la variación en secuencias de nucleótidos en sitios específicos para enzimas de restricción) y por deleciones genéticas contiguas en hombres con fenotipos complejos (8,12,14,16).

La localización del gen en Xp21 fue confirmada por análisis molecular de un paciente masculino (B.B.) con una deleción visible citogenéticamente en el cromosoma X que incluía la banda p21(33). El paciente BB estaba afectado por 5 padecimientos ligados al cromosoma X: DMD, retraso mental, retinitis pigmentosa (RP), enfermedad granulomatosa crónica (CGD) y fenotipo de Mc Leod (XK) (Fig. 5). Para obtener sondas DMD intragénicas se utilizaron dos estrategias experimentales; una de éstas fue la hibridización diferencial del DNA genómico de individuos normales y del paciente B.B. para enriquecer las secuencias de DNA deletadas en este paciente mediante la técnica de reasociación por emulsión con fenol (pERT). Con esta estrategia se lograron aislar 7 clonas pERT, y su clonación generó una genoteca con secuencias 20 veces enriquecidas de la deleción en Xp21, una de estas fue pERT87 (DXS164) (34). Con estas sondas se encontró deleción aproximadamente en el 9% de los hombres con DMD. La segunda estrategia fue a partir de translocaciones raras del cromosoma 21 con Xp21, aislando una clona genómica pXJ (DXS206) que se encontró además deletada en algunos pacientes (8,12,14,16).

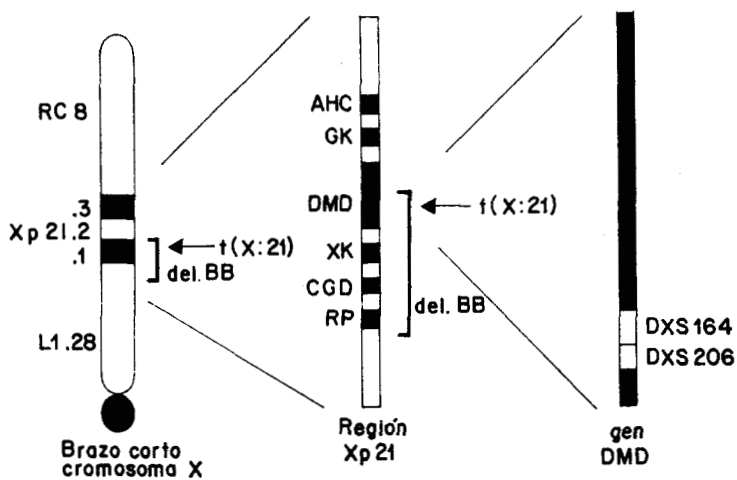


Figura 5. Esquema del brazo corto del cromosoma X, mostrando la posición de los marcadores RC8 y L1-28 relativos a Xp21. La región Xp21 expandida, muestra la posición relativa de los genes AHC, GK, DMD, XK, CGD (Deficiencia del complejo glicerol cinasa) y RP. Además muestra la posición de la delección del paciente BB y el punto de intercambio en un hombre afectado. (Tomado de Scriver 1995)

Los primeros datos de mapeo del locus DMD fueron las translocaciones balanceadas entre un autosoma y un cromosoma X en mujeres con DMD. En cada caso el punto de intercambio en el cromosoma X fue en la banda 21, sugiriendo que el gen involucrado en la distrofia muscular esta localizado en esta posición. En todos los casos el cromosoma X normal fue el inactivo en la mayoría de las células, proporcionando una explicación de la enfermedad en mujeres heterocigotas (8,12,21). La clona pERT87 fue el punto de inicio de una caminata cromosómica de 220 kilobases (kb) usando genotecas de fagos recombinantes. Independientemente varios investigadores aislaron otras secuencias específicas para Xp21 (DXS 206) a partir de una translocación cromosómica en un paciente femenino con DMD (8,12,16). El mapeo reveló que el extremo 5' del gen se encuentra en el locus DXS142 y el extremo 3' se extiende significativamente hacia el telómero (DL66.6) y se dedujo la dirección de la transcripción de centrómero a telómero (16). Las clonas de cDNA se utilizaron como sondas para detectar deleciones en el DNA genómico de los pacientes. Estos cDNA fueron denominados 1-2a, 2b-3, 4-5a, 5b-7, 8 y 9-14 de acuerdo con su posición a lo largo del mRNA (Fig. 6).

Koenig y cols. (16) utilizaron el fragmento pERT87 para aislar la secuencia codificadora completa (cDNA). Demostraron que el gen DMD consta de 79 exones y 2,400 kb, siendo este el más grande descrito hasta ahora. Este gen es equivalente al 0.05% del genoma humano y al 1% del DNA del cromosoma X. Contiene al menos cinco promotores que regulan la expresión de tres isoformas de la distrofina: una de 427 kDa y dos pequeñas proteínas de 71 kDa (DP71) y 116 kDa (DP116) (12,35-37). La alta frecuencia de recombinación intragénica y su acelerada mutación están relacionadas con el tamaño del gen y explica la presencia mutaciones nuevas en una tercera parte de los casos de DMD (8,12).

En la tabla 1 se enlistan los exones y los fragmentos que contienen los exones liberados por la digestión con la enzima de restricción Hind III, ya que éstos han sido extensivamente usados en la caracterización del gen. Además presenta el tipo de limite en el extremo 3' de cada exón.

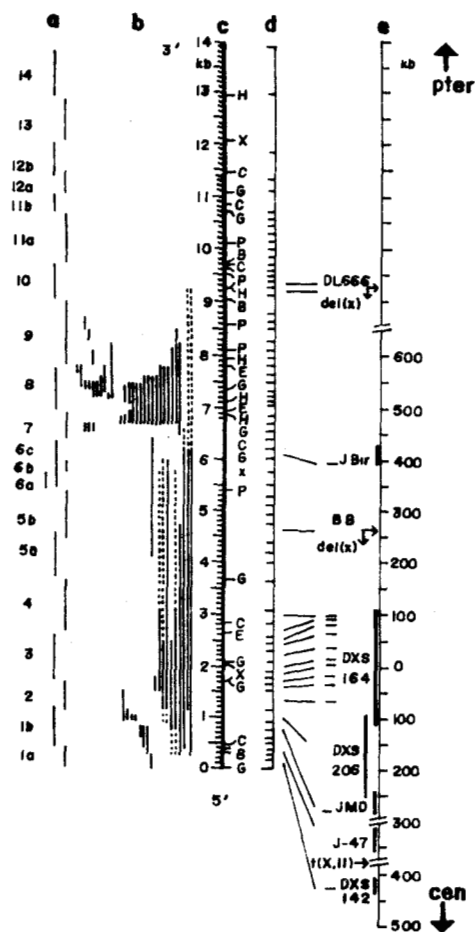


Figura 6. Representación esquemática del locus DMD y su cDNA. De izquierda a derecha: a) Fragmentos de cDNA usados como sondas; b) Extensión de 53 deleciones en DMD relacionados con el mapa de cDNA; cada línea representa una deleción; las líneas punteadas indican deleciones con puntos de rompimiento incierto analizados con sondas genómicas de Xp21; c) mapa de restricción del cDNA; d) proporciones del DNA detectando un solo fragmento genómico por digestión con HindIII. Cuando la posición del fragmento HindIII puede estar relacionada con el locus genómico se indica por una línea hacia el mapa genómico. Las líneas horizontales indican la localización precisa de las secuencias codificantes; e) mapa físico genómico: las barras negras indican secuencias clonadas; cen, dirección hacia el centrómero y pter dirección hacia final del brazo corto. Tomado de Koenig 1987

TABLA 1. Estructura de los exones en el gen de la Distrofina Humana.

Exón	Dominio	Extremo 5'	Marco	Longitud pb	Hind III	Exón	Dominio	Extremo 5'	Marco	Longitud pb	Hind III
1	UTR, N	-37	---	277	3.2	41	R15	5948	3	183	"
2	N	240	1	62	3.25	42	R16	6131	3	195	4.2
3	N	302	3	93	4.2	43	R16	6326	3	173	11
4	N	395	3	78	8.5	44	R17	6499	2	148	4.1
5	N	473	3	93	3.1	45	R17	6647	3	176	0.5
6	N	566	3	173	8.0	46	R18	6823	2	148	1.5
7	N	739	2	119	4.6	47	R18	6971	3	150	10
8	N,H1	858	1	182	7.5	48	R19	7121	3	186	1.2-3.8
9	H1	1040	3	129		49	R19	7307	3	102	1.6
10	H1,R1	1169	3	189	10.5	50	R19,H3	7409	3	109	3.7
11	R1	1358	3	182		51	H3,R20	7518	1	233	3.1
12	R2	1540	2	151	4.2 (3.9)	52	R20	7751	3	118	7.0
13	R2	1691	3	120	6.6	53	R20,R21	7869	1	212	7.8-1.0
14	R2,R3	1811	3	102	2.7	54	R21	8081	3	155	8.3
15	R3	1913	3	108		55	R22	8236	2	190	2.3
16	R3	2021	3	180	6.0	56	R22	8426	3	173	8.8
17	H2	2201	3	176	1.7	57	R23	8599	2	157	1.0
18	R4	2377	2	124	12	58	R23,R24	8756	3	121	6.0
19	R4	2501	3	88	3.0	59	R24	8877	1	269	"
20	R4,R5	2589	1	242	7.3	60	R24,H4	9146	3	147	3.5
21	R5	2831	3	181	11	61	H4	9293	3	79	6.6
22	R6	3012	1	146	20	62	H4	9372	1	61	2.8
23	R6	3158	3	213	"	63	H4	9433	2	62	12
24	R7	3371	3	114	"	64	H4	9495	1	75	2.4
25	R7	3485	3	156	"	65	CYS	9570	1	202	2.5
26	R8	3641	3	171	5.2	66	CYS	9772	2	85	2.0
27	R8	3612	3	183	5.2	67	CYS	9858	1	157	1.4
28	R9	3995	3	135	11	68	C	10016	3	167	6.6
29	R9	4130	3	150	"	69	C	10183	2	111	"
30	R10	4280	3	162	4.7	70	C	10295	3	136	1.5
31	R10	4442	3	111	18	71	C	10432	2	39	"
32	R11	4553	3	174	"	72	C	10471	2	66	2.0
33	R11	4727	3	156	"	73	C	10537	2	66	1.9
34	R12	4883	3	171	1.8	74	C	10603	2	159	2.4
35	R12	5054	3	180	0.4	75	C	10762	2	244	10
36	R13	5234	3	129	1.3	76	C	11006	3	124	"
37	R13	5363	3	171	1.5	77	C	11130	1	93	2.0
38	R14	5534	3	123	6.1	78	C	11223	1	32	3.0 (3.4)
39	R1412	5657	3	138	"	79	C,UTR	11255	3	2703	6.0 7.8
40	R15	5795	3	153	6.2						

El tipo de límite intrón-exón es definido como 1, 2 o 3 dependiendo de si el extremo del exón termina con el primer, segundo o tercer nucleótido del codón. La información del tipo de límite es valorable para determinar si una deleción de exón o un grupo de exones causan cambios en el marco de lectura en el mRNA (38)

DISTROFINA

El gen DMD codifica para una proteína denominada distrofina (39-40). Mediante el uso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se detectaron transcritos del gen de la distrofina en un rango de células y tejidos que pueden clasificarse en cuatro grupos (39) :

- 1.- Músculo esquelético y cardiaco con los niveles más altos.
- 2.- Músculo liso con 5-10 % con respecto al grupo 1.
- 3.- Cerebro, riñon y pulmón con 1-2 %, y
- 4.- Fibroblastos con menos de 0.05%.

Se considera que la distrofina es un componente menor del músculo esquelético, representa únicamente el 0.002% de la proteína muscular total. Sin embargo, parece ser un componente principal de la red del citoesqueleto subsarcolémico en el músculo esquelético (8,14,20,41).

Las investigaciones de los posibles sitios específicos de la maduración ““splicing”” (corte y empalme) del mRNA habiendo ocho variantes de distrofina humana, muestran que todas estas variantes involucran diferentes procesamientos en las regiones que codifica para el extremo carboxilo terminal de la distrofina. La abundancia relativa de cada forma varía de manera tejido-específica. Además la expresión del gen DMD es regulada durante la diferenciación del músculo esquelético (35,42,43). La regulación del gen es muy compleja y puede ser miembro de una familia de genes relacionados presentes en el genoma (10).

La distrofina está ausente en niños con DMD, en el ratón *mdx*, y en perros con distrofia muscular canina ligada al X (15,44-46). Esta ausencia es claramente responsable de

la enfermedad. La secuencia del cDNA condujo al reconocimiento de secuencias similares en alfa-actina y beta-espectrina, identificando a la distrofina como un miembro de la superfamilia de las espectrinas que son proteínas de citoesqueleto (14,40,47-49)

La isoforma de 427 kDa de la distrofina está asociada con la membrana del músculo y otros tejidos excitables como el cerebro, evidentemente se requiere para la preservación de su estructura después del stress mecánico, consta de 3,685 residuos de aminoácidos separados en cuatro dominios estructuralmente diferentes (12,21,32,34,35,47):

1) dominio de unión a la alfa actina de 240 aminoácidos, localizado en el extremo amino-terminal. Tiene una secuencia homóloga al dominio de unión a la actina de la alfa-actinina; 2) un dominio rod en triple hélice en forma de varilla de 2802 (278 a 3080) aminoácidos y una longitud de 125 nanómetros (nm) compuesta de 25 regiones con cuatro "regiones en bisagra" que le dan flexibilidad a la molécula y son similares a los dominios ricos en prolina de la espectrina; 3) dominio rico en residuos de cisteína, de 280 aminoácidos (aminoácidos 3080 a 3360) parcialmente homólogo al extremo carboxilo terminal de alfa actinina que contiene dos sitios de unión a calcio y 4) un dominio carboxilo terminal de 420 aminoácidos, que interactúa con la membrana plasmática, al de la Utrofina o DRP codificada por un gen localizado en el cromosoma 6 (Fig. 7) (12,15,50). La proteína tiene homología con alfa actinina y espectrina (49), y contribuye a la elasticidad de la membrana. (15,51,52)

Formas mutantes de distrofina con ausencia del dominio rico en cisteína y el dominio unión a la actina, resulta en fenotipo DMD (52,53). Se considera que el dominio en forma de varilla de la distrofina es evolutivamente el resultado de una duplicación genética (49).

La distrofina forma parte de la red citoesquelética situada en el lado interno de la membrana, siendo parte de un complejo proteico asociado a ella (12,15,22,40,48,53)

El arreglo preciso de la distrofina en la membrana plásmatica no está claro, pero la microscopía electrónica sugiere que el dominio de varilla es de 15 a 20 nm localizado en la cara citoplasmática de la membrana del sarcolema con el extremo carboxilo terminal encerrado en la membrana.

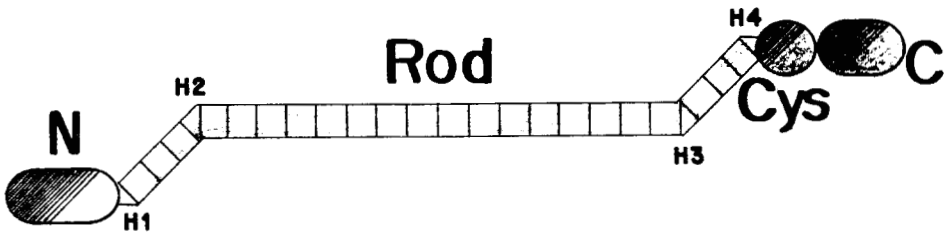


Figura 7. Diagrama de la molécula de distrofina: los cuatro dominios, son el dominio amino terminal (N), el dominio en forma de varilla semejante a la espectrina (rod), dominio rico en cisteína (Cys) y el dominio carboxilo terminal (C). Además se muestran las cuatro regiones "bisagra" (H1,H2,H3 y H4).(Tomado de Screiver 1995)

El análisis con anticuerpos marcados con oro mostró una distancia de 120 a 125 nm de una distrofina a otra tanto en dirección longitudinal como transversal, lo que sugiere que las moléculas pueden estar asociadas por los extremos (53,54). La naturaleza bidimensional del patrón sugiere un modelo de enrejado similar al propuesto por Koenig y Kunkel, donde las moléculas se alinean en dímeros antiparalelos de manera análoga a la alfa-actinina y espectrina y se unen en los extremos para formar un arreglo de panal hexagonal. Estudios realizados de secciones longitudinales o intactas de fibras han demostrado que las moléculas de distrofina en músculo no se distribuye uniformemente, pero forman una red asociada al aparato contráctil en el que se sustentan. La localización de la distrofina con respecto a la beta espectrina en secciones longitudinales reveló una concentración de ambas moléculas sobre la banda Z, sugiriendo que junto con la vinculina pueden funcionar como enlace al aparato contráctil del sarcolema. Un patrón similar se observa en una sola fibra, que revela una red de anillos transversos densos (costámeros) sobre las bandas Z con conexiones longitudinales muy finas. Este patrón no se encontró cuando se bloqueó la presencia de mionúcleos en la membrana, así que la distrofina es claramente una parte de la elaborada red del citoesqueleto asociada con cada sarcomera. Estudios recientes además han demostrado una elevada concentración de distrofina en las uniones neuromusculares y miotendinosas (8,24,51).

Poco tiempo después del descubrimiento de la distrofina, tanto la proteína como el mRNA se detectaron en extractos de cerebro. En el cerebro normal del ratón, la distrofina es más abundante, encontrándose en el soma y las dendritas de la neuronas, pero en menor cantidad en los axones de las células de Purkinje y en corteza cerebral y cerebelar (8,39)

La expresión de la distrofina en el cerebro es muy compleja por la existencia de diferentes isoformas de distrofina generadas por "splicing" alternativo y por el uso de diferentes promotores (12,39,55). Así la corteza cerebral es asociada con una función cognitiva y el cerebelo con la coordinación motora, lo que permite especular que la falta de distrofina en el cerebro es responsable del déficit intelectual en niños afectados (52).

En el sistema nervioso periférico, se encuentra una isoforma corta que está localizada a lo largo de la membrana de la células de Schwann (8,12,43).

En el desarrollo del feto, la distrofina se distribuye en el citoplasma del músculo esquelético con altas concentraciones en las uniones miotendinosas. Esta proteína al parecer es mucho más pequeña en tamaño que la del adulto y su cantidad se incrementa a lo largo de la gestación (39,42).

La estructura molecular inferida de la distrofina y su localización molecular sugieren que es un enlace esencial en una cadena de interacciones que conecta la actina del citoesqueleto a la matriz extracelular. Estas estructuras pueden estabilizar el sarcolema y proteger de la ruptura durante la contracción muscular. Así las células musculares pueden ser mecánicamente más fuertes que en aquellas en las que falta distrofina (52).

Los miotubos que les falta distrofina tienen un mecanismo de entrada anormal y concentraciones elevadas de iones calcio. Concentraciones excesivas de iones calcio activan proteasas que pueden debilitar la matriz del citoesqueleto. La distrofina tiene un efecto directo en la fuerza de las células musculares, los cambios en la permeabilidad a los iones calcio en células de músculos distróficos pueden ser causados por efecto de la deficiencia de la distrofina (9). La estructura de la distrofina sugiere un número de interacciones que pueden ser importantes en los mecanismos celulares (Fig 8). Similar a la anquirina de los eritrocitos puede enlazar proteínas de membrana plasmática de manera específica para sostener una matriz de filamentos viscoelásticos vía el dominio de unión a la actina. Experimentos bioquímicos iniciales demostraron una fuerte asociación de la distrofina con glucoproteínas del sarcolema y sugieren que está involucrada en el anclaje de proteínas de sarcolema al citoesqueleto (56-64). La caracterización estructural y funcional de la distrofina y de las proteínas asociadas a ésta (DAPs) ha permitido tener una pista de la organización de membrana (Fig. 9) y de la función del complejo distrofina-glucoproteína en músculo esquelético. Los componentes del complejo distrofina-glucoproteína se muestran en la tabla 2.

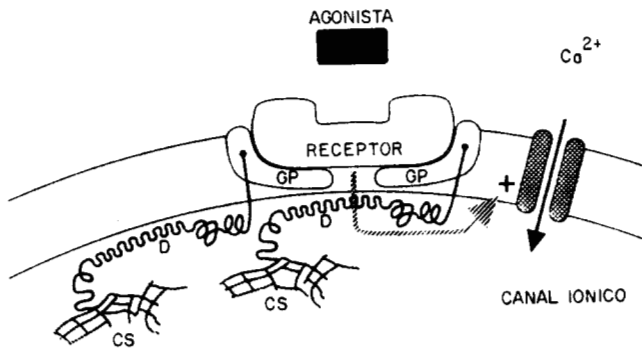


Figura 8. Función de la distrofina como estabilizador de un receptor hipotético en las membranas musculares, en presencia de un agonista este receptor puede permitir una transitoria elevación de calcio intracelular por la entrada de calcio extracelular a través de los canales iónicos mientras que en ausencia de la distrofina por la pérdida de estabilidad del complejo glucoproteico se permite una excesiva entrada de calcio extracelular y en consecuencia la degeneración de las fibras musculares. D: distrofina; CS: proteínas de citoesqueleto; GP: glucoproteínas estabilizadoras. (Tomado de Patridge 1993)

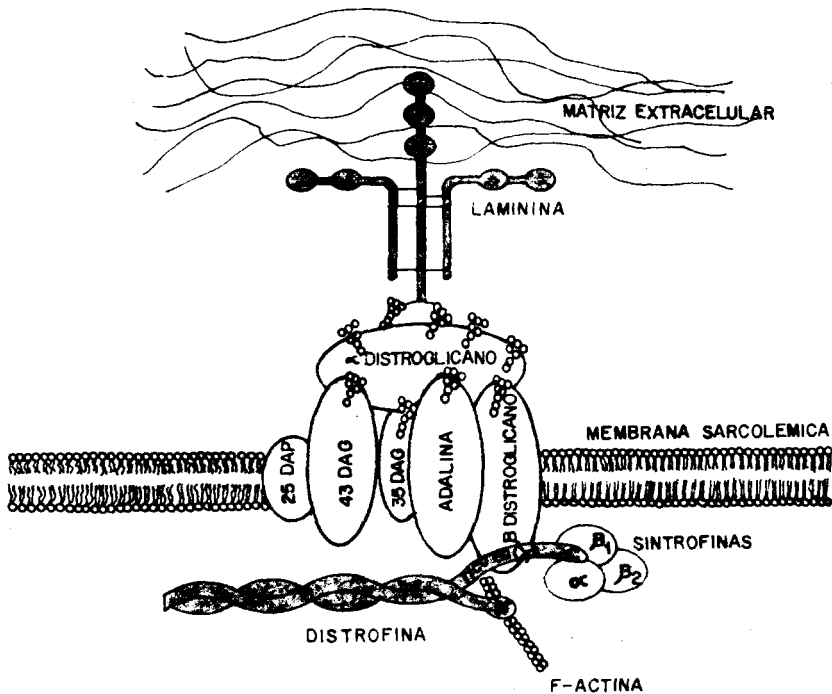


Figura 9. Organización membranal del complejo glucoproteínas-distrofina. Merosina un componente de la matriz extracelular, se une a un alfa distroglicano, que se enlaza al complejo glucoproteico transmembranal que contiene adalina (50 DAG), beta-distroglicano, 43 DAG (A3b), una glucoproteína de 35 kDa (35 DAG) y una proteína de 25 kDa (25 DAP). El complejo glucoproteico se enlaza al dominio rico en cisteína de la distrofina por el beta-distroglicano, y el dominio amino-terminal (N) de la distrofina se une a la actina del citoesqueleto. Las sintrofinas se unen al dominio carboxilo terminal de la distrofina. (Tomado de Campbell 1995)

TABLA 2. Componentes del complejo de distrofina-distroglucanos

Localización	Proteína	Otro nombre	Tamaño (kDa)	Locus	Función
MATRIZ EXTRACEL.	Laminina cadena $\alpha 2$	Merosina	400	6p22-23	Componente de la lamina basal unida a los α -distroglucanos
SARCOLEMA Extracelular	α - distroglucano	156 DAG	156	3p21	Unida a la laminina 2 e involucrada en el enlace de la distrofina a la laminina 2
Transmembra- nal	β - distroglucano	43 DAG, A3a	43	3p21	Unida a la distrofina e involucrada en el enlace a la laminina 2
	Adalina	50 DAG A2, SL50	50	17q21	Desconocida*
	43 DAG	A3b	43	Desconocido	Desconocida*
	35 DAG	A4	35	Desconocido	Desconocida*
25 DAP	A5	25	Desconocido	Desconocida*	
Intracelular	α sintrofina	59 DAP1, Syn 1	58	20q11	Unida a distrofina/ utrofina
	$\beta 1$ -Sintrofina	59 DAP2, Syn2	59	16	Unida a distrofina/ utrofina
	$\beta 2$ Sintrofina	59 DAP3, Syn 3	60	8q23-24	Unida a distrofina/ utrofina
Citoesqueleto	Distrofina		427	Xp21	Proteína de citoesqueleto de membrana enlaza al complejo glucoproteico transmembranal a la F actina

*Pueden formar un subcomplejo

Tomada de Partridge 1993 (8)

La glucoproteína asociada a la distrofina (DAG) de 156 kDa es un alfa distroglicano que recientemente se ha mostrado que es un receptor de agrinas, presente en el exterior de la célula muscular, el cual enlaza la membrana del sarcolema a la matriz extracelular por unión al dominio G de la merosina (isoforma muscular de la laminina), de manera dependiente de Ca^{2+} (12,51,57). Estudios inmunocitoquímicos indican que los alfa distroglicanos y la distrofina están presentes en toda la superficie de las células musculares esqueléticas maduras. En las uniones neuromusculares, los alfa distroglicanos están concentrados con otros miembros del complejo pero la distrofina es reemplazada por una proteína relacionada a la distrofina (DRP) la utrofina, en donde se agrupan los receptores de acetilcolina. Los alfa distroglicanos juegan un papel importante en el inicio de la sinaptogénesis músculo-nervio(51). El complejo glucoproteico que enlaza al alfa distroglicano al sarcolema, está compuesto de cinco proteínas integrales de membrana: adalina (50 DAG), dos glucoproteínas de 43 kDa (beta-distroglicano y una nueva proteína 43DAG o A3b), una glucoproteína de 35 kDa (35DAG) y una proteína de 25 kDa (25 DAP). Las proteínas de 35 DAG y 50 DAG son específicas de músculo estriado, y la de 43 DAG se encuentra en músculo estriado, liso y en tejidos no musculares (61). Esta proteína junto con la 156 DAG puede ser una conexión entre la distrofina y la laminina (merosina), una proteína de unión al componente de membrana basal de músculo estriado (53). En el caso de otros tejidos en el que la distrofina no se expresa, la utrofina se expresa en su lugar (50). En trabajos realizados por Yamamoto y cols (61) sugieren que la ausencia de 35 DAG así como de 50 DAG puede resultar en un cambio distrófico semejante a la DMD (57). Finalmente, la distrofina enlaza el citoesqueleto subsarcolémico al sarcolema por unión a la F-actina a través de su dominio amino terminal y al complejo glucoproteico a través del dominio rico en cisteínas y por la primera mitad del dominio carboxilo terminal (51,53,59,61). Un triplete de sintrofinas (59 DAP) están directamente asociadas con el dominio carboxilo terminal de la distrofina (64). En la figura 10, se muestra un modelo donde la distrofina es el enlace entre el citoesqueleto de actina subsarcolémica y el complejo glucoproteico, mientras que el distroglicano (156K)

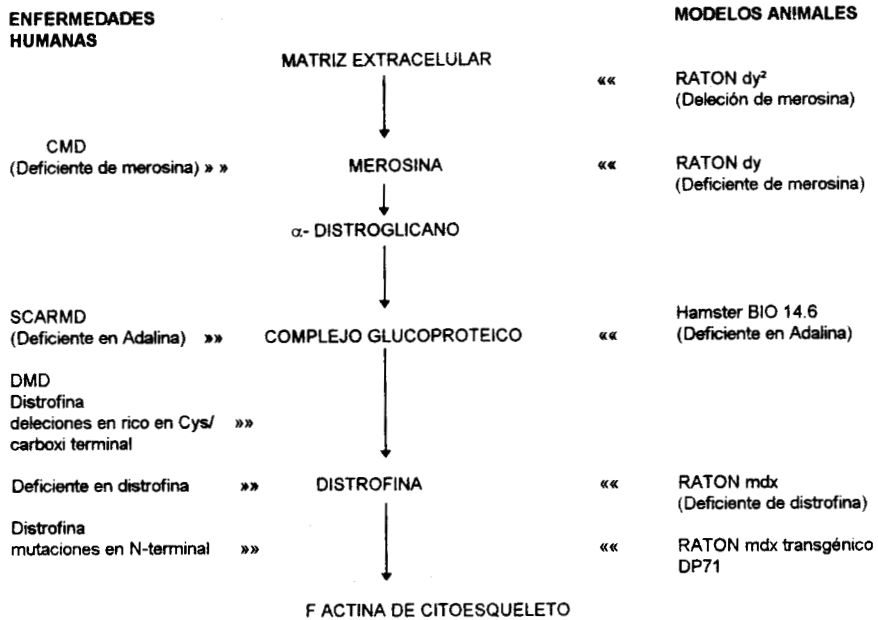


Figura 10. Participación del complejo distrofina-glucoproteínas en las distrofias musculares. Tomado de Campbell 1995 (53)

es el enlace extracelular entre el complejo glucoproteico y la merosina (43,49,52,53) Esto indica que el complejo glucoproteinas-distrofina puede enlazar el citoesqueleto subsarcolémico a la matriz extracelular (59,60,62). En la tabla 3 se muestran algunas enfermedades ocasionadas por deficiencia selectiva de alguna DAP

La organización del complejo glucoproteico y la alta densidad de la distrofina en el sarcolema sugiere que este complejo tiene un papel estructural en el músculo esquelético. El enlace entre el citoesqueleto y la matriz extracelular a través de los distroglicanos probablemente proporcione un mecanismo de anclaje de las células musculares a la matriz extracelular, funcionando de forma similar como las integrinas o cadherinas. Esta adhesión puede estabilizar a la membrana y proteger al sarcolema del stress que desarrolla durante la contracción muscular. (8,15,52,53)

Por actuar como un enlace molecular tanto a la actina del citoesqueleto y la matriz extracelular, la distrofina puede redistribuir la tensión impuesta localmente en el sarcolema sobre una amplia área de la célula. La distrofina comprende el 2% de la proteína sarcolémica y el 5% del citoesqueleto sarcolémico, su función es mantener la arquitectura del músculo esquelético vía el complejo glucoproteína-distrofina. En una fibra muscular con ausencia de distrofina, la tensión localizada puede romper fácilmente el sarcolema, se activa la degradación intracelular y así la muerte celular. Si alguno de los enlaces en la cadena de las interacciones de la actina del citoesqueleto a través de la distrofina y las DAGs a la matriz está ausente, la función de la cadena entera puede romperse. La expresión de las DAGs está menos afectada en ausencia de la distrofina. Su ausencia y la consecuente pérdida del enlace a la matriz extracelular puede contribuir a la inestabilidad de la membrana (Fig.11) (53,55,57-60,62). Desde luego mutaciones en el gen de la distrofina, de la adalina, o la merosina pueden conducir a la distrofia muscular (51,52). Este es el primer paso en la patogénesis molecular de la DMD, que conlleva a la pérdida de enlace entre el citoesqueleto sarcolémico y la matriz extracelular, y el sarcolema es susceptible al daño ocasionado por la

TABLA 3. Enfermedades relacionadas con deficiencia de DAPs.

DISTROFIA	SIMBOLO	LOCALIZACION	MODELO	PRODUCTO
MUSCULAR DMD/DMB recesiva ligada al X	DMD/DMB	Xp21	ANIMAL Ratón mdx perro grmd	PROTEICO Distrofina
Emery/Dreifuss	EDMD	Xq28		Emerina
Autosomica recesiva				
Limble girdle	LGMD2A	15q	-----	Desconocida
	LGMD 2B	2p	-----	Desconocida
SCARMD	LGMD2C	13q12	BIO14.6 Hamster	Desconocida
	LGMD2D	17q21	-----	Adalina
Congénita (Def. de merosina	CMD	6q2	Ratón dy y df	Merosina?
Congénita tipo Fukuyama	FCMD	9q31-33	-----	Desconocida
Autosomica dominante				
Facioescapulo- humeral	FSHD	4q35	Ratón myd?	Desconocida
Circunda extremidades	LGMD1A	5q	-----	Desconocida

Tomada de Campbell 1995 (53)

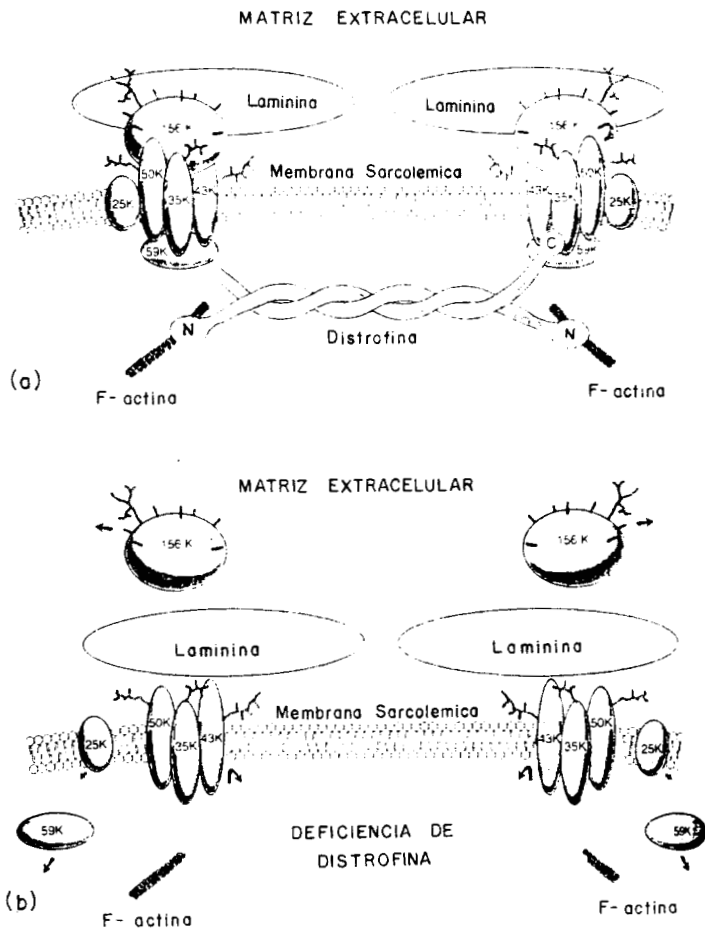


Figura 11. Modelo de las DAPs en ausencia de distrofina a) se muestra un músculo esquelético normal y b) músculo deficiente de distrofina. En ausencia de distrofina las glucoproteínas están drásticamente reducidas ya sea como resultado de una regulación negativa en la síntesis o por degradación proteica incrementada. Tomada de Patridge 1993 (8)

y la matriz extracelular, y hace susceptible al sarcolema al daño ocasionado por la contracción muscular y conduce a la necrosis de las células musculares (8) (Fig. 12). Las proteínas que anclan a la distrofina, las cuales regulan del calcio intracelular y conducen a la activación de proteasas dependientes de este ión, explican el mecanismo de la degradación anormal de la proteína del músculo y la necrosis de fibras de músculo distrófico (9,57).

Así pues la distrofina participa en el anclaje de la maquinaria contráctil de las fibras musculares al tejido conjuntivo que las envuelve y permite que la fuerza producida por la contracción de cada célula se transmita al músculo en su conjunto para facilitar el ajuste correcto entre las células, muy largas y la matriz conjuntiva (31,52-54).

ISOFORMAS DE LA DISTROFINA

Existen varias isoformas de la distrofina generadas por "splicing" alternativo del mRNA o por el uso de promotores alternativos para iniciar la transcripción en diferentes lugares del gen (Fig. 13).

El primer promotor (P1) que se identificó fue el específico para la distrofina de longitud mayor. El promotor muscular es similar a otros promotores específicos de músculo, teniendo sitios de unión MEF-1 (unión a MyoD) en las posiciones -58, -535, y -538, una caja CArG en la posición -91 y una secuencia consenso en la posición -394. El promotor contiene elementos regulatorios tanto positivos como negativos, y se conoce una secuencia amplificadora (*enhancer*) en el primer intrón. En el cerebro el mRNA el primer exón es transcrito a partir del promotor P2, localizado a 90 kb o más río arriba del promotor del músculo. En la isoforma del cerebro los primeros 11 aminoácidos de la isoforma del músculo son reemplazados por tres diferentes aminoácidos. Mientras que el promotor del cerebro es altamente específico para las neuronas, el promotor del músculo es activo en un amplio espectro de tipos celulares, incluyendo músculo liso y estriado y además células gliales. El promotor tres, P3, a 240 kb entre el exón 1 y el exón 2 del tipo muscular. En esta isoforma se

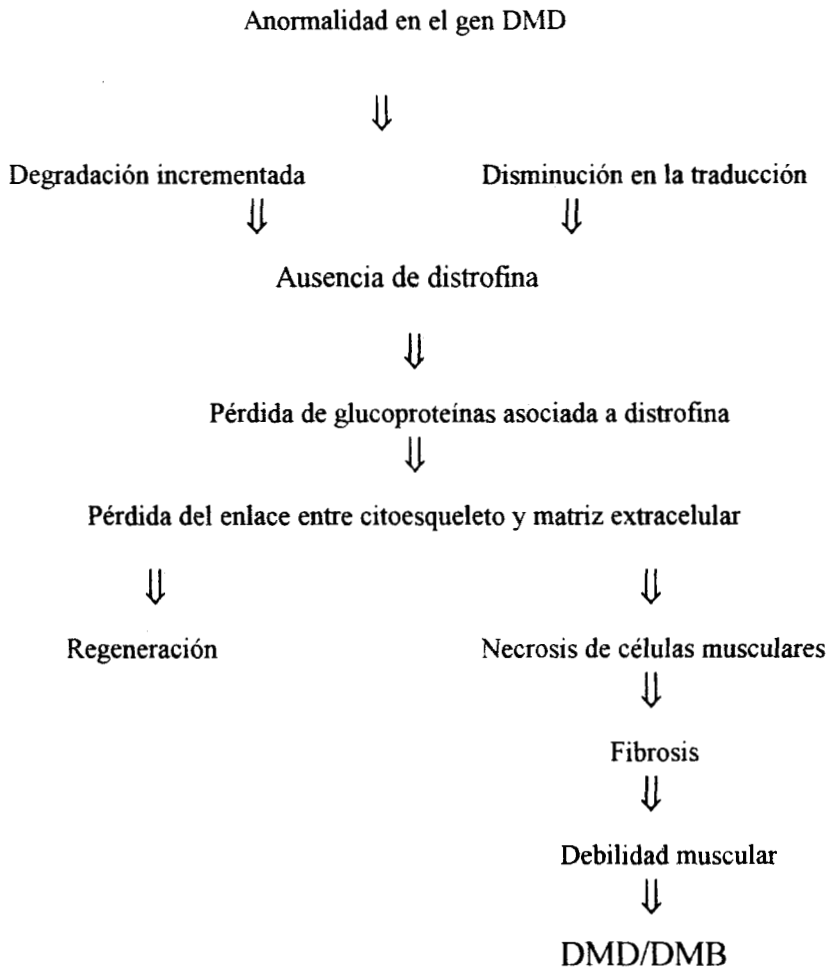


Figura 12. Patogenesis molecular de la distrofias musculares tipo Duchenne y Becker. Modificado de Partridge 1993 (8)

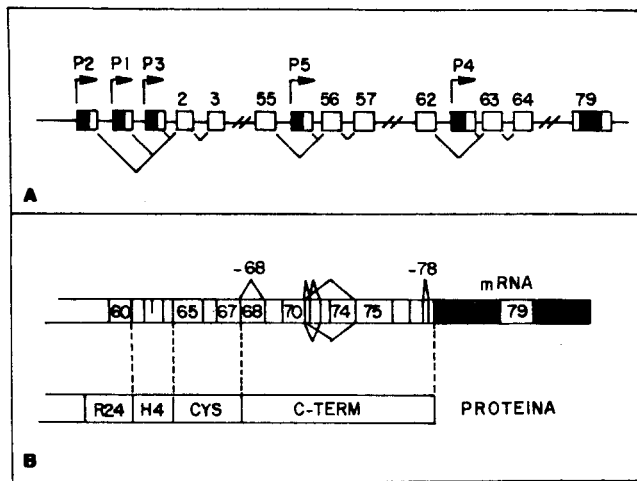


Figura 13. Esquema que ilustra el origen de las isoformas de la distrofina A) posición de los 5 promotores (P1 hasta P5). B) "splicing" alternativo descrito para el gen DMD humano. Tomado de Screiver 1995 (12)

promotor tres, P3, se encuentra a 240 kb entre el exón 1 y el exón 2 del tipo muscular. En esta isoforma se codifican 7 aminoácidos por el primer exón en las células de Purkinje. El cuarto promotor P4 transcribe el primer exón a 8 kb del exon 63. Tiene un mRNA de 4.8 kb que codifica una proteína de 70-80 kDa (Dp71) que contiene una secuencia de aminoácidos idéntica a los dominios rico en cisteínas y carboxilo terminal que inician en el exón 63 y que son precedidos por 7 aminoácidos son únicos en esta proteína. Este es el principal producto del gen DMD en cerebro, hígado, pulmón y estómago. Está presente en pequeñas cantidades en cultivos de células miogénicas, tiene una secuencia carboxilo terminal nueva que es consecuencia de un "splicing" diferencial del mRNA. El quinto promotor P5, codifica una isoforma de 116 kDa (Dp116), que únicamente se expresa en el sistema nervioso periférico. Esta isoforma es codificada por un mensajero de 5.2 kb que se transcribe de un promotor en el intrón 55. Como resultado de una proteína que inicia en el dominio semejante a la espectrina e incluye los últimos 946 aminoácidos de la distrofina del músculo (41-43,50,55).

A las isoformas cortas codificadas por los transcritos de los promotores 4 y 5 les falta el dominio de unión a la actina y el dominio de varilla, por lo que se presume que tienen diferentes funciones de las moléculas de longitud total. Ambas contienen las regiones de anclaje de la distrofina a las glucoproteínas de membrana, por lo que es probable que interaccionen con membranas celulares. Su función en la patofisiología de las distrofias musculares aún no se conoce (43). Se les ha encontrado en la membrana externa de las células de Schwann y en otros muchos tejidos (12,43).

El "splicing" alternativo en el gen DMD primero fue detectado por PCR, lo que permitió confirmar la existencia de al menos 3 diferentes mRNA en músculo esquelético y cerebro y 2 en músculo liso. La eliminación de los exones 71, 72, 71-72, 71-74, ó 72-74 no altera el marco de lectura y resulta en una distrofina casi normal faltando 13, 22, 35, 97 ó 110 aminoácidos respectivamente de la mitad del dominio carboxilo terminal (8,35,41,55).

En el cerebro, retina, corazón y fibras cardiacas de Purkinje, un "splicing" complejo da como resultado múltiples transcritos pequeños. Las fibras de Purkinje expresan una forma

(71-74), mientras que las formas -72 y (-72-74) se encuentran exclusivamente en el músculo cardíaco. La retina expresa la forma de longitud total así como las formas -71 y - (71-74) El "splicing" alternativo que elimina al exón 78 elimina 32 pares de bases del mensajero y altera el marco de lectura del exón 79 de tal forma que los últimos 14 aminoácidos hidrofílicos y el extremo carboxilo terminal son reemplazados por 32 aminoácidos hidrofóbicos (12).

La eliminación del exón 68 cambia el marco de lectura y resulta en la pérdida completa del dominio carboxiterminal. La proteína por lo tanto tiene 4 dominios y es estructuralmente similar a la espectrina y a la alfa-actinina (48,49,51,53)

Las proteínas relacionados con la distrofina con carácter autosómico (DRP o Utrofina), son expresadas en muchos tipos celulares además del músculo (50). En músculo la DRP se localiza sobre el pliegue de la unión neuromuscular y en la unión miotendinosa. El complejo de proteínas integrales y periféricas de membrana que se copurifican con la distrofina se conocen como complejo glucoproteico-distrofina (DGC), éstas además se copurifican con la DRP y las sintrofinas fosfoproteínas que son un grupo bioquímicamente heterogeneo de proteínas asociadas a membrana intracelular de 58 kD. Estas proteínas son codificadas por tres genes diferentes y se distribuyen por toda la membrana del músculo y en una gran variedad de tejidos. La amplia distribución de las sintrofinas y su coincidente expresión con Dp71 y DRP en tejidos no musculares sugiere que estas proteínas pueden jugar un papel análogo a la distrofina en el citoesqueleto de membrana de otros tipos celulares. El sitio de unión de las sintrofinas en la distrofina se ha localizado en el extremo carboxilo terminal de la distrofina, producto del exón 74, una región que sufre "splicing" alternativo en músculo esquelético, cerebro y corazón (64). La cuantificación de distrofina en un paciente joven permite establecer un pronóstico, asignando tres grupos bioquímicos: Duchenne (< 5% de distrofina), Becker severa (tentativamente 5%-12%) y Becker (> 12%) (8,12).

Varios autores han reportado que las regiones de delección en el dominio central conducen a fenotipos medios, mientras que las delecciones ya sea en el extremo amino o

carboxilo terminal conducen a fenotipos más severos. Esta es una variabilidad clínica sustancial, y pacientes con deleciones similares cerca del centro del dominio de varilla pueden mostrar diversos fenotipos. Es difícil asociar presentaciones y progresiones específicas con deleciones específicas, pero se puede hacer una generalización que las regiones amino y carboxilo terminal son más importantes para la función correcta de la distrofina (Fig. 14) (11,65).

No hay una clara evidencia de correlación entre la función mental y la localización o el tamaño de las deleciones, aunque la deleción del exón 52 se ha asociado con un elevado riesgo de deficiencia mental (12,27,66).

MUTACIONES QUE AFECTAN EL GEN DMD.

Las primeras mutaciones que se describieron en el gen DMD fueron las deleciones detectadas por una serie de sondas genómicas PERT87 y XJ en el 8 al 10% de los niños afectados (16,34). Por análisis de Southern blot con un número mayor de sondas de cDNA o por el análisis de fragmentos grandes que cubren la porción central del gen, la frecuencia de deleciones en los casos afectados fue del 50-60% (19,24,65,67-71), de duplicaciones 6% y aproximadamente el 35% son mutaciones puntuales. La identificación de las deleciones o duplicaciones puede hacerse en muestras de sangre por Southern blot o por la técnica de PCR (72) con la cual se puede identificar hasta el 98% de las deleciones, detectables por Southern blot (73). En los casos bien reconocidos de DMD/DMB las mutaciones se encuentran principalmente en la región central del gen o hacia el extremo 5' (14,19,72,73).

Las deleciones en el gen DMD son altamente heterogéneas con respecto al tamaño y su localización. La deleción más grande que se ha documentado es de varios cientos de kb, elimina genes vecinos y ocurren en asociación con un síndrome de deleción génica contigua (17,22,31,65).

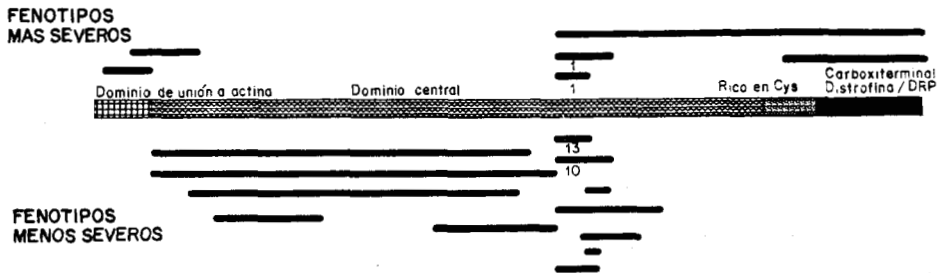


Figura 14. Correlaciones genotipo-fenotipo en DMD/DMB; deleciones ubicadas en los dominios de la distrofina. Se muestra un diagrama de la proteína con sus 4 dominios y la localización de las deleciones en pacientes. La región eliminada se indica en barras negras. Los "fenotipos más severos" son deleciones en pacientes Becker severos o Duchenne. Los "fenotipos menos severos" indican pacientes Becker moderado. Los números bajo las 4 regiones indican el número de pacientes que presentaron deleción encontradas por Beggs et al (20) Modificada de Screiver 1995 y Patridge 1993

Aunque algunos estudios sugieren que no existe correlación entre el tamaño de la deleción y la gravedad y la progresión de la enfermedad, Hoffman y cols (74) aportaron evidencias sobre la correlación entre el fenotipo y el estado de la distrofina. En un estudio por inmunodetección para detectar la presencia de la proteína en 103 biopsias musculares de pacientes con varios padecimientos neuromusculares se observó que: de 38 pacientes con DMD, 35 presentaron muy bajos niveles de distrofina (<3%) o ausencia de distrofina; De 18 pacientes con DMB, 12 presentaron alteraciones en el peso molecular; y en 40 con otros padecimientos neuromusculares, 38 mostraron niveles normales de distrofina. Estos estudios sugieren que existe una correlación directa entre la cantidad de la distrofina y la severidad de las distrofias musculares tipo Duchenne y Becker (12,20,75).

El marco de lectura del mRNA puede estar conservado sólo si el extremo 3' del último exón faltante y el extremo 3' del sitio de ruptura tienen nucleótidos que terminan en la misma posición en el codón (1,2,y 3). Un cambio en el marco lectura se produce cuando las deleciones dan como resultado la unión de exones con diferentes límites. Cuando esto sucede, el nuevo marco de lectura especifica un grupo completamente diferente de aminoácidos en la proteína, hasta que el complejo de traducción encuentra un codón de terminación. La proteína truncada que le falta el extremo carboxilo terminal, puede ser no funcional o inestable. En contraste una deleción que no altera el marco de lectura puede generar una proteína con ausencia de los aminoácidos codificados por los exones deletados, pero con una secuencia de aminoácidos normal antes y después de la región deletada. Así el marco de lectura es un indicador pronóstico válido de la severidad de la enfermedad (12,21,22,35,75,76)

Al igual que en las deleciones, las duplicaciones que cambian el marco tienden a ocurrir más frecuentemente en pacientes con DMD, mientras que aquellas que no cambian el marco de lectura ocurren en DMB y puede resultar en una distrofina más grande con parte de los aminoácidos repetidos en la proteína (8,65,70,71).

Las mutaciones puntuales son difíciles de identificar en un gen de 2,400 kb, las mutaciones identificadas se encuentran en la tabla 4. Diez de éstas son cambios de una sola base a codón de terminación en DMD severa, los exones afectados más o menos se encuentran distribuidos entre los exones 8 y 70 y las mutaciones en el promotor han sido detectadas. Alteraciones en el promotor del músculo, incluyen una deleción y una mutación puntual, que conducen a niveles reducidos de distrofina (12,76,77).

Recientemente la detección de las deleciones se ha simplificado por el uso de la técnica de PCR. Chamberlain en 1988 (72) describió una serie de oligonucleótidos que amplifican 9 exones que son deletados en pacientes con DMD/DMB. Este PCR múltiple permite una detección rápida del 82% de las deleciones en muestras muy pequeñas de DNA genómico en pacientes con DMD/DMB. Sin embargo Beggs y cols. (73) con el uso de la misma técnica pero con mayor cantidad de oligonucleótidos detectó las deleciones en el 98% de los pacientes con DMD/DMB. La localización de las deleciones en el gen de la distrofina se encuentran en dos "puntos calientes", en el extremo 5' y en el dominio que comprende los exones del 44-55. En la region que codifica a la distrofina se encuentran 28 codones de terminación potenciales, debido a las transiciones en los dinucleótidos CpG, estos se encuentran uno por exón a excepción del exón 70 donde se observan 3. (12,19,76). La PCR es el método de elección para detectar deleciones en niños afectados. Pares de oligonucleótidos para PCR fueron inicialmente elegidos para amplificar los exones 4,8, 12, 17, 19, 44, 45, 48 y 51, nueve exones que frecuentemente faltan en los pacientes. La posición de los oligonucleótidos en los intrones adyacentes fueron elegidos cuidadosamente para que cada exón sea amplificado como un fragmento de diferente tamaño, en una reacción múltiple con los nueve pares de primers. Con esta PCR se detectó el 82% de las deleciones detectables por Southern blot. Adicionando otros nueve exones para análisis en la segunda reacción se estimo que la detección se incremento a un 98%. Además la cuantificación de productos de PCR hace posible la identificación de duplicaciones en hombres afectados y deleciones o duplicaciones en portadoras (31,72,73).

TABLA 4. Mutaciones puntuales en el gen DMD.

Mutación	Localización	a.a. afectado	Referencia
Mutaciones que generan codones de terminación			
C932T	EXON 8	Glu»	Nigro y cols.
C2510T	EXON 19	Arg»	Prior y cols.
G2522T	EXON 19	Glu»	Prior y cols.
G2999T	EXON 21	Glu»	Roberts y cols.
G3677T	EXON 26	Glu»	Bulman y cols.
C5759T	EXON 39	Gln»	Roberts y cols.
C7163T	EXON 48	Glu»	Clemens y cols.
GG7609/10»AT	EXON 51	Leu»	Winnard y cols.
C9152 (CpG)	EXON 60	Arg»	Roberts y cols.
C10316T (CpG)	EXON 70	Arg»	Roberts y cols.
Deleciones que cambian el marco de lectura			
	EXON 19		Prior y cols.
	EXON 48		Kilimann y cols.
	EXON 74		Roberts y cols.
Inserciones que cambian el marco de lectura			
T1554»insT	EXON 12		Kilimann y cols.
Alteraciones en el "splicing" que cambian el marco de lectura			
52 pb del. en exon 19	EXON19		Matsuo y cols.
5 pb del. en donador de splice	EXON44		Saad y cols.
Aceptor de splice AG»AC	EXON57		Roberts y cols.
Donador de splice GT»GA	EXON68		Roberts y cols.

Modificada de Screiver 1995 (12)

En un período relativamente corto, los avances rápidos en la Biología Molecular han conducido a importantes conocimientos en los procesos de la enfermedad y proporciona aplicaciones prácticas, particularmente en el diagnóstico. Este avance es evidente en la genética molecular de enfermedades neuromusculares.

Actualmente el diagnóstico de las DMD/DMB se pueden intentar a muchos niveles: genética molecular (mutaciones en el gen de la distrofina), bioquímica (anormalidades en la distrofina), biología celular (disfunción de la fibra muscular), fisiología tisular (patología y disfunción muscular) fenotipo clínico (presentación y progresión de la enfermedad) (tabla 5). En estas distrofinopatías existe una correlación bioquímica/fenotipo más fuerte que una relación genotipo/fenotipo, sin embargo es importante tener datos completos de mutaciones diferentes a las deleciones y la expresión y la estabilidad del mRNA (8,74,77,78).

La compleja estructura y expresión del gen de la distrofina ocasiona que las enfermedades DMD/DMB, sean de las más difíciles para hacer estudios de correlación genotipo/fenotipo. Los hallazgos en DMD sugieren que existe un fuerte control de la distrofina o estabilidad del mRNA, o ambas: el mRNA que no es traducido eficiente o completamente, o bien la distrofina no se integra correctamente en el citoesqueleto de la membrana, siendo catabolizados (8,79)

DETECCION DE PORTADORAS Y DIAGNOSTICO PRENATAL

Antes de aplicar las técnicas basadas en métodos moleculares, el diagnóstico de DMD/DMB se ha hecho en base a: a) historia familiar; b) hallazgos clínicos; c) niveles séricos de enzimas musculares; d) biopsia muscular (BM); e) electromiografía (EMG) y f) electrocardiografía que se conocen como "pruebas convencionales". La determinación precisa de mujeres portadoras de DMD/DMB es de suma importancia, ya que actualmente no existe tratamiento efectivo para estas enfermedades (80,81). Inicialmente el diagnóstico prenatal se intentó en la determinación de la actividad de la CPK en plasma fetal, sin embargo la alta tasa de falsos negativos, fue alrededor del 30%. Así mismo también fueron utilizados para la detección de portadoras de mujeres en riesgo, pero únicamente el 66% de las mujeres tienen valores

TABLA 5. Correlación génica, protéica, histopatológica y clínica.

Tipo de enfermedad tipo de mutacion en el gen	Correlacion gen-anormalidad en la proteina	Histopatologia. Generalmente correlaciona con la edad y no con la anormalidad en el gen o la proteina.	Presentación/Progresión clinica Generalmente correlaciona con histopatologia.
Duchenne 55% Delecciones	>99% Deficiencia de la distrofina (<5% de la proteina)	Fetal a 1 año. Fibras hipercontractadas. pérdida de fibrosis.	Ck sérica extremadamente alta
Duchenne 5% Duplicaciones	>99% Deficiencia de distrofina (<5%)	1 a 5 años. Variación en el tamaño de las fibras, fibrosis progresiva	CK extremadamente muy alta, hipertrofia muscular, dilatación motora.
Duchenne 40% mutaciones puntuales	>99% Deficiencia de distrofina (<5%)	> 5 años Regeneración ausente. reemplazamiento de fibra por grasa.	CK extremadamente muy alta, pérdida muscular progresiva, debilidad.
Becker 68% Delecciones	95% de la distrofina de peso molecular pequeño 5% de tamaño normal. cantidad baja	Variable Generalmente menos dramática que Duchenne	CK muy alta
Becker. 5% de Duplicaciones	100% de la distrofina de peso molecular alto	En todas las edades, hipertrofia de fibras, fibrosis endomusial de media a severa, degeneración/ regeneración.	Hipertrofia muscular variable. Pérdida muscular variable.
Becker 27% mutaciones puntuales.	80% de la distrofina de peso molecular pequeño. 20% tamaño normal. cantidad reducida	Progresiva, después con falla en la regeneración y reemplazamiento focal de fibra por grasa	Progresión variable, después debilidad muscular proximal
Distrofinopatías en mujeres (Portadoras con manifestaciones)	Inmunotinción de mosaico en Biopsia	Variable, similar ya sea a Duchenne o Becker Después focal.	Variable similar a bien a Duchenne o Becker.

Basado en Partridge 1993 (8)

elevados (80-83). Actualmente la aplicación de la tecnología de DNA recombinante ha mejorado la detección de portadoras utilizando sondas, con las que se pueden reconocer fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs) intragénicos o aledaños al gen (80,83-87). Durante años pasados, el diagnóstico prenatal y la detección de portadoras de DMD se han intentado mediante esta estrategia empleada. Las secuencias de DNA inicialmente usadas en el análisis de los polimorfismos fueron RC8 (DX69) y L1.28 (DXS7), las cuales fueron mapeadas fuera de la región Xp21 y genéticamente están distantes del locus de la enfermedad. Para aplicaciones clínicas, fueron reemplazadas por marcadores que se mapearon dentro de la región Xp21. De esta segunda generación de marcadores existen reservas acerca de su seguridad diagnóstica por la incertidumbre en cuanto a la distancia que tienen en el mapa los marcadores en el locus de la enfermedad. Una tercera generación de sondas fueron derivadas de la clonación del rompimiento en una translocación t(X,21) en mujeres afectadas con DMD (grupoXJ-1 o sus fragmentos pERT87, pERT84 y cX5.7) ausentes del DNA de un paciente masculino con DMD y otras enfermedades quien tenía en Xp21 una deleción cromosomal (81,82). Estas sondas fueron muy útiles para la detección de deleciones que ocurrían alrededor del 8% de los pacientes con DMD y para la identificación de haplotipos asociados con esta enfermedad. Con el uso de estas sondas, las probabilidades de detección de portadoras de mujeres en riesgo es alta (82).

En análisis familiares sin una clara evidencia de distrofia muscular con herencia recesiva ligada al X, se debe considerar la posibilidad de una forma recesiva autosómica. Hermanas afectadas de hombres con DMD se conoce que son portadoras que expresan la enfermedad por la inactivación del X que no es al azar. Cuando se encuentran varios hombres afectados en una sola familia se asume que tiene la forma recesiva ligada al X. Mutaciones heredadas autosómicamente en estas familias pueden ser detectadas por polimorfismos de DNA que revela ya sea discordancia de haplotipos entre hermanos afectados o concordancia entre hermanos afectados y no afectados. Así que los resultados de

estudios de marcadores de DNA pueden ayudar a establecer una verdadera frecuencia de formas recesivas ligadas al X contra autosómicas de DMD (80,82).

La introducción del análisis de DNA ha dado como resultado el progreso sustancial en la determinación de portadoras. Por el tipo de herencia, las mujeres relacionadas por la línea femenina tienen el riesgo de ser portadoras. Una vez que se ha hecho el diagnóstico de DMD o DMB en un nuevo caso, el siguiente paso es saber si la madre del paciente es una portadora de la mutación en el gen de la distrofina, así esto puede determinar el riesgo de otras mujeres en la familia. Los métodos basados en DNA incluyen técnicas de análisis de ligamiento y detección de mutaciones (88-90). Una de las metas de la investigación dentro de las bases bioquímicas y genéticas de DMD/DMB es el desarrollo de las técnicas que pueden prevenir o la cura la enfermedad, como es la identificación de mutaciones en portadoras y un diagnóstico prenatal en células fetales, seguidas por un consejo genético (40).

La alta tasa de nuevas mutaciones en el gen de la distrofina en promedio es de 1/3 de los casos que pueden surgir en los niños afectados y 1/3 de las mutaciones pueden surgir en la madre. Por lo tanto, la madre de un caso aparentemente aislado tiene un riesgo de 2/3 de ser portadora de la mutación. Existen varios métodos que se pueden usar para investigar a las portadoras como pruebas directas que son posibles cuando una delección se ha identificado en un miembro de una familia afectada. La investigación de tales delecciones en las mujeres es menos directa que en hombres y se han sugerido varias técnicas, cuando estas se pueden aplicar proporcionan información definitiva acerca de si una mujer es portadora. Si estas técnicas no se pueden aplicar o la estructura familiar no lo permite, se puede hacer por métodos indirectos, tales como el análisis de polimorfismos (89-92).

Roberts y cols. en 1989 (91) utilizaron PCR para realizar un análisis rápido de RFLPs intragénicos que permiten el diagnóstico prenatal y de portadoras en la mayoría de las familias. Con esta metodología encontraron que el 70% de las madres en riesgo de ser portadoras de DMD/DMB son heterocigotas para al menos de uno de los RFLPs intragénicos (pERT87.15/XmnI y BamHI y pERT87.8/TaqI)

OBJETIVOS.

1. Caracterizar el tipo de mutación en el gen DMD en pacientes diagnosticados clínicamente con DMD y DMB.
2. Determinar los sitios del gen con mayor frecuencia de mutación en los pacientes con DMD y DMB en nuestra población.
3. Detectar las portadoras de la mutación en el gen DMD en las familias informativas.
4. Establecer si existe correlación entre el genotipo encontrado y el fenotipo de los pacientes.

HIPOTESIS

1. Dada la heterogeneidad de la población mexicana, la frecuencia y distribución de la mutación (deleción) sera diferente a la reportada para otras poblaciones.

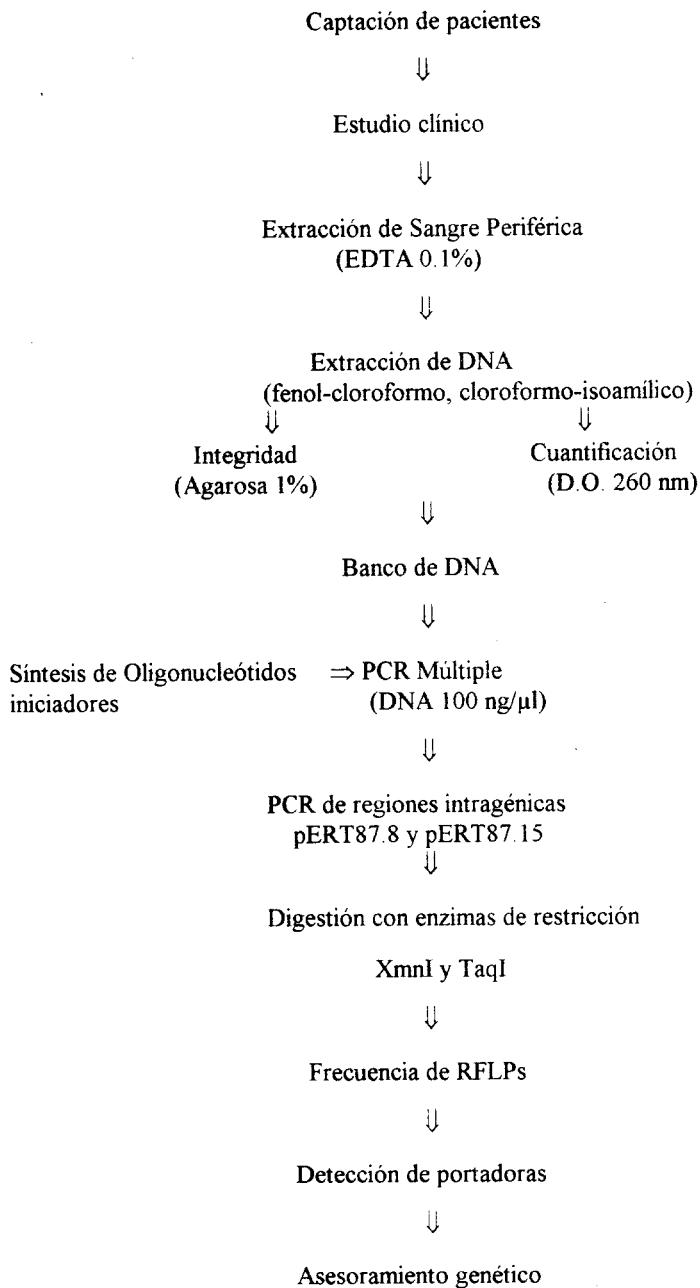
2. El análisis de los polimorfismos pERT87.15-Xmnl y pERT87.8-TaqI seran de utilidad para la detección de portadoras

MATERIAL Y METODOS

ESTRATEGIA GENERAL

Para cumplir con el objetivo de este trabajo se captó una población de 70 pacientes con diagnóstico clínico e histopatológico de distrofias musculares tipo Duchenne o Becker. Se tomó una muestra de sangre periférica de los pacientes seleccionados y de sus familiares de primer grado y se extrajo el DNA de los linfocitos. A todas las muestras obtenidas se les evaluó la pureza, concentración e integridad para crear un banco de DNA.

A partir de la secuencia del gen reportado por Koenig y cols. (47), se sintetizaron las secuencias de oligonucleótidos necesarios para amplificar 19 exones del gen DMD exones (p1, 6, 8, 12, 13, 16, 19, 45, 47, 48, 49, 50,51, 52, 53, 54, 55) que corresponden a las regiones con mayor frecuencia de deleciones en el gen. La amplificación por PCR se llevó al cabo en cuatro grupos de reacción (A, B, C, D), de acuerdo con las condiciones de amplificado requeridas para cada par de oligonucleótidos y el tamaño de los productos. Se sintetizaron además otras secuencias de oligonucleótidos para amplificar dos regiones intragénicas del gen (pERT87-8TaqI y pERT87-15XmnI) que permiten detectar mediante la técnica de PCR los RFLPs en todos los integrantes de las familias. El diseño experimental se representa en el siguiente diagrama.

DIAGRAMA DE FLUJO.

I. POBLACION OBJETIVO.

La población objetivo estuvo constituida por 56 casos índice con DMD, 5 con DMB, 96 mujeres familiares de 1er. grado (61 madres y 35 hermanas) y 11 hombres sanos. La muestra se clasificó en los siguientes grupos:

Grupo I: Pacientes con DMD diagnosticados clínicamente, por determinación de CPK y examen histopatológico.

Grupo II: Pacientes con DMB diagnosticados con los mismos criterios que el grupo I.

Grupo III: Portadoras obligadas, aquellas con más de un hijo, 1 hijo y 1 hermano o 1 hijo y un tío afectados.

Grupo IV: Portadoras probables, aquellas con 1 hijo afectado o bien las hijas de las portadoras obligadas.

Grupo V: Individuos del sexo masculino familiares en primer grado de los pacientes con DMD.

II. HISTORIA CLINICA.

De cada uno de los casos se elaboró una hoja de captación de datos (anexo 1) que incluyó manifestaciones clínicas, exámenes de laboratorio y gabinete, árbol genealógico, tratamiento y estudio histopatológico.

III. OBTENCION DE MUESTRAS.

Se aislaron los linfocitos a partir de 10 ml de sangre periférica, usando como anticoagulante EDTA, después se centrifugó la muestra por 20 min a 3,000 rpm, se tomó la capa de linfocitos, se colocó en 3 ml de solución de lisis de eritrocitos (RCBL), el plasma y los eritrocitos se desecharon, la muestra se agitó suavemente y se procedió a centrifugar por 10 min a 3,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 3 ml de RCBL, se agitó suavemente y se centrifugó por 10 min a 3,000 rpm se repitió este paso hasta eliminar toda la hemoglobina, el

botón de linfocitos se resuspendió en 300 μl de RCBL con 1.5 ml de solución para lisis de linfocitos (WCBL) y se incubó toda la noche a 42° C para obtener un hidrolizado de linfocitos.

IV. EXTRACCION DEL DNA.

Se agregaron 2 ml de fenol al hidrolizado obtenido en el paso anterior, se agitó suavemente por 10 min y se centrifugó a 3,000 rpm. Después la fase superior se pasó a un tubo limpio sin tocar la interfase y se repitió el paso anterior. A la fase superior obtenida del lavado con fenol se le agregaron 2 ml de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se agitó suavemente y se centrifugó 10 min a 3,000 rpm, este paso se repitió una vez más y posteriormente se agregaron 90 μl de NaCl 1M y 3 ml de etanol absoluto a -20° C. Se agitó suavemente hasta que las hebras de DNA se hicieron evidentes y éste se extrajo de la solución con una pipeta Pasteur sellada. Se secó por unos min a temperatura ambiente, se enjuagó en etanol al 70% y se resuspendió en 200 μl de agua destilada estéril.

V. CUANTIFICACION DE DNA.

Se diluyó 1 μl de la muestra del DNA en 250 μl de agua estéril y se midió en un espectrofotómetro a una densidad óptica de 260 nm. Para la cuantificación del DNA se utilizó la siguiente fórmula (96):

$$[\text{DNA}] \mu\text{g}/\mu\text{l} = (\text{DO}) (\text{F}) (\text{Dil})$$

Donde:

D.O. 260= Densidad óptica a una λ de 260 nm

F= constante equivalente a 0.05 (1 D.O.260 = 50 ng de DNA)

DIL= volumen de dilución equivalente a 250 μl .

Después de la extracción del DNA se comprobó su integridad por medio de una electroforesis, para lo cual se mezcló 1 μl de muestra con 2 μl de colorante azul de bromofenol-xilencianol (0.05%:0.05%) y 5 μl de agua estéril. Esta se llevó al cabo en un gel de agarosa al 1% durante 20 min a 100 V y posteriormente se tiñó con bromuro de etidio por 20 min.

VI. SINTESIS DE OLIGONUCLEOTIDOS.

Una vez que se cuantificó y se corroboró la integridad del DNA, se sintetizaron los oligonucleótidos para la amplificación de los 19 exones del gen DMD (tabla 6), por el método de fosforoamidita propuesto por Pharmacia LKB (1991).

La síntesis de oligonucleótidos es un acoplamiento cíclico de monómeros (A,T,G,C), para obtener un multímero de una longitud y una secuencia previamente determinadas. Cada síntesis comprendió una serie de ciclos, en cada uno de los cuales se agregó un nucleótido a la cadena en crecimiento (Pharmacia LKB). La reacción constó de cuatro pasos principales, y se desarrolló sobre un polímero inerte (soporte sólido) en cual se ensambló el oligonucleótido mediante una adhesión sucesiva de nucleótidos libres. El primer 3' nucleósido (A, C, T o G) se ancló a este soporte mediante un puente de succinato, el proceso se inició lavando el soporte sólido que contenía el monómero inicial con dicloroetano y después se sucedieron en forma continua los siguientes pasos:

1. Desprotección del grupo 5-hidroxilo de la unidad terminal 2-deoxirribosa, removiendo el grupo 4,4'-dimetiltritol (DMTr) con dicloroetano, después se eliminaron los residuos de agua con acetonitrilo.
2. Acoplamiento: formación de un puente 3'-5' internucleotídico con el grupo fosfato del deoxirribonucleótido siguiente.
3. Capping: se bloquearon los grupos hidroxilo sin reaccionar para garantizar que sólo polimerise la secuencia correcta en los ciclos siguientes.
4. Oxidación: se oxidó el puente triéster fosfato y se detuvo la reacción.
5. Purificación: Esta se realizó en columnas de intercambio iónico o de Sephadex para remover subproductos de los oligonucleótidos sintetizados.

222868

TABLA 6. Secuencia de oligonucleótidos para DMD.

Exón	Secuencia de oligonucleotido	Tamaño (pb)
promotor/1	GAA GAT CTA GAC AGT GGA TAC ATA ACA AAT GCA TG TTC TCC GAA GGT AAT TGC CTC CCA GAT CTG AGT CC	535
6	CCA CAT GTA GGT CAA AAA TGT AAT GAA GTC TCA GTA ATC TTC TTA CCT ATG ACT ATG G	202
8	GTC CTT TAC ACA CTT TAC CTG TTG AG GGC CTC ATT CTC ATG TTC TAA TTA G	360
12	GAT AGT GGG CTT TAC TTA CAT CCT TC GAA AGC ACG CAA CAT AAG ATA CAC CT	331
13	AAT AGG AGT ACC TGA GAT GTA GCA GAA A CTG ACC TTA AGT TGT TCT TCC AAA GCA G	281
16	TCT ATG CAA ATG AGC AAA TAC ACG C GGT ATC ACT AAC CTG TGC TGT ACT C	290
17	GAC TTT CGA TGT TGA GAT TAC TTT CCC AAG CTT GAG ATG CTC TCA CCT TTT CC	416
19	TTC TAC CAC ATC CCA TTT TCT TCC A GAT GGC AAA AGT GTT GAG AAA AAG TC	459
43	GAA CAT GTC AAA GTC ACT GGA CTT CAT GG ATA TAT GTG TTA CCT ACC CTT GTC GGT CC	357
45	AAA CAT GGA ACA TCC TTG TGG GGA C CAT TCC TAT TAG ATC TGT CGC CCT AC	547
47	CGT TGT TGC ATT TGT CTG TTT CAG TTA C GTC TAA CCT TTA TCC ACT GGA GAT TTG	181
48	TTG AAT ACA TTG GTT AAA TCC CAA CAT G CCT GAA TAA AGT CTT CCT TAC CAC A	506
49	GTG CCC TTA TGT ACC AGG CAG AAA TTG GCA ATG ACT CGT TAA TAG CCT TAA GAT C	439
50	CAC CAA ATG GAT TAA GAT GTT CAT GAA T TCT CTC TCA CCC AGT CAT CAC TTC ATA G	271
51	GGA GAG TAA AGT GAT TGG TGG AAA ATC GAA ATT GGC TCT TTA GCT TGT GTT TC	388
52	AAT GCA GGA TTT GGA ACA GAG GCG TCC TTC GAT CCG TAA TGA TTG TTC TAG CCT C	113
53	GGC TCT GGC CTG TCC TAA GAC CAG AAC CGG AGG CAA CAG TTG A	100
54	AGG ATT CAG AAG CTG TTT ACG AAG T AAT CCT CAT GGT CCA TCC AGT TTC A	329
55	ATG AGT TCA CTA GGT GCA CCA TTC T TGT TCA ATT GGA TCC ACA AGA GTG C	303
87-8/TaqI	GTC AGT TGG TCA GTA AAA GCC CAG ATC AGT CGA CCA ATT AAA ACC ACA GCA G	145 74 y 71
87-15/XmnI	GAC TGG AGC AAG GGT CGC C CTG ATG AAC AAT TTC CCT TTC ATT CCA G	740 520 y 220

VII. PCR MULTIPLE (M-PCR).

Con los 19 pares de oligonucleótidos sintetizados se formaron 4 grupos de acuerdo al tamaño de los productos de amplificación y a las condiciones para la PCR:

GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C	GRUPO D
16	pr1	6	8
43	12	48	13
45	17	51	19
47	50	53	55
49	52	54	

Se mezclaron de 500 ng de DNA genómico con una solución que contenía: amortiguador para el fragmento Stoffel de la Taq polimerasa (10mM Tris-HCl , pH 8.3, 50 mM KCl), 200 mM de dNTPs, 0.2-0.5 mM de oligonucleótidos iniciadores F y R, 1.5-3 U del fragmento Stoffel de la Taq polimerasa y 6.8 mM de $MgCl_2$ en un volumen final de 25-50 μ l (97). Como control positivo se agregó una muestra de un sujeto normal. Para asegurar ausencia de contaminación se incluyó como control negativo de cada reacción un tubo con todos los reactivos excepto DNA. Las condiciones óptimas para cada grupo se muestran en las tablas 7 a 10.

Las reacciones de amplificación se llevaron al cabo en un termociclador (DNA thermal Cycler 480 de Perkin Elmer) bajo los siguientes parámetros: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min seguida de 26 ciclos: desnaturalización a 94°C por 48 seg, alineación a 55°C por 48 seg y extensión a 68°C por 4 min, con una extensión final de 72°C por 5 min.

Los pasos que se siguieron para preparar la mezcla de reacción fueron los siguientes:

a) Se preparó una mezcla de amplificación (MA) en función de número de muestras, **b)** se colocó el DNA problema (1 μ l) en tubos ependorf de 0.5 ml., **c)** Al tubo con el DNA problema se adicionó 49 μ l de MA, **d)** Finalmente a cada tubo se le adicionaron 25 μ l de aceite mineral para evitar la evaporación de la muestra.

TABLA 7. Condiciones óptimas para PCR del grupo A.

Reactivo	Volúmen	[Stock]	[Final]
Agua	25.7 μ l		
Oligonuc. F	5 μ l	60 ng	6 ng
Oligonuc.R	5 μ l	60 ng	6 ng
mix dNTPs	4 μ l	10 mM	200 μ M
Polimerasa	0.3 μ l	10 U/ μ l	3 U/ μ l
MgCl ₂	5 μ l	100 mM	10 mM
DNA	5 μ l	100 ng/ μ l	500 ng/ μ l
Vol. final	50 μ l		

TABLA 8. Condiciones óptimas para PCR del grupo B.

Reactivo	Volúmen	[Stock]	[Final]
Agua	25.7		
Oligonuc. F	5 μ l	50 ng	5 ng
Oligonuc. R	5 μ l	50 ng	5 ng
Mix dNTPs	4 μ l	10 mM	200 μ M
Polimerasa	0.3 μ l	10 U/ μ l	3 U/ μ l
MgCl ₂	5 μ l	100 mM	10 mM
DNA	5 μ l	100 ng/ μ l	500 ng/ μ l
Vol. final	50 μ l		

TABLA 9. Condiciones óptimas para PCR del grupo C.

Reactivo	Volúmen	[Stock]	[Final]
Agua	15.7		
Oligonuc. F	10 μ l	15 ng	3 ng
Oligonuc. R	10 μ l	15 ng	3 ng
dNTPs	4 μ l	10 mM	200 μ M
Polimerasa	0.3 μ l	10 U/ μ l	3 U/ μ l
MgCl ₂	5 μ l	100 mM	10 mM
DNA	5 μ l	100 ng/ μ l	500 ng/ μ L
Vol. final	50 μ l		

TABLA 10. Condiciones óptimas para PCR del grupo D.

Reactivo	Volúmen	[Stock]	[Final]
Agua	15.7		
Oligonuc. F	10 μ l	10 ng	2 ng
Oligonuc R	10 μ l	10 ng	2 ng
dNTPs	4 μ l	10 mM	200 μ M
Polimerasa	0.3 μ l	10 U/ μ l	3 U/ μ l
MgCl ₂	5 μ l	100 mM	10 mM
DNA	5 μ l	100 ng/ μ l	500 ng/ μ l
Vol. final	50 μ l		

VIII. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.

Las muestras amplificadas (8-12 ml) se corrieron durante 1 h a 85 V en un gel de agarosa al 1%. Los productos de PCR se visualizaron y se fotografiaron en un transiluminador de luz UV. Se corroboraron los pesos moleculares de cada amplificado en base a su migración y con respecto al marcador de pesos λ /Hind III o ϕ X 174/HaeIII. El gel se tiñó con bromuro de etidio a una concentración final de 1 μ g/ml.

IX. ANALISIS DE RFLPs.

IX.1. Amplificaciones de las regiones pERT87.15 y pERT87.8. Se analizaron dos sitios polimórficos intragénicos del locus DMD (Roberts y cols., 1989), ampliamente utilizados en otras poblaciones (91): pERT87.15/XmnI y pERT87.8/TaqI. La amplificación de estos sitios polimórficos se llevó al cabo mezclando 500 ng de DNA genómico, 2 U del fragmento Stoffel de la enzima Taq polimerasa, 0.1 μ mol de cada oligonucleótido iniciador (Tabla 11), 1.5 mmol/l de MgCl₂ en un volumen de reacción final de 50 μ l. La amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: se inició con una desnaturalización 94 °C por 5 min, seguido de 25 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineación a 54 °C por 1 min y extensión a 70°C por 1 min y una elongación final a 70°C por 5 min. Al igual que para M-PCR se utilizó un control negativo y un control positivo.

IX.2. RESTRICCIÓN DE DNA.

Para el análisis de los RFLPs se incubaron 5 μ l de los productos de amplificación con 3U de la enzima XmnI o 5U de TaqI durante 2 horas a 65° o 37°C respectivamente, bajo las condiciones recomendadas por el proveedor (New England Biolabs).

TABLA 11. Condiciones óptimas para PCR de los polimorfismos.

Reactivo	Volúmen	[Stock]	[Final]
Agua	34.7		
Oligonuc. F	1 μ l	100 ng	2 ng
Oligonuc.R	1 μ l	100 ng	2 ng
dNTPs	4 μ l	10 mM	200 μ M
Polimerasa	0.3 μ l	10 U/ μ l	3 U/ μ l
MgCl ₂	4 μ l	100 mM	8 mM
DNA	5 μ l	100 ng/ μ l	500 ng/ μ l
Vol. final	50 μ l		

X. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

Los productos de digestión se sometieron a una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% mezclando previamente 10 a 15 μ l del DNA digerido con 0.1 volúmenes de colorante. Las muestras se depositaron en los pozos del gel y se sometieron a un campo eléctrico de 2 V/cm durante 2 horas. El gel se tiñó con bromuro de etidio, posteriormente se visualizaron los fragmentos restringidos en un transiluminador con luz UV y por último se fotografió en películas polaroid 667, utilizando filtros rojo y amarillo.

Se corroboraron los pesos moleculares de los productos de digestión en base a su migración con respecto a los marcadores.

Como marcadores de peso molecular se utilizaron 500 ng del DNA del fago lambda digerido con la enzima HindIII y DNA del fago ϕ X 174 digerido con la enzima Hae III. La solución amortiguadora de corrida consistió en Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM pH 8 (TBE).

XI. CORRELACION FENOTIPO-GENOTIPO.

Este análisis se realizó de acuerdo a la hipótesis de Mónaco (34) donde en base al número de nucleótidos en el extremo 3' del último exón deletado (nucleótido 1, 2 o 3) y del último exón que se conserva se puede inferir pérdida del marco de lectura. Así, la unión de los exones que quedan adyacentes después de la mutación influyen en el cambio del marco de lectura cuando estos son diferentes y condicionan un fenotipo grave tipo Duchenne, mientras que aquellos que terminan en el mismo nucleótido no lo cambian y se correlacionan con fenotipo leve o Becker.

XII. ANALISIS ESTADISTICO.

Los datos obtenidos se compararon mediante la prueba de chi cuadrada, se consideró diferencia estadísticamente significativa, cuando la $p < 0.05$.

RESULTADOS

Se captaron 61 familias de la consulta externa de Genética del INP (168 individuos), de los cuales 56 se diagnosticaron con DMD y 5 con DMB. El resto de los individuos fueron familiares en 1er grado: 96 mujeres (61 madres y 35 hermanas) y 11 hombres.

I. CUADRO CLINICO.

A todos los pacientes se les realizó historia clínica completa incluyendo pedigree, determinación de CPK en suero, biopsia muscular y electromiografía. Los pacientes se clasificaron como DMD o DMB en base a la gravedad del cuadro clínico, tomando en cuenta la edad de inicio, evolución y edad de la pérdida de la deambulación. Así, los pacientes de inicio temprano que dejaron de caminar antes de los 15 años se clasificaron como DMD, mientras que los pacientes de inicio tardío y pérdida de la deambulación después de los 15 años se consideraron DMB.

Se encontró que el 100% de los pacientes tenían altas concentraciones de CPK en suero y en sólo 3 casos las madres resultaron con niveles altos de la enzima. Todos los pacientes presentaron patrón miopático tanto en el estudio histopatológico como en la electromiografía.

De los 61 pacientes encontramos sólo 7 (11.5%) con retraso psicomotor (RPM). De este grupo de pacientes, cinco de ellos tenían antecedentes familiares de DMD y el RPM sólo se documentó en dos primos hermanos. Los análisis de pedigree mostraron que sólo el 21.3% de las madres eran portadoras obligadas.

II. CREACION DEL BANCO DE DNA.

En todos los casos la concentración de DNA fue superior a $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$, como criterio de pureza se tomó un cociente mayor a 1.6 calculado de la relación entre los valores obtenidos a 260 nm

222868

(ácidos nucleicos) y 240 nm (fenol contaminante) o 280 nm (proteínas). En todos se logró obtener un DNA íntegro (Fig 15).

III. DETECCIÓN DE DELECCIONES POR M-PCR.

Después de crear el banco de DNA se establecieron las condiciones óptimas para la amplificación de varios exones en la misma reacción de PCR (M-PCR). Se utilizaron muestras de DNA de individuos sanos para estandarizar la reacción y obtener los testigos positivos.

Para la realización de este procedimiento se probaron varias concentraciones de los oligonucleótidos, dNTPs, Magnesio y DNA. Además se estandarizaron las temperaturas de alineación y números de ciclos. Inicialmente se obtuvieron las condiciones requeridas para la amplificación individual de cada exón (Fig 16) encontrando que las concentraciones de los oligonucleótidos estuvieron en un rango de 20 a 70 ng y la cantidad de Mg^{2+} óptima para la reacción fue de 10 mM (Fig. 17). La temperatura de alineación y el número de ciclos fue dependiente del contenido de G y Cs en los oligonucleótidos. Las concentraciones de dNTPs y DNA fue la misma para cada reacción. Así, los parámetros críticos para la amplificación fueron la temperatura de alineación, el número de ciclos y la concentración de $MgCl_2$. En base a estos parámetros se amplificaron 19 exones en cuatro reacciones, dividiendo los oligonucleótidos (A,B,C y D) de acuerdo con los tamaños de los productos de PCR y las condiciones requeridas.

En la figura 18 se muestran algunos pacientes amplificados con los 4 grupos empleados para PCR múltiple. En las tablas 7-10 se muestran las concentraciones de los reactivos y las temperaturas necesarias para la amplificación de cada grupo.

Se identificaron deleciones en el 54.1% de los casos índice (n=33) de los cuales 30 fueron DMD y 3 DMB (Tabla 12) De todos estos, 26 (79%) presentaban la deleción en la región central, 5 (12%) en la región 5' (uno de ellos con deleción del promotor) y 4 (9%)



FIGURA 16. Estandarización de los oligonucleótidos para la PCR. Carril 1: marcador de pesos, carriles 2-4: exón 45; carriles 5-7: exón 48; carril 8: promotor 1; carril 9 control negativo

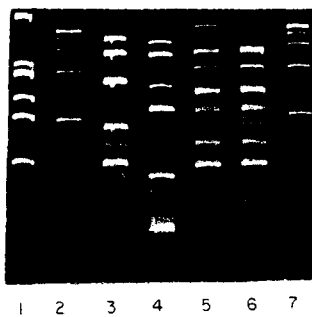


FIGURA 17. Curva para obtener concentración optima de Magnesio. Carril 1: marcador de pesos moleculares, carriles 2 y 7: Grupo A con MgCl_2 10 mM; carril 3: grupo B utilizando 12 mM de MgCl_2 , carril 4: grupo C amplificado con 11 mM de MgCl_2 , carril 5 y 6: grupo D utilizando 12 mM de MgCl_2 .

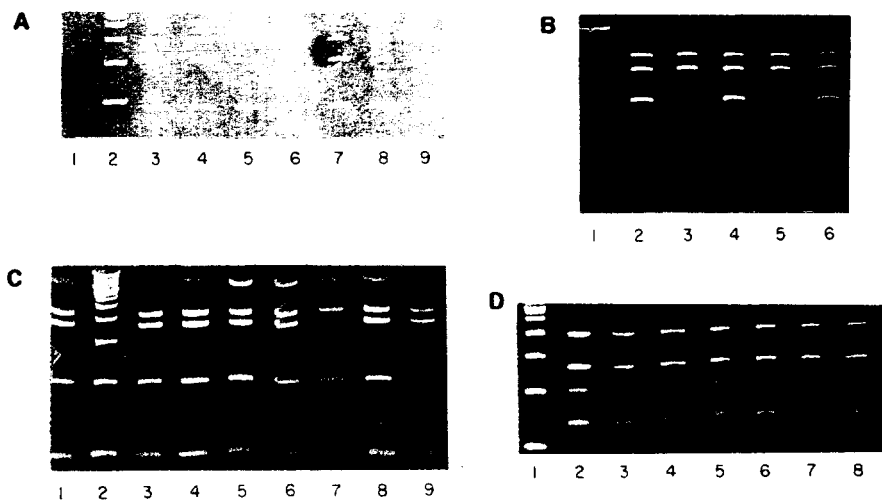


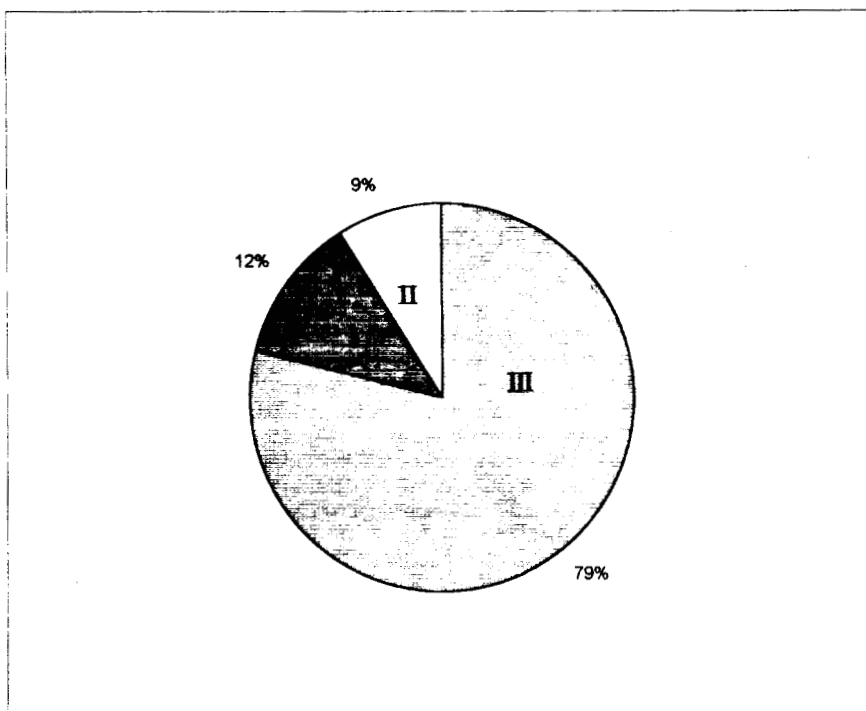
FIGURA 18. PCR múltiple de los pacientes con DMD/DMB. A) Amplificación del grupo A, carril 1 control negativo, carril 2: marcador de peso molecular $\phi X174$, carril 3 control positivo, carriles 4-9: pacientes con DMD; B) PCR del grupo B, carril 1: marcador de peso molecular λ /HindIII, carril 2 control positivo, carriles 3-4: pacientes con DMB, carriles 5-6: pacientes con DMD, C) Amplificación de grupo C, carril 1: control positivo, carril 2: marcador de peso molecular $\phi X174$; carriles 3-9: pacientes con DMD, D) Amplificación de grupo D: carril 1: marcador de peso molecular $\phi X174$, carril 2: control positivo; carriles 3-5: pacientes con DMD; carriles 6-8: pacientes con DMB.

en la región 5' (uno de ellos con delección del promotor) y 4 (9%) tenían delección completa del gen (Fig 19). Los exones que se encontraron deletados con mayor frecuencia fueron el 48, 49, 50, 47 y 45 (anotados en orden de frecuencia), mientras que ningún paciente con delecciones parciales presentó pérdida de los exones 8 y 17 (Fig 20). La mayoría de los casos presentó pequeñas delecciones involucrando uno o varios exones (Fig. 21). En la figura 22 se muestra un ejemplo de la heterogeneidad de las mutaciones encontradas en varios casos índice. Las delecciones completas del gen o del promotor y de los exones localizados en la región 5' sólo se encontraron en pacientes con DMD. El análisis de los hermanos afectados mostró la misma delección que en el caso índice mientras que en los 6 hermanos sanos no hubo delecciones en los 19 exones analizados (fig 23). En la figura 24 se esquematizan las delecciones identificadas en los "puntos calientes" en los 61 individuos estudiados por PCR múltiple, utilizando los 4 grupos de oligonucleótidos para la amplificación múltiple. En un intento de correlacionar el diagnóstico clínico DMD/DMB con con el tipo de delección parcial (33 pacientes), nos basamos en la hipótesis de Mónaco (34). El efecto que tienen las diversas delecciones encontradas sobre el marco de lectura, se dedujo del conocimiento en la secuencia y los límites de cada exón y de empalmar los límites de los exones que quedaban contiguos por efecto de la mutación (Roberts 1993 (38)) (tabla 13).

Este análisis nos permitió inferir cambios en el marco de lectura en 24 de 30 pacientes con DMD (80%). De los 3 pacientes con Becker sólo en uno se conservó el marco de lectura, ya que presenta una delección del exón 6. Los otros dos casos con DMB presentaron delección en el exón 45 y los exones 47-48 (tabla 14).

TABLA 12. Frecuencia de deleciones en el gen DMD.

Cuadro clínico	Pacientes	
	No.	%
DMD n=56	30	53.6
DMB n=5	3	



III REGION CENTRAL
I REGION PROXIMAL
II DELECIÓN COMPLETA

FIGURA 19. Distribución de las deleciones por región.

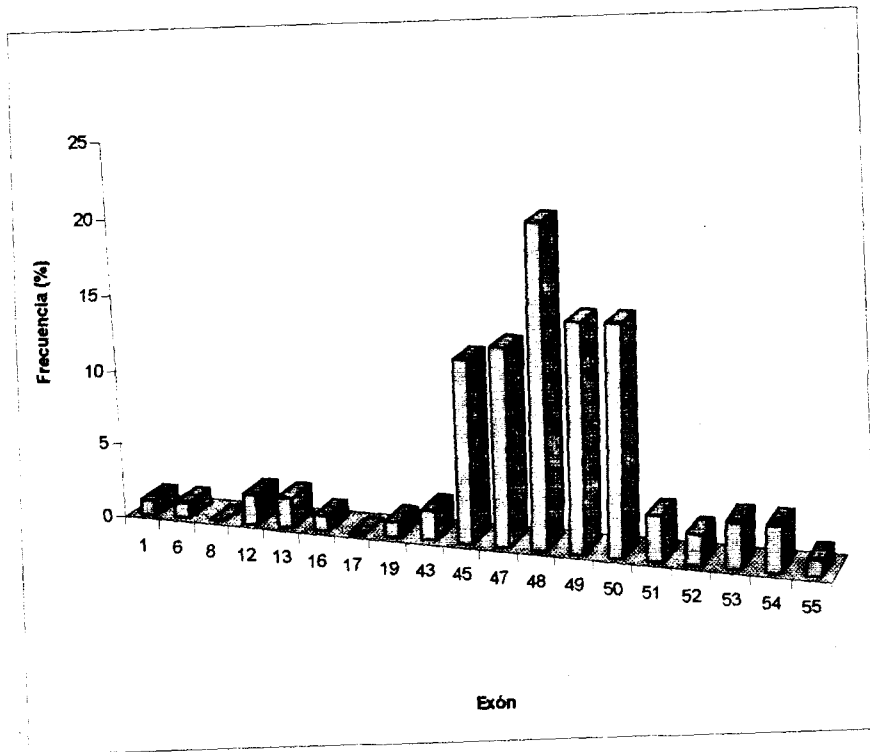


FIGURA 20. Frecuencia de las deleciones por exón en los pacientes estudiados

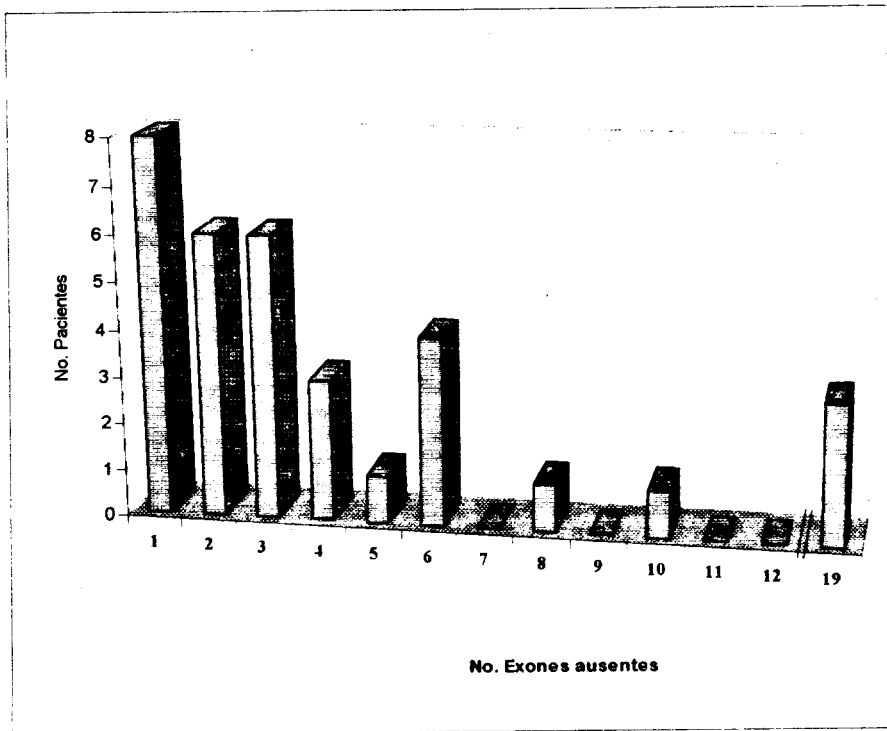


FIGURA 21. Frecuencia por paciente del número de exones deletados.

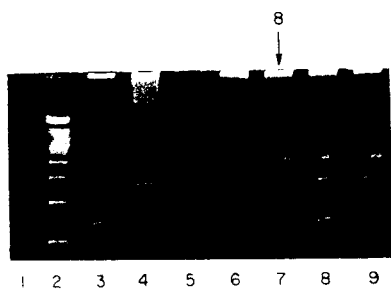


FIGURA 22. PCR múltiple de pacientes con DMD. A) Amplificación del grupo D: carril 1. control negativo, carril 2: marcador de pesos OX174 , carril 3. control positivo, carriles 4,6,8 y 9: pacientes con DMD.

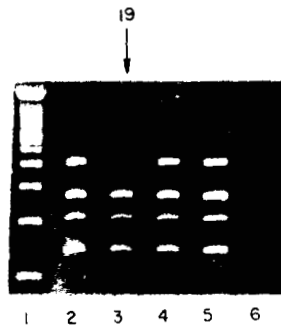


FIGURA 23. PCR en una familia con un caso de DMD. Carril 1: marcador de pesos ØX174 ; carril 2: control positivo, carril 3: paciente con delección en el exón 19, carriles 4,5: hermanos sanos, carril 6: control negativo.

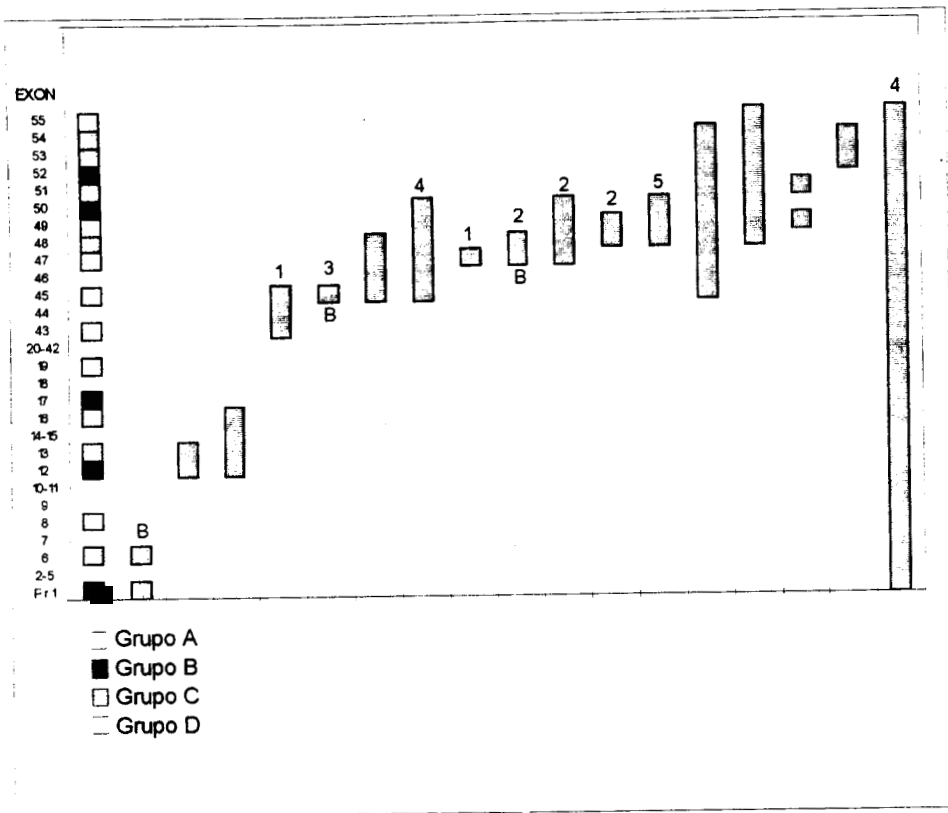


FIGURA 24. Localización y tamaño de las deleciones en los pacientes con DMD/DMB.

222868

TABLA 13. Correlación de las deleciones con el efecto que ocasionan en el marco de lectura de los pacientes con o sin antecedentes familiares.

paciente	Antecedentes familiares	exones eliminados	Diagnóstico	Mutación £
1	sin	48-50	DMD	cambio de marco
2	sin	45-50	DMD	cambio de marco
3	sin	45-48	DMD	cambio de marco
4	con	47-48	DMB	cambio de marco
5	sin	12-16	DMD	en marco
6	sin	48-49	DMD	en marco
7	con	48-49	DMD	en marco
8	con	45-50	DMD	cambio de marco
9	sin	1-55	DMD	cambio de marco
10	sin	Pr1	DMD	cambio de marco
11	con	47-50	DMD	cambio de marco
12	sin	47	DMD	cambio de marco
13	con	1-55	DMD	cambio de marco
14	con	53-54	DMD	cambio de marco
15	sin	48-50	DMD	cambio de marco
16	sin	48-50	DMD	cambio de marco
17	sin	45-50	DMD	cambio de marco
18	sin	43-45	DMD	en marco
19	sin	45-54	DMD	en marco
20	sin	48-55	DMD	cambio de marco
21	sin	45	DMD	cambio de marco
22	con	47-48	DMD	cambio de marco
23	sin	1-55	DMD	cambio de marco
24	con	6	DMB	en marco
25	sin	48-50	DMD	cambio de marco
26	sin	48-50	DMD	cambio de marco
27	sin	12-13	DMD	en marco
28	con	45	DMD	cambio de marco
29	sin	45-50	DMD	cambio de marco
30	sin	50	DMD	cambio de marco
31	sin	45	DMB	cambio de marco
32	sin	47-50	DMD	cambio de marco
33	con	51	DMD	cambio de marco

£ Efecto de la mutación sobre el marco de lectura

cambio de marco=interrumpe el marco de lectura del gen; en marco= no interrumpe el marco de lectura.

TABLA 14. Proporción de deleciones que cambian o mantienen el marco de lectura en el gen DMD.

Región analizada	DMD		DMB	
	Cambio de marco	En marco	Cambio de marco	En marco
EXON 1-20	2	2	0	1
EXON 43-55	19	4	2	0
Delección completa	3			
TOTAL: 33	80 %	20 %	2	1

De los 7 pacientes con RPM, cinco presentaron deleciones en el gen, uno de ellos mostró pérdida total del gen y 4 deleciones parciales localizadas en la región central.

IV. DETECCION DE PORTADORAS.

ANALISIS DE LOS POLIMORFISMOS pERT87.8/TaqI y pERT87.15/XmnI (RFLPs) MEDIANTE EL USO DE LA PCR.

En esta parte se estudiaron 264 alelos de 61 familias en las que se contaba cuando menos con el caso índice y la madre. Los alelos provenian de 61 madres (13 portadoras obligadas), 61 casos índice, 35 hermanas y 11 hombres sanos. El grupo de familias era mayor pero se excluyeron algunas familias: una con deleción de los exones 12 y 13 donde no amplificó la región para el polimorfismo TaqI (T) localizado en el intrón 12 y la madre fue homocigota (no informativa) para el polimorfismo XmnI (X); los otros fueron aquellos donde no se contaba con muestra de la madre para el análisis RFLPs. En dos pacientes con deleción completa del gen, en las madres no pudimos definir si este patrón fue debido a que las madres son homocigotas (no informativas) para los polimorfismos estudiados o presentan deleción completa de uno de sus alelos. Por ello, el análisis sólo se realizó en 264 alelos provenientes de 61 familias.

El producto amplificado para estudiar el polimorfismo X es de 740 pb, que al ser digerido por la enzima XmnI se corta en 2 fragmentos uno de 520 y otro de 220 pb (fig 25). El producto amplificado para estudiar el polimorfismo T es de 145 pb, que cuando es digerido con la enzima TaqI se generan 2 fragmentos uno de 71 y el otro de 74 pb (tabla 15). Por convención, se denomina alelo 1 (T1 y X1) al que no contiene el sitio de restricción

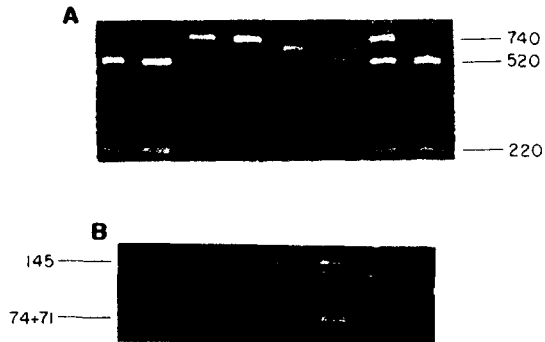


FIGURA 25. A) Tamaño de los alelos XmnI. Carriles 1-2: pacientes que presentan el alelo X2, carriles 3-4: pacientes que muestran el alelo X1, carril 5: marcador de peso molecular lambda/HindIII, carriles 6 y 8: madres homocigotas para el alelo X2, carril 7: madre heterocigota X1/X2. **B)** Tamaño de los alelos TaqI. Carriles 1-4: madres heterocigotas T1/T2, carril 5: control positivo, carril 6: marcador de peso molecular lambda/HindIII, carril 7: control negativo

TABLA 15. Tamaño de los alelos producidos por las enzimas de restricción.

LOCUS	Enzima	Sitio de Restric.	longitud alelo (pb)
pERT87.15XmnI	XmnI	1	740
		2	520+220
pERT87.8 TaqI	TaqI	1	145
		2	74+71

para la enzima y alelo 2 (T2 y X2) al que si lo tiene. La combinación de los polimorfismos X y T definen 4 haplotipos: T1-X1, T1-X2, T2-X1 y T2-X2.

V. FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS Taq I y XmnI EN PACIENTES.

La frecuencia de los alelos se muestra en la tabla 16; el alelo que se presentó con mayor frecuencia fue el T2 (59%), seguido del X1 (55.9%).

El análisis de los haplotipos mostró una frecuencia similar entre los X2:T2, X1:T1 y X1:T2, sin embargo la frecuencia del haplotipo X2:T1 fue significativamente más baja (10.2%) (tabla 17). Para buscar si existe asociación entre haplotipos y mutaciones, se calculó la frecuencia de éstos en los alelos sanos y enfermos, sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre ellos.

FRECUENCIA DE RFLPs EN LAS MADRES DE LOS CASOS INDICE.

De las 61 madres estudiadas encontramos que el 54.1% fue heterocigota para el polimorfismo pERT87.15XmnI, encontrando la misma frecuencia para el marcador pERT87.8TaqI (tabla 18) Cabe mencionar que en las mujeres homocigotas al igual que en los pacientes el alelo T2 fue el que se presentó con mayor frecuencia. Al combinar los polimorfismos en las madres, encontramos que el 75.4% fue heterocigota al menos para uno de ellos (tabla 19). La frecuencia de heterocigocidad obtenida en los dos polimorfismos fue similar, siendo de 0.5 para XmnI y 0.48 para TaqI. Además se comparó con las frecuencias reportadas para otra poblaciones, mostrando diferencias con otras razas étnicas (tabla 20). El análisis de los haplotipos mostró una frecuencia similar ($p < 0.05$) entre los haplotipos

TABLA 16. Frecuencia de los alelos en pacientes con DMD/DMB.

RFLP	ALELO	PACIENTES (n=61)	
		No.	%
XmnI	1	34	55.9
	2	27	44.1
TaqI	1	25	41.0
	2	36	59.0

**TABLA 17. Frecuencia de haplotipos en pacientes con DMD/DMB:
pERT87.5XmnI / pERT87.8TaqI**

	2:2	2:1	1:1	1:2
No.	20	6	18	15
%	33.9	10.2	30.5	25.4

TABLA 18. Frecuencia de alelos en madres.

GENOTIPO	pERT87.15 XmnI		pERT87.8 TaqI	
	No.	%	No.	%
1	30	24.6	16	13.1
2	26	21.3	40	32.8
1/2	66	54.1	66	54.1

TOTAL

122 CROMOSOMAS

TABLA 19. Frecuencia de madres heterocigotas para pERT87.15XmnI y pERT87.8TaqI.

GENOTIPO* (XmnI:Taq I)	CROMOSOMAS MATERNOS	
	No.	%
1/2:1/2	40	32.8
1/2:1	6	4.9
1/2:2	20	16.4
1:1/2	16	13.1
2:1/2	10	8.2
TOTAL	122	75.4

* El 25.6% es homocigota para ambos polimorfismos

X1:T1, X1:T2 y X2:T2, sin embargo la frecuencia del haplotipo X2:T1 al igual que en los pacientes fue significativamente más baja (14%) (tabla 21).

VII. FRECUENCIA DE RECOMBINACION

En dos casos donde el paciente tuvo un hermano sano se logró detectar un evento de recombinación en la región 5' del gen DMD. En ambas familias la madre fue heterocigota para los polimorfismos X y T por lo que las únicas alternativas para las madres fueron los haplotipos X1/T1-X2/T2 o X1/T2-X2/T1. En la primera familia se encontró en el paciente el haplotipo X1/T2 por lo que se esperaba caracterizar en el hijo sano el alelo X2/T1, sin embargo éste tuvo la combinación X1/T1. La segunda familia fue un caso similiar donde el caso índice mostró el haplotipo X1/T2, sin embargo en el hermano sano donde se esperaba encontrar X2/T1, se demostró la presencia del X1/T1. Así, aunque estos hallazgos demuestran que la recombinación no ocurrió en la madre, en ninguna de las dos familias se logró identificar en cual de los hijos sucedió la recombinación.

La frecuencia de recombinación se calculó tomando en cuenta el número de alelos con recombinación (2) y el número de meiosis (100). Esta fue del 2%, para la región 5' en nuestra población de estudio

TABLA 20. Frecuencia de heterocigocidad de pERT87.15/XmnI y pERT87.8/TaqI

Polimorfismo	tamaño de alelo	frec. del alelo	No. de cromosomas	frec. heteroc. esperada	χ^2
pERT87.15XmnI					
TURCOS ⁶⁷	740	0.26	122	0.38	26
	520+220	0.74			9.13
MESTIZOS	740	0.52	122	0.50	
	520+220	0.48			
ANGLOSAJON ⁸⁵		0.54	55	0.50	0.074
		0.46			0.087
pERT87.8 TaqI					
TURCOS ⁶⁷	145	0.24	117	0.36	10.7
	74+71	0.76			3.37
MESTIZOS	145	0.40	122	0.48	
	74+71	0.60			
ANGLOSAJON ⁸⁵		0.36	79	0.46	0.44
		0.64			0.25

*p < 0.05

TABLA 21. Frecuencia de haplotipos en madres.

GENOTIPO	No.	%
1:1	33	27
1:2	31	25
2:1	17	14
2:2	41	34
TOTAL	122	100

VIII. ASESORAMIENTO GENETICO.

Para el asesoramiento genético se realizó un análisis de la segregación de los alelos. En 10 familias la madre fue heterocigota y portadora obligada, sin embargo sólo en 8 fue posible la detección de las portadoras por el estudio de RFLPs en las hijas, ya que en el resto el paciente era hijo único o se requería conocer el genotipo del padre pero éste no acudió a la consulta. En 2 familias más en las cuales no había antecedentes familiares se logró excluir el estado de portador por seguimiento del alelo en riesgo.

En la figura 26 se muestra un ejemplo del análisis del polimorfismo X en una familia con antecedentes familiares donde la madre, portadora obligada, fue heterocigota para este marcador (X1:X2) (carril 3). El alelo afectado fue el X2, ya que éste se encontró en el caso índice (carril 6). De cinco hermanas cuatro heredaron el alelo X1 de la madre y el X2 del padre (carril 2) por lo que no son portadoras de la mutación (carriles 4,5,8,9); sin embargo una de las hermanas heredó el alelo X2 de la madre ya que fue homocigota para este polimorfismo (X2:X2) (carril 7), por lo que es portadora de la mutación.

Otra familia con antecedentes heredofamiliares y donde el polimorfismo T fue informativo se muestra en la figura 27 en el caso índice (carril 8) y en su hermano afectado (carril 9) se encontró el alelo T1, mientras que en el hermano sano se localizó el T2 (carril 10). Las cuatro hermanas heterocigotas T1/T2 (carriles 3,4,6 y 7) heredaron el alelo T1 del padre (carril 2) y el alelo T2 de la madre (carril 1). Dado que este último alelo no está afectado en la madre, ninguna de las hijas es portadora.

Por otra parte en dos familias donde no existen antecedentes heredofamiliares se logró excluir el estado de portador. En una de ellas la madre heterocigota para el polimorfismo X



FIGURA 26. Polimorfismo pERT87.15-XmnI en una familia con antecedentes familiares Carril 1: marcador de pesos λ /HindIII, carril 2: padre; carril 3: madre; carriles 4,5,8 y 9: hermanas no portadoras, carril 6: caso índice, carril 7: hermana portadora

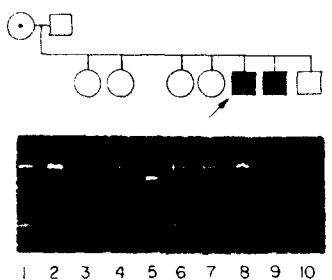


FIGURA 27. Análisis del polimorfismo pERT87.8-TaqI en una familia con antecedentes familiares. Carril 1: madre portadora obligada, carril 2 padre, carriles 3,4,6y7. hermanas heterocigotas no portadoras, carril 5 marcador de peso molecular λ /HindIII, carril 8: caso índice, carril 9 hermano afectado, carril 10 hermano sano.

heredó a sus tres hijos varones el alelo X2 (carriles 1-3), dado que dos de ellos son sanos, se deduce que la mutación ocurrió *de novo* en el paciente (fig. 28). El otro caso fue una familia donde la hermana es homocigota para ambos polimorfismos (X2/T2). El alelo afectado fue el X1/T1 identificado en el paciente, por lo que se descarta que la hija sea portadora.

Con este análisis se logró hacer el diagnóstico de certeza en el 68.5% de las hermanas; de 35 hermanas 9 fueron portadoras y 15 no portadoras. En el resto (11) la madre no fue informativa por RFLPs o se requería la muestra del padre.

El asesoramiento genético se otorgó con certeza en las 24 hermanas diagnosticadas y en forma empírica a las 11 restantes.

Además en cuatro madres en las cuales no habían antecedentes heredofamiliares fue posible diagnosticarlas como no portadoras.

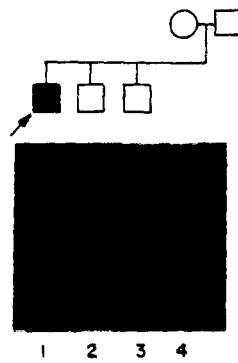


FIGURA 28. Análisis de polimorfismo pERT87.15-XmnI en una familia sin antecedentes familiares. Carril 1: caso índice; carriles 2y3: hermanos sanos; carril 4: madre.

DISCUSION.

La aplicación de la biología molecular en el estudio de las enfermedades hereditarias ha aportado información muy valiosa en relación a ellos y ha mejorado los métodos de diagnóstico no sólo en los padecimientos analizados en este trabajo sino también, en muchos otros donde el defecto es invalidante o letal. Uno de los avances más importantes en las DMD/DMB fue la identificación de las alteraciones moleculares en individuos afectados y en las portadoras (8,14,74,82,86-91) lo que permite establecer asesoramientos genéticos de certeza y también es posible el diagnóstico prenatal.

Las DMD/DMB son enfermedades degenerativas progresivas que, principalmente en el tipo Duchenne, conducen a la muerte antes de los 20 años. No existe un tratamiento definitivo hasta el momento, por lo que mundialmente los principales esfuerzos a nivel clínico son de tipo preventivo (diagnóstico de portadoras y diagnóstico prenatal) (10,20,56,67,74). Los ensayos de terapia génica empiezan a revelar resultados alentadores en modelos animales (7,15), sin embargo aún existe una enorme brecha para su aplicación en los humanos (12,15)

Las deleciones en el gen DMD se pueden identificar empleando técnicas como "Southern blot" o "M-PCR", esta última metodología tiene ventajas con respecto a la primera ya que es menos costosa, más rápida y permite la identificación del 98% de las mutaciones observadas por el "Southern blot" (73).

En el presente trabajo de 61 familias que acudieron a la consulta externa de Genética del INP, sólo en 13 de ellas (21.3%) se documentó el estado de portadora por el análisis del

árbol genealógico. Esto tuvo implicaciones importantes pues en el resto de las familias sólo fue posible un asesoramiento genético empírico. Estudios previos indican que en DMD y DMB, un tercio de los casos son familiares, un tercio son nuevas mutaciones surgidas en la madre y un tercio son nuevas mutaciones en el individuo afectado (12,20,21).

Los datos anteriores demuestran la necesidad de implementar nuevas estrategias para la detección de portadoras en nuestra población, por lo que nos propusimos caracterizar las mutaciones más frecuentes responsables de esta enfermedad.

Se buscaron las deleciones por M-PCR en el DNA de 56 pacientes con DMD y 5 pacientes con DMB. Se realizó la amplificación de 19 exones que involucran los dos “puntos calientes” del gen, descritos en la literatura. En este análisis se observaron deleciones en 33 de los 61 pacientes analizados (54.1%).

A pesar de que se cree que no existen diferencias étnicas para la presentación de dichas mutaciones, los resultados obtenidos en este trabajo en cuanto a la localización de las deleciones (85% en la región central y 15% en la región 5'), sugieren influencia del acervo genético de las poblaciones, ya que esta distribución es diferente a la descrita anteriormente para otras poblaciones donde se señala que la frecuencia de las deleciones en la región central es del 50-60% y en la región 5' del 30% (15,65,75). En apoyo a esto, existe un reporte donde se analizaron 62 pacientes con DMD de origen israelita y se encontró que la frecuencia de las deleciones alcanzaba apenas el 37%, siendo ésta la única población que se conoce con una frecuencia diferente a la reportada (93). La distribución de las deleciones en la población estudiada, posiblemente refleja el efecto de la carga genética de la raza mestiza.

Sin embargo, sería importante analizar un mayor número de pacientes para determinar si este patrón de deleciones se conserva.

Aunque la aplicación de la PCR para el análisis de deleciones en DMD/DMB es una herramienta de gran utilidad para delinear la extensión de las mutaciones en la mayoría de los casos, quedan aún 28 pacientes (45.9%) donde no fue posible caracterizar las mutaciones, posiblemente porque éstas se encuentran en regiones que no analizamos o bien sean mutaciones puntuales o duplicaciones que no se pueden identificar por esta técnica. Es por ello que es necesario complementar el estudio con otras técnicas como PCR cuantitativa y Análisis Conformacional de Cadena Sencilla (SSCP), para identificar la totalidad de las mutaciones que afectan a estos pacientes.

Por otra parte, es bien sabido que la extensión de las deleciones parciales no tiene relación con la gravedad del fenotipo. Existen varios reportes (31,65) donde se muestra que deleciones que afectan del 30% al 50% del gen, conservan el marco de lectura produciendo fenotipos benignos. De acuerdo a la hipótesis de Mónaco el cuadro clínico depende del efecto de la mutación sobre el marco de lectura lo que repercute en la cantidad y en la función de la distrofina, por esta razón, los pacientes con DMB presentan un fenotipo menos grave que los de DMD en quienes hay ausencia de distrofina (34). Se ha observado que en el 93% de los casos, la severidad clínica de la enfermedad puede predecirse por la regla de Mónaco. En la tabla 14 se muestra que 24 (80%) de los 30 pacientes con DMD y 2 de los 3 con DMB que presentaron deleciones, tuvieron cambio en el marco de lectura, ya que el tipo de límite de los exones que quedan adyacentes después de la mutación fueron diferentes. Malhotra y cols en 1988 proponen tres mecanismos que pueden ocasionar las

excepciones a la regla del marco de lectura en los exones 3-7 y del 44-52: 1) "splicing" alternativo de los exones 2-9 o 1-8 que da como resultado un mRNA en marco, 2) presencia de un solo sitio de iniciación de la traducción después del exón 8 y 3) presencia de un promotor secundario (79). Además se ha propuesto que puede existir un mecanismo alterno para generar una proteína con función residual (65,74,77,79). Así, las deleciones que cambian el marco de lectura en pacientes con fenotipo Becker pueden ser explicadas por los mecanismos mencionados, ya que los 2 pacientes con DMB presentaron deleciones que incluyen los exones 45 y 47-48. Para conocer más el efecto de estas mutaciones sería importante determinar la concentración de la distrofina en los pacientes que presentan estas mutaciones

En los dos pacientes con DMB donde las deleciones cambian el marco de lectura (exones 45 y 47-48), corresponden a las excepciones que existen a esta regla, podrían ser consecuencia de procesamientos alternativos del RNA, que restauran el marco de lectura y por consiguiente la proteína es parcialmente funcional (12,77).

Tradicionalmente, el diagnóstico de portadoras se realiza mediante estudios genéticos con análisis bayesiano y la medición de CPK sin embargo éstos son poco confiables. En este estudio los valores de CPK fueron normales en 12 de las 13 (92.3%) mujeres portadoras obligadas. Además la elevación de esta enzima no es patognomónica de las DMD/DMB, sino que también se incrementa en otras distrofinopatías.

La aplicación de la PCR para buscar directamente las deleciones en mujeres portadoras, tiene grandes limitaciones dada la presencia de un alelo normal en las mujeres en riesgo. Por estudios clínicos sólo se logró identificar en el 21.3% de los casos familiares, a

las madres portadoras obligadas quedando un buen número de portadoras probables con riesgo empírico.

Por lo anterior, en el presente trabajo se utilizó otra metodología desarrollada en la última década que ha permitido la aplicación de estrategias indirectas para la detección de portadoras donde no se requiere la caracterización de las mutaciones del gen (8,21,54,57). Estas técnicas tienen como fundamento la identificación de marcadores alélicos, polimórficos en la población (presentes en más del 1% de los cromosomas normales) que permiten el seguimiento de la segregación de los alelos en una familia. A la fecha se han descrito dos clases importantes de secuencias polimórficas: los VNTRs, que son secuencias repetidas en tandem que varían en número de repeticiones de un alelo a otro y, las secuencias polimórficas para sitios que son reconocidos por endonucleasas y que pueden estar presentes o no en un mismo locus en cromosomas homólogos por lo que la restricción con enzimas específicas conducen a la generación de RFLPs. Sin embargo, estos métodos indirectos tienen limitaciones importantes que deben de ser tomadas en consideración antes de su aplicación, estas son: 1) la frecuencia de los polimorfismos alélicos es variable en diferentes poblaciones, por lo que se requiere conocer la frecuencia de cada alelo en la muestra a estudiar; 2) la madre debe ser heterocigota para los polimorfismos estudiados (madre informativa); 3) en la mayoría de los casos la madre debe ser portadora obligada para asegurar la asignación o exclusión del estado de portadora en las hijas y 4) el gen DMD tiene una frecuencia relativamente elevada de recombinación intragénica, lo cual puede dar falsos positivos y falsos negativos.

Con el propósito de establecer las estrategias para la detección de portadoras, en el presente trabajo se determinó la frecuencia dos RFLPs localizados en la región pERT87: TaqI y XmnI. Estas frecuencias se compararon con dos poblaciones donde se realizó un análisis similar y fue diferente a sólo una de ellas (turcos) ($p > 0.05$). Desafortunadamente no se logró conocer la frecuencia en poblaciones relacionadas con la nuestra para documentar si existen diferencias raciales en la distribución de estos polimorfismos.

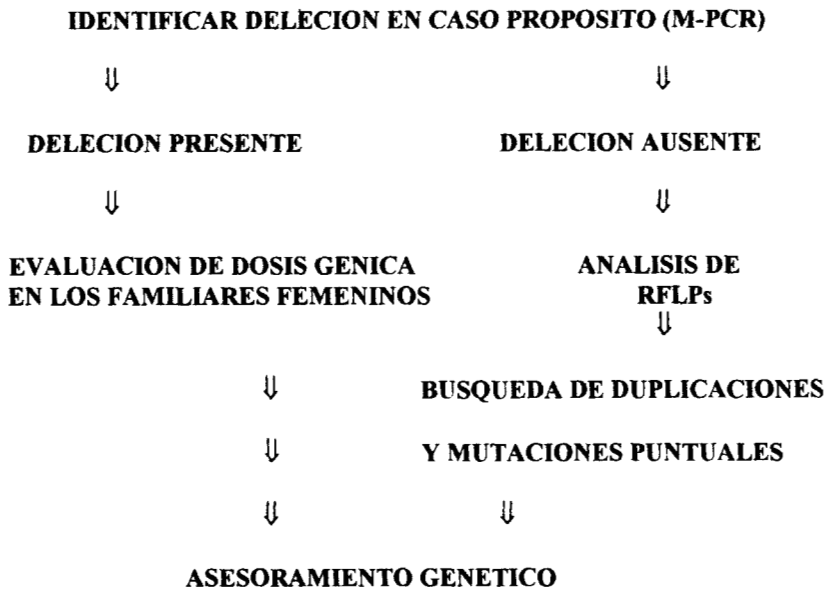
Para buscar si existe asociación entre haplotipos y mutaciones, se calculó la frecuencia de éstos en los alelos sanos y enfermos, sin embargo no se encontraron diferencias significativas. Estos resultados posiblemente son el reflejo de la alta tasa de mutación que presenta el gen DMD, lo que disminuye la posibilidad de ligamiento entre éstas y marcadores genéticos ya que, aparentemente cualquier alelo tiene la misma posibilidad de ser mutado. Particularmente para ésta enfermedad, la importancia del conocimiento de la frecuencia de los alelos en la población estriba principalmente en su potencial aplicación en la genética clínica

Ambos polimorfismos presentaron una alta frecuencia de heterocigocidad en las madres de los pacientes, siendo el 75.4% de ellas heterocigotas para al menos uno de los marcadores. Este análisis resultó de gran relevancia ya que, logró diagnosticar al 68.5% de las 35 hermanas de los casos índice identificando a 9 portadoras y a 15 no portadoras. Colateral a la detección de portadoras, el análisis de RFLPs permitió la identificación de 2 fenómenos de recombinación y 4 casos donde la mutación ocurrió *de novo* en el caso índice. Estos eventos, por su clara implicación, fueron tomados en consideración para el asesoramiento genético.

Aunque fue importante el número de hermanas en las cuales se logró dar un diagnóstico de certeza, se debe de considerar que la mayoría de las familias en donde se incluyeron a las hermanas para el estudio, fueron aquellas donde había antecedentes heredofamiliares y que de las 48 madres portadoras probables, sólo en 5 se logró el diagnóstico. Esto adquiere importancia si se considera el hecho de que no existe un tratamiento definitivo para la enfermedad por lo que su prevención mediante el asesoramiento genético y el diagnóstico prenatal es fundamental.

Es por ello que es necesario implementar nuevas metodologías que permitan la detección de la totalidad de las mutaciones en los pacientes y en sus familiares femeninas, como el SSCP que identifica pequeñas mutaciones, incluyendo del tipo puntual y PCR cuantitativo que potencialmente identifica a todas las madres de pacientes con deleciones mediante la valoración de la dosis génica.

Con base en lo anterior proponemos una estrategia para el diagnóstico molecular de las familias con DMD/DMB que se muestra en el siguiente esquema.

Estrategia propuesta para el diagnóstico molecular en DMD/DMB.



Instituto Nacional de Pediatría

BIOLOGIA MOLECULAR

NOMBRE _____ EDAD _____ FECHA: _____
 M F EXPEDIENTE # _____
 LUGAR DE ORIGEN _____
 DIRECCION _____ TEL: _____
 PADRE _____ EDAD AL NAC. _____ OCUPACION _____
 MADRE _____ EDAD AL NAC. _____ OCUPACION _____
 A H F _____
 A P P _____
 AGO: G ____ P ____ A ____ DURACION DE GESTACION ____ MOVIMIENTOS FETALES ____
 PROBLEMAS DE EMBARAZO _____
 PARTO _____ PRESENTACION _____ PESO _____ TALLA _____
 ATENDIDO EN _____ ANALGESIA _____
 NEONATAL INMEDIATO _____



Instituto Nacional de Pediatría

D P M _____

EDAD DE INICIO _____ SINTOMAS PRINCIPALES _____

EVOLUCION _____

E.F. _____

C.P.K. _____

E M G _____

BIOPSIA _____

E K G _____

RESULTADO SOUTHERN BLOT

MUESTRA	PACIENTE	MADRE	HERMANAS	PADRE	OTROS

Normal (N) alteración (DMD)

RESULTADO WESTERN BLOT

MUESTRA	PACIENTE	MADRE	HERMANAS	PADRE	OTROS

Normal (N) alteración (DMD)

DIAGNOSTICO _____

CANALIZADO POR _____

ANEXO II**REACTIVOS Y SOLUCIONES**

Acrilamida/bisacrilamida 30%

-29 partes de acrilamida

-1 parte de bisacrilamida

-aforar a 100 ml. con agua destilada

Agarosa al 2% y 0.8%

-Aforar con TBE 1X

Bromuro de etidio

-5 mg. en cada ml.

Cloroformo/isoamílico 24:1

-24 partes de cloroformo

- 1 parte de alcohol isoamílico

dNTPs

A,T,G y C 10 mM

Enzimas utilizadas en la amplificación.

Enzima	Concentración	Buffer 10X
Amplitaq DNA polimerasa	10 U/I	100m trisHCl
fragmento Stoffel		100mM Kcl, pH 8.3

Fenol saturado (Gibco BRL)

-Disolver 300 ml. de fenol 100% a 68° C

-Poner en una botella de 500 ml.

200 ml. de agua destilada estéril (ADD)

2 ml. de 2-mercaptoetanol puro

4 ml. de tris Hcl 1M, pH 8.0

292.5 ml. de NaOH 1N

Combinar esta mezcla con los 300 ml. de fenol fundido.

Cubrir la botella con papel aluminio y dejar el fenol a 4° C toda la noche antes de usarlo.

Buffer de corrida

-Azul de bromofenol 0.25%

-Xilencianol 0.25%

-Ficoll 400 (ADD) 15%

Marcadores de pesos moleculares.

DNA ladder

Este marcador de pesos se encuentra formado por fragmentos de una longitud de 100 a 1,500 pb, con un incremento de 100 pb en cada fragmento.

DNA de ϕ X174/Hae III.

Este marcador se prepara a partir de DNA purificado de ϕ X174 y digerido por completo con la enzima Hae III. Puede ser utilizado para medir fragmentos de 72 a 1353 pb.

DNA de Lambda/Hind III.

La digestión del DNA del virus Lambda con la enzima de restricción Hind III, produce 8 fragmentos de 140 a 20,000 pb, que pueden ser utilizados como marcadores de pesos moleculares para electroforesis en geles de agarosa y acrilamida.

Preparación de geles de poliacrilamida.

Porcentaje	7.5%	10%	15%
TBE 5%	1.5 ml.	2.0 ml.	3.26 ml.
Acril/bisacrilamida 30%	2.5 ml.	3.06 ml.	5.0 ml.
ADD	5.9 ml.	4.83 ml.	1.56 ml.
AP 10%	81.5 μ l.	100 μ l.	1.63 μ l.
TEMED	8.1 μ l.	10 μ l.	1.63 μ l.
Vol. final	10 ml.	10 ml.	10 ml.

Amortiguador para lisis de células rojas (RCLB)

-Tris (pH 7.6)	10 mM
-MgCl ₂	5 mM
-NaCl	10 mM

Amortiguador para lisis de células blancas (WCLB)

-Tris (pH 7.6)	10 mM
-EDTA (pH 8)	10 mM
-NaCl	50 mM
-SDS	0.2%
-Proteasa (proteínasa K) 200 μ g/ml.	

TBE 10X (TRIS-BORATO-EDTA)

-Tris-Ac. Borico	89 mM
-EDTA	20 mM

TE (TRIS-EDTA)

-Tris (pH 8)	1.0 mM
-EDTA (pH 8)	0.1 mM

BIBLIOGRAFIA.

1. Romer W. *Anatomía Comparada* 5a Ed. Edit. Inteamericana México, D.F. 1984; 182-206 páginas.
2. Stein Richard *Nerve and muscle membranes, cell and systems*. 2a ed. Plenum Press 1983: 117-145 pag.
3. Fawcett P, Wyne D *A textbook of histology* 10 ed. Philadelphia 1986: 1033 pag.
4. Torrey TW *Morphogenesis of the vertebrates* 3a ed. John Wiley Sons Inc. 1983, EUA: 249-274 págs.
5. Junqueira LC, Carneiro J. *Histología Básica* 3a edición; 2a reimpresión, Salvat Editores México, D.F. 1993; 209-265 págs.
6. Ganong WF *Review of medical physiology*, 8th edition Longe medical publications 1977, 32-47 págs.
7. Rando TA, Blau HM Primary mouse myoblast purification characterization and transplantation for cell-mediated gene-therapy *J. Cell Biol* 1994; 125: 1275-1287
8. Partridge T (editor) *Molecular and cell biology of Muscular Dystrophy* 1a ed. Chapman and Hall, London 1993; 210 págs
9. Turner PR, Fong P, Denetclaw W and Steinharat R. Increased calcium influx in dystrophic muscle *J Cell Biol* 1991; 115 (6): 1701-1712
10. Salcedo VM, Orozco OL. Genética molecular de las distrofias musculares tipos Duchenne y Becker. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1992;49: 115-120.
11. Moser H. Duchenne muscular dystrophy: Pathogenetic aspects y genetic prevention. *Human Genet* 1984; 66: 17-40.
12. Scriver Ch, Beaudet A, Sly W, (editors) *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. In: *The metabolic and molecular basis* (Vol. III) 7th Edit. Mc Graw Hill Inc. 1995. 1455 págs.
13. Brown RH, Hoffman EP. Molecular biology of Duchenne muscular dystrophy. *TINS* 1988; 11: 480-484.
14. Kunkel LM and Hoffman EP. Duchenne/Becker muscular dystrophy. *British Medical Bulletin* 1989;45: 630-643.
15. Brown S and Lucy J Dystrophy as a mechanochemical transducer in skeletal muscle *Bio Essays* 1993; 15 (6): 413-418.
16. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C and Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987; 50: 509-517.

17. MaryDilys SA and Kunkel LM. The molecular and biochemical basis of Duchenne muscular dystrophy. *TIBS* 1992; 17:289-292.
18. Medori R, Brooke M, Waterston R. Genetic abnormalities in Duchenne and Becker dystrophies: clinical correlations *Neurology* 1989; 39: 461-465.
19. Forrest SM, Cross GS, Speer A, Gardner-Medwin D, Burn J, Davies K. Preferential deletion of exons in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Nature* 1987; 329: 638-642.
20. Miller G and Wessel H. Diagnosis of dystrophinopathies: Review for the clinician pediatric. *Neurol* 1993; 3: 3-9.
21. Bushby K. The molecular dystrophies. *Bailliere's Clin Neurol* 1994; 3 (2):407-430.
22. Beggs A, Hoffman E, Snyder J, Arahata K, Specht L, Shapiro F, Angelini C, Sugita H, Kunkel L. Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker Muscular Dystrophy: Dystrophin Gene and protein studies. *Am. J. Human. Genet.* 1991;49:54-67.
23. Abbs S, Yau SC, Clark S, Mathew CG, Bobrow M. A convenient multiplex PCR system for the detection of dystrophin gene deletions: a comparative analysis with cDNA hybridisation shows mistypings by both methods. *J Med Genet* 1991; 28: 304-311
24. Lindlof M, Kiuru A, Kaariainen H, Kalimo H, Lang H, Pihko H, Rapola J, Somer H, Somer M, Savontaus ML and de la Chapelle A. Gene deletions in X-linked muscular dystrophy. *Am J Human Genet* 1989; 44: 496-503.
25. Den Dunnen J, Grootsholten P, Bakker E, Blondin A, Ginjaar H, Waffenaar M, Van Paassen H, Pearson P and Van Ommen J. Topography of the Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) gene; FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *Am J Human Genet* 1989;45: 835-847.
26. Coral-Vazquez R, Arenas D, Cisneros B. Analysis of Dystrophin in patients from Mexican population with Duchenne/Becker Muscular Dystrophy. *Arch. Med Res* 1993; 24(910):1-6
27. Lenk U, Hanke R, Thiele H, Speer A. Point mutations at the carboxy-terminus of the human dystrophin gene; implications for an association with mental retardation in DMD patients. *Hum Mol Genet* 1993;2 (11):1877-1881.
28. Perry TB, Fraser FC. Variability of serum creatine phosphokinase activity in normal women and carriers of the gene for Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 1973; 23: 1316-1323.

29. Yamazaki M, Minota S, Sakurai H, Miyazano K, Yamada A, Kanazawa I, Kawai M Expression of transforming growth factor- β 1 and its relation to endomysial fibrosis in progressive muscular dystrophy. *Am J Pathol* 1994;144:221-226.

30. Bernasconi P, Torchiana E, Contalorieri P, Brugnoli R, Barresi R Expression of transforming growth factor- β 1 in dystrophic patients muscle correlates with fibrosis. *J Clin Invest* 1995;96:1137-1144.

31. Beggs AH, Kunkel LM. Improved Diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy. *J Clin Invest* 1990; 85: 613-619.

32. Roberts G, Passos-Bueno M, Brown M, Vainzof M Point mutation in a Becker muscular dystrophy patient. *Human Mol Genet* 1992; 2:75-77

33. Kunkel L, Monaco A, Middlesworth W, Ochs H, Latt S Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient.

34. Monaco AP, Bertelson CJ, Feener CC, Kunkel LM. Localization and cloning of Xp21 deletion breakpoints involved in muscular dystrophy. *Human Genet* 1987; 75: 221-227.

35. Feener CA, Koenig M, Kunkel LM. Alternative splicing of dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature* 1989; 338: 509-511.

36. Walsh F, Pizzey J, Dickson G. Tissue-specific isoforms of dystrophin. *TINS* 1989; 12: 235-238.

37. Nishio Y, Takeshima Y, Nanta N, Yanagawa H, Suzuki Y, Matsui M Identification of the novel first exon in the human dystrophin gene of a new promoter located more than 500 kb, upstream on the nearest known promoter. *J Clin Invest* 1994;94:1037-1042.

38. Roberts G, Coffey A, Bobrow M, Bentley D Exon structure of the human dystrophin gene. *Genomics* 1993;16:536-538.

39. Chelly J, Kaplan J, Maire P, Gauthron S, Kahn A Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues. *Nature* 1988;333:858-860.

40. Lindenbaum MH and Carbonetto S. Dystrophin and partners at the cell surface. *Current Biol* 1993;3:109-111.

41. Milner R, Busaan J, Michalak M. Isolation and Characterization of different C-terminal fragments of dystrophin expressed in *E. coli*. *Biochem J*; 288:1037-1044.

42. Bies R, Phelps S, Cortez M, Roberts R, Caskey C, Chamberlain J Human and murine dystrophin mRNA transcripts are differential and expressed during skeletal muscle heart, and brain development *Nucleic Ac. Res* 1992;20:1725-1731.

43. Schofield J, Blake D, Simmons C, Morns G, Tinsky J, Davies K Apo-dystrophin-1 and apo-dystrophin-2, product of Duchenne muscular dystrophy locus:

expression during mouse embryogenesis and in cultured cell lines *Human Mol Genet* 1994;3:1309-1316.

44. Acsadi G, Dickson G, Love D, Jani A, Walsh F, Gurusingham A, Wolff J, Davies K. Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature* 1991; 352: 815-818.

45. Morgan J, Partridge T. Cell transplantation and gene therapy in muscular dystrophy. *BioEssays* 1992;14:641-645.

46. Vincent N, Ragot T, Couton D, Chafeu P, Gregoire A, Briand P, Kaplan J. Long-term correction of mouse dystrophic degeneration by adenovirus-mediated transfer of a minidystrophin gene. *Nature Genetic* 1993;5:130-134.

47. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 1988; 53: 229-228.

48. Bonilla E, Samitt CE, Miranda AF. Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell* 1988; 54: 447-452.

49. Kahana E, Marsh P, Henry A, Way M, Gratzner W. Conformation and phasing of dystrophin structural repeats. *J Mol. Biol.* 1994;235:1271-1277.

50. Pearce M, Blake D, Tinsley J, Byth B, Campbell L, Monaco A, Davies K. The dystrophin and dystrophin genes share similarities in genomic structure. *Human Mol Genet* 1993;2:1765-1772.

51. Cohen M, Jacobson C, Godfrey, Campbell K. Distribution of dystroglycan during embryonic nerve-muscle synaptogenesis. *J Cell. Biol.* 1995;129:1093-1101.

52. Pasternak C, Wong S, Elson E. Mechanical function of dystrophin in muscle cells. *J Cell. Biol.* 1995;128:355-361.

53. Campbell K. Three muscular dystrophies: Loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell.* 1995;80:675-679.

54. Hoffman E, Brown R, Kunkel L. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987;51:917-928.

55. Lederfein D, Yaffe D, Nudui U. A housekeeping type promoter located in the 3' region of the Duchenne muscular dystrophy gene controls the expression of Dp71 a major product of the gene. *Human Mol Genet* 1993;2:1883-1888.

56. Campbell K, Kahl S. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature* 1989;338:259-262.

57. Ervasti J, Kahl S, Gaver M, Campbell K. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* 1990;345:315-319.

58. Ohlendieck K, Campbell K. Dystrophin-associated proteins are greatly reduced in skeletal muscle from mdx mice. *J Cell. Biol.* 1991;115:1685-1694.

59. Ibraghimov O, Ervasti J, Leveille C, Slauglater C, Sernett S, Campbell K Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 1992;355:696-702.
60. Matsumura K, Tome F, Collin A, Chaouch M, Kaplan J, Fardeau M, Campbell K Deficiency of the 50k dystrophin-associated glycoprotein in severe childhood autosomal ressesive muscular dystrophy. *Nature* 1992;359:320-322.
61. Yamamoto H, Mizuno Y, Hayashi K, Nonaka I, Yoshida M, Ozawa E expression of dystrophin associated protein 35 DAG (A) and 50 DAG (A2) is confined to striated muscle. *J Biochem* 1994;115:162-167.
62. Matsumura K, Burghes A, Mora M, Leturcq F, Deanpierre M, Kaplan J, Mendel J, Campbell K Immunohistochemical analysis of dystrophin associated proteins in Becker/Duchenne muscular dystrophy with huge in frame deletions in the NH2-terminal and rod domains of dystrophin. *J Clin. Invest.* 1994;93:99-105.
63. Muntoni F, Wilson L, Marrosu G, Manrosu M, Cianchetti C, Mestroni L, Gahau M Mutation and the dystrophin gene selectively affecting dystrophin expression in the heart. *J. Clin Invest* 1995;96:693-699.
64. Ahn A, Kunkel L Syntrophin binds to a alternatively spliced exon of dystrophin *J. Cell Biol.* 1995;128:363-371.
65. Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T, Meng G, Muller CR, Lindlof M, Kaariainen H, de la Chapelle A, Kiuru A, Savontaus ML, Gilgenkrantz H, Récan D, Chelly J, Kaplan JC, Covone AE, Archidiacono N, Romeo G, Liechti-Gallati S, Schneider V, Braga S, Moser H, Darras BT, Murphy P, Francke U, Chen D, Morgan G, Denton M, Greenberg CR, Wrogemann K, Blonden LAJ, van Paassen HMB, van Ommen GJB, and Kunkel LM. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: Correlation of severity with type of deletion. *Am J Human Genet* 1989, 45: 498-506.
66. Nicholson L, Bushby K, Johnson M, Medwin D, Ginjaar B Dystrophin expression in Duchenne patients with "in frame" gene deletions. *Neuropediatrics* 1993;24:93-97.
67. Gokoz N, Kuseryil F, Topaloglu H Screening of deletions and RFLPs analysis in turkish DMD/BMD families by PCR. *Clin Genet* 1993;43:262-266.
68. Speer A, Kraft A, Hanke R, Grade K Deletion analysis of DMD/BMD families from the german democratic Republic and selected regions of czechoslovakia and hungary *J Med. Genet.* 1990;27:679-682.

69. Liechti-Gallati S, Koenig M, Kunkel LM, Frey D, Boltshauser E, Schneider V, Braga S and Moser H. Molecular deletion patterns in Duchenne and Becker type muscular dystrophy. *Human Genet* 1989; 81: 343-348.
70. Hu X, Burghes A, Bulman D, Ray P, Worton R. Evidence for mutation by unequal sister chromatid exchange in the Duchenne muscular dystrophy gene. *Am J Hum Genet* 1989; 44: 855-863.
71. Hu X, Rau P, Murphy G, Thompson M, Worton R. Duplicational mutation at the Duchenne Muscular dystrophy locus its frequency distribution origin and phenotype - genotype correlation. *Am J Human Genet* 1990;46:682-695.
72. Chamberlain JS, Gibbs RA, Rainer JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Ac Research* 1988, 16: 11141-11156.
73. Beggs AH, Koenig M, Boyce FM and Kunkel LM. Detection of 98% of DMD/DMB gene deletions by PCR. *Human Genetics in Press* 1990.
74. Hoffman EP, Kunkel LM. Dystrophin abnormalities in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Neuron* 1989; 2: 1019-1029.
75. Gillard E, Chamberlain J, Murphy E, Duff C, Smith B, Burghes A, Thompson M, Sutherland J, Oss I, Bodrug S, Klamut H, Ray P, Worton R. Molecular and phenotypic analysis of patients with deletions within the deletion-rich of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene. *Am J Human Genet* 1989; 45: 507-520.
76. Chelly J, Gilgenkrantz H, Lambert M, Hamard G, Chafey P, Récan D, Katz P, de la Chapelle A, Koenig M, Ginjaar I, Fardeau M, Tomé F, Kahn A, Kaplan J. Effect of dystrophin gene deletions on mRNA levels and processing in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Cell* 1990; 63: 1239-1248.
77. Akalin N, Zeitzkiewicz E, Makaiowski W, Labuda D. Are CpG sites mutation hot spot in the dystrophin gene? *Human Mol Genet* 1994;3:1425-1426.
78. Ginjaar I, Bakker E, van Paassen M, den Dunnen J, Wessels A, Moorman A, van Ommen G. Immunohistochemical studies show truncated dystrophins in the myotubes of three fetuses at risk for Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet* 1991; 28: 505-510.
79. Malhotra SB, Hart KA, Klamut HJ, Thomas NST, Bodrug SE, Burghes AHM, Bobrow M, Harper PS, Thompson MW, Ray PN, Worton RG. Frame-shifts deletions in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Science* 1988; 242: 755-758.
80. Prior TW, Friedman KJ, Highsmith WE, Perry TR, Silverman LM. Molecular probe protocol for determining carrier status in Duchenne and Becker muscular Dystrophies. *Clin Chem* 1990; 36: 441-445.

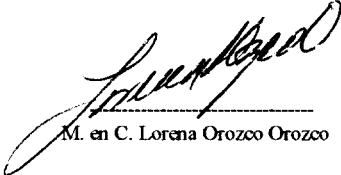
81. Ward P, Hejtmancik J, Witkowski J, Baumbach L, Gunell S, Speer J, Hawley P, Tantravahi U, Caskey C. Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy: Prospective linkage analysis and retrospective dystrophin cDNA analysis.
82. Norman A, Harper P. A survey of manifesting carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy in Wales. *Clin Genetics* 1989; 36: 31-37.
83. Darras BT, Harper JF, Francke U. Prenatal diagnosis and detection of carriers with DNA probes in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 1990; 27: 679-682.
84. Wood S, McGillivray. Germinal mosaicism in Duchenne muscular dystrophy. *Human Genetics* 1988; 78: 282-284.
85. Lebo RV, Olney RK, Golbus MS. Somatic mosaicism at the Duchenne locus. *Am J Med Genet* 1990; 37: 187-190.
86. Cole C, Coyne A, Hart K, Sheridan R, Walker A, Johnson L. Prenatal testing for Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Lancet* 1988;Feb:262-266.
87. Fassati A, Tedeschi S, Bordoni A, Amboni P, Curcio C, Bresolin N. Rapid direct diagnosis of deletions carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Lancet* 1994;344:302-303.
88. Lenk U, Demuth S, Kraft U, Hanke R, Speer A. Alternative splicing of dystrophy mRNA complicates carriers determination report a DMD family. *J. Med Genet* 1993; 30:206-209
89. Roberts R, Bentley D, Barby T, Manners E, Bobrow M. Direct diagnosis of carries of Duchenne and Becker muscular dystrophy by amplification of lymphocyte RNA. *Lancet* 1990;336:1523-1526.
90. Yau S, Roberts R, Bobrow M, Mathow C. Direct diagnosis of point mutations in Duchenne muscular dystrophy. *Lancet* 1993;341:273-275.
91. Roberts R, Cole C, Hart K, Bobrow M. Rapid carrier and prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Nucleic Ac. Res.* 1989;17:811
92. Bushby K, Goodship J, Nicholson L. Variability in clinical genetic and protein abnormalities in manifesting carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromusc. Dis.* 1993;3:57-64.
93. Muntoni F, Mateddu A, Cau M. Diagnosis of DMD carrier status in a family with no known affected males. *Dev. Med. Child. Neurol.* 1993;35:65-78
94. Sewry C, Samsome A, Clerk A. Manifesting carriers of Xp21 muscular dystrophy: lack of correlation between dystrophin expression and clinican weakness. *Neuromusc. Dis.* 1993;3:65-70.
95. Bronzova J, Todorova A, Kalaydijeva L. Detection of carrier of deletions in the dystrophin gene in Bulgarian DMD/BMD families. *Human Genet* 1994;93:170-174.

96. Sambrook T and Maniatis Manual of the Molecular Biology. Cold Spring Harbor 1983, EUA.

97. Mullis K (editor). The polimease Cahain Reaction. In: Optimization of Multiplex PCR; quantitative PCR. Oxford University Press, 1994.


El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM Unidad Iztapalapa, aprobó la presente tesis
el día 13 de Diciembre de 1996.

TUTOR.



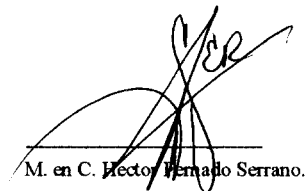
M. en C. Lorena Orozco Orozco

SECRETARIO



Dra Alda Rocio Ortiz Muñiz

VOCAL



M. en C. Héctor Fernando Serrano.