

00346

24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO MOLECULAR DE LAS  
DISTROFIAS MUSCULARES TIPOS DUCHENNE Y BECKER.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS  
BIOLOGÍA CELULAR

P R E S E N T A

MED. CIR. MIGUEL ANGEL ALCÁNTARA ORTIGOZA

DIRECTOR DE TESIS: D. EN C. LORENA SOFÍA OROZCO OROZCO

MÉXICO, D.F.

1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

261095



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

PAGINACION  
DISCONTINUA

PAGINACIÓN  
DISCONTINUA

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Investigación en Genética Humana perteneciente al Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud; bajo la dirección de la D. en C. LORENA SOFIA OROZCO OROZCO, jefe de dicho laboratorio y los asesores D. en C. SARA FRIAS VAZQUEZ, jefe del Laboratorio de Citogenética del mismo Departamento y el D. en C. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA, profesor titular "C" del Laboratorio de Microscopía Electrónica, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

La realización de esta tesis contó con el apoyo del Programa de Becas Nacionales de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## DEDICATORIA

*A Geomar Ivonne por ser la guía, el motivo, la inspiración, el amor verdadero y el apoyo universal en mí. Tú sabes cuanto has contribuido para esta etapa de mi vida. A ti y a tu familia ejemplar, gracias por todo.*

*A mis padres Miguel Angel y Ernestina, hermanos Miguel Sebastian, Mariana, Marisol, Fanny, y a mi tío Leonardo, por otorgarme la oportunidad tan generosa de contar con un espacio propicio, así como su gran comprensión. Agradecimientos muy especiales a mi abuelita Concepción Guadalupe y mi tía Graciela, que pese a sus limitaciones siempre me brindaron toda su tolerancia, cariño y cuidados. A mi admirable y talentoso hermano Miguel Alonso, digno ejemplo de superación, tesón y nobleza.*

## AGRADECIMIENTOS

*A la Dra. Lorena Orozco por su confianza y enseñanzas necesarias para la realización del proyecto.*

*A los Dres. Sara Frías y Luis Felipe Jiménez por sus enseñanzas, enorme comprensión y tolerancia en momentos difíciles.*

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

*Al los Dres. Victoria del Castillo Ruiz, Ariadna González, Ricardo García Cavazos, Esther Liberman, Teresa Villareal, Nora Alicia Urraca, Magdalena Tinajero, Silvia Vidal, Astrid Rasmussen, Ofelia Niño de Rivera, Nohemí Pérez, Mónica Quintana, Sonia Canún, Carlos Galaviz, Edna Aizpuru, Dora Mayén y Alessandra Carnevale, así como a todo el Laboratorio de Citogenética de este Instituto, por brindar su apoyo, conocimientos, confianza y sobre todo, la amplia difusión a este proyecto.*

*A la M. en C. Gabriela Gutiérrez L. por su valiosa herencia en este proyecto.*

*A mis buenos amigos y maestros del diario, los biólogos Manuel Moreno y Margarita Chávez, que siempre alentaron y apoyaron mi desarrollo diario.*

*A mis amigos y compañeros de trabajo; especialmente a la Sra. Araceli Romero, el Biol. David Cruz, el M. en C. Miguel Ángel Reyes, la M. en C. Cesárea Bermúdez, la Dra. Ofelia Niño de Rivera y la Biol. Elizabeth Hernández, los cuales tuvieron a bien tenerme en cuenta como amigo, el apoyarme a diario y hacerme saber que siempre podré tener en ellos alguien de absoluta confianza.*

*A mis amigos y compañeros de estudio, los biólogos Angélica González O. y Gabriel López por permitirme una alianza productiva, así como una amistad desinteresada salpicada de fidelidad, confianza, apoyo, tolerancia, y enseñanzas.*

*Al Q.F.B Ricardo Lee por su apoyo técnico.*

*A mis maestros y amigos Dr. Pedro Fernández Vargas, Dr. Ramón F. Ramos Carrasquedo, Dr. Arturo Panduro, Dr. Gustavo Cabrera, Dr. Joaquín López Bárcenas, Dra. Cristina Márquez, Dr. Juan C. Bätz, Dr. Joaquín Hernández, Dr. Marco Antonio Durán, Dr. Daniel Rodríguez*

*Álvarez, Dr. Pablo Abrego y la Biól. Gabriela Guzmán, que siempre inculcaron en mi la necesidad de la investigación científica y su trascendencia en los problemas de salud nacional.*

*A los Dres. Francisco Ceja, Sergio López, Hugo Miranda, Ricardo Cornejo, Margarita Velázquez y la Enf. Gral. Martha Mendiola, por brindarme su valiosa amistad y enseñarme que en este mundo hay algo más que la ciencia.*

*A Fundación UNAM por brindarme la oportunidad de pertenecer a tan relevante proyecto de apoyo a universitarios.*

*Al Programa Maimónides de Facultad de Medicina por su apoyo y la trascendencia de sus metas.*

*Al Instituto Nacional de Pediatría, S.S. y la Asociación Mexicana de Fibrosis Quística A.C. por apoyar la realización del proyecto.*

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



# ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	1
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	3
<b>LISTA DE TABLAS</b>	4
<b>RESUMEN</b>	5
<b>INTRODUCCIÓN</b>	8
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	33
<b>OBJETIVOS</b>	34
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	35
<b>I. Estrategia General</b>	35
<b>II. Población Objetivo y Estudio Clínico</b>	37
<b>III. Estudio Molecular</b>	37
IIIa. Extracción de DNA	37
IIIb. Síntesis de oligonucleótidos iniciadores F y R	38
IIIc. Reacción de M-PCR	40
IIId. Electroforesis en geles de agarosa	41
IIIe. Reacción de MQ-PCR	41
IIIf. Electroforesis en geles de poliacrilamida	42
IIIg. Determinación de dosis génica	42
IIIh. Análisis de RFLPs	43
<b>IV. Correlación Fenotipo-Genotipo</b>	44

<b>RESULTADOS</b>	45
<b>I. Detección de Deleciones en Casos Índice por M-PCR</b>	45
<b>II. Detección de Portadoras</b>	51
Ila. Análisis de los polimorfismos pERT87.8/TaqI (T) y pERT87.15/XmnI (X) (RFLPs) mediante el uso de la PCR	51
Iib. Análisis de haplotipos	62
Iic. Evaluación de la dosis génica por PCR múltiple cuantitativo (MQ-PCR) en familias con casos índice afectados por deleción	68
<b>III. Asesoramiento Genético</b>	76
IIIa. Antecedentes heredofamiliares	76
IIIb. Análisis de ligamiento (RFLPs)	76
IIIc. Evaluación de dosis génica por MQ-PCR y análisis densitométrico	77
<b>DISCUSIÓN</b>	80
<b>CONCLUSIONES</b>	90
<b>Anexo 1</b>	91
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	94

## ABREVIATURAS

a.a.	aminoácido
AHC	locus de la hipoplasia adrenal congénita
AHF	antecedentes heredofamiliares
C	dominio C-terminal de la distrofina
cDNA	DNA complementario
CGD	enfermedad granulomatosa crónica
cM	centimorgan
CML	corrimiento del marco de lectura
cols.	colaboradores
CPK	creatininfosfocinasa
CYS	dominio rico en cisteínas de la distrofina
Δ	delección
D.O.	densidad óptica
DAG	glicoproteína asociada a distrofina
DAP	proteína asociada a distrofina
DGAC	complejo glicoproteico asociado a distrofina
DMB	Distrofia Muscular tipo Becker
DMD	Distrofia Muscular tipo Duchenne
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	mezcla de los cuatro 2-desoxirribonucleótidos, 5-trifosfato de adenina, guanosina, timina y citosina
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
F	forward
GK	glicerol-cinasa
H1-H4	dominios bisagra de la distrofina
ICHs	intercambio de cromátides hermanas
IMD	Distrofia Muscular con fenotipo intermedio
kb	kilobases
kDa	kilodaltones
LDH	lactatodeshidrogenasa
Mb	megabases
M-PCR	reacción en cadena de la polimerasa múltiple
MQ-PCR	reacción en cadena de la polimerasa múltiple cuantitativa
mRNA	RNA mensajero
N	dominio N-terminal de la distrofina
ND	no determinado
NM	no mencionado
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pERT	del inglés "phenol-enhancement recovery technic"
Pm	promotor muscular
POI	portadora obligada informativa

PONI	portadora obligada no informativa
R	dominio "rod" de la distrofina
R	reverse
RFLPs	fragmentos de restricción de longitud polimórfica
RNA	ácido ribonucleico
RP	retinitis pigmentaria
RT-PCR	reverso-transcripción acoplada a PCR
SDS	dodecilsulfato de sodio
SSCP	polimorfismos conformacionales de cadena sencilla
STRs	secuencias cortas repetidas en tandem (DNA microsatélite)
T	polimorfismo RFLP pERT87.8/TaqI
TBE	amortiguador de Tris-borato-EDTA
TE	amortiguador de Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
<i>T<sub>m</sub></i>	temperatura teórica calculada para alineación de un oligonucleótido iniciador.
UI	unidades internacionales
UTR	región no traducible del mRNA
V	volts
VNTRs	secuencias repetidas en tandem de número variable (DNA minisatélite)
X	polimorfismo RFLP pERT87.15/XmnI
XK	locus responsable del síndrome de McLeod

# LISTA DE FIGURAS

		PÁGINA
Figura 1	Signo de Gowers en DMD	9
Figura 2	Organización del locus DMD en humanos	12
Figura 3	Hallazgos citogenéticos en DMD	13
Figura 4	Localización de elementos promotores en el gen DMD	15
Figura 5	Esquema de la organización de la distrofina	16
Figura 6	Organización de la distrofina con el DGAC y matriz extracelular	18
Figura 7	Localización en cDNA de las deleciones, duplicaciones y mutaciones puntuales en DMD/B	23
Figura 8	Análisis por Southern blot del gen DMD en casos afectados	27
Figura 9	Análisis por PCR múltiple del gen DMD en casos afectados	28
Figura 10	Algoritmo metodológico	36
Figura 11	Integridad de DNA genómico	46
Figura 12	Panel de las 4 reacciones de M-PCR en casos afectados	47
Figura 13	Distribución por localización de las deleciones y fenotipo	48
Figura 14	Representación de la extensión de las deleciones encontradas en el cDNA del gen DMD y su correlación con el fenotipo	50
Figura 15	Distribución entre deleción presente y AHF	52
Figura 16	Amplificación y patrones de restricción de los RFLPs empleados	54
Figura 17	Análisis de pERT87.8/TaqI en familia con pérdida de alelo	58
Figura 18	Análisis de pERT87.8/TaqI. Exclusión de alelo de riesgo	59
Figura 19	Análisis de pERT87.8/TaqI. Presencia de alelo de riesgo	60
Figura 20	Correlación de haplotipos con deleción o sin ésta	64
Figura 21	Asociación de haplotipos con mutaciones y procedencia de alelos DMD	65
Figura 22	Representación de los eventos de recombinación documentadas por RFLPs	67
Figura 23	Correlación de resultados obtenidos por RFLPs y MQ-PCR. Caso familiar	69
Figura 24	Correlación de resultados obtenidos por RFLPs y MQ-PCR. Mutación <i>de novo</i>	70-71
Figura 25	Heredabilidad de las deleciones	73
Figura 26	Detección de portadoras por MQ-PCR en familias con caso único	74
Figura 27	Dosis génica en familia con pérdida de alelo pERT87.8/TaqI	75
Figura 28	Análisis de pERT87.8/TaqI. Asignación y exclusión de alelo mutado en hijas de POI	79
Figura 29	Algoritmo diagnóstico molecular propuesto para brindar asesoramiento genético en familias con DMD/DMB	89

## LISTA DE TABLAS

		PÁGINA
Tabla 1	Exones del gen DMD	20
Tabla 2	Frecuencias y localización de deleciones en diferentes etnias	22
Tabla 3	Clasificación y efectos de las mutaciones puntuales en el gen DMD	25
Tabla 4	Secuencias de los oligonucleótidos iniciadores utilizados	39
Tabla 5	Frecuencias globales de los alelos pERT87 en las 75 familias estudiadas	55
Tabla 6	Frecuencias de alelos pERT87 en sujetos no emparentados	56
Tabla 7	Frecuencia de polimorfismos en diferentes poblaciones	61
Tabla 8	Frecuencia de haplotipos pERT87 en madres y casos índice	63

## RESUMEN

Las distrofias musculares tipos Duchenne (DMD) y Becker (DMB) son desórdenes degenerativos del músculo estriado que se heredan en forma recesiva ligada al cromosoma X. Se caracterizan por debilidad muscular progresiva, pseudohipertrofia de gemelos y elevación en los niveles séricos de la creatininfosfocinasa (CPK). La DMD se presenta con una incidencia de 1 en 3,500 varones nacidos vivos y ocasiona la muerte del individuo alrededor de la 2ª década de la vida; la DMB afecta a 1 en 30,000-40,000 y generalmente permite una sobrevida más allá de la 4ª década de la vida. Ambas enfermedades son ocasionadas por mutaciones en el gen que codifica para la proteína distrofina cuya isoforma principal tiene un peso de 427 kDa, la cual forma parte del citoesqueleto subsarcolémico de la fibra muscular estriada y cardíaca. El gen consta de 79 exones abarcando 2.4 Mb de la banda Xp21.2 y transcribe un mRNA de 13.5 kb. Las mutaciones que afectan este gen son deleciones parciales (60-70%), duplicaciones parciales (6-8%) y mutaciones puntuales. Las mutaciones tipo deleción y duplicación se generan en dos puntos calientes del gen localizados en la región 5' (exones 1-20) y central (exones 44-55). Existe un consenso que apoya que las mutaciones que conducen a fenotipos DMD ocasionan ausencia total de la distrofina, en tanto que en los fenotipos DMB existe una proteína con función residual.

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

Actualmente en el INP acuden 101 familias con DMD/DMB a la consulta externa de Genética, de las cuales 75 fueron incluidas en el estudio. De acuerdo con los antecedentes familiares sólo en 14 (18.7%) de éstas había sido posible brindar un asesoramiento genético de certeza a la madre, sin embargo éste sigue siendo incierto en las hermanas de los pacientes y en las mujeres de las familias restantes. En la presente tesis se propuso: 1) caracterizar las deleciones que afectan al gen de la distrofina en pacientes diagnosticados clínicamente con DMD y DMB; 2) determinar la frecuencia de las deleciones y su localización; 3) detectar a las portadoras mediante análisis de RFLPs y MQ-PCR; 4) Conocer la frecuencia de recombinación intragénica derivada de los hallazgos conjuntos de los análisis

de RFLPs y MQ-PCR; 5) determinar la frecuencia de los polimorfismos (haplotipos) en nuestra población; 6) establecer un algoritmo diagnóstico y 7) conocer la eficiencia diagnóstica al utilizar metodología molecular para el asesoramiento genético certero de las DMD/DMB.

Para tal fin se creó un banco de DNA de las familias incluidas en el estudio obtenido a partir de sangre periférica y mediante el método fenol-cloroformo. Se buscó la presencia de deleciones en los casos índice mediante PCR múltiple de 19 segmentos en 4 reacciones por separado. A todas las familias y sus integrantes se les hizo análisis de ligamiento por PCR/RFLPs utilizando dos marcadores intragénicos de la región 5' del gen DMD (pERT87.8/TaqI y pERT87.15/XmnI), integrando así cuatro tipos de haplotipos. Se definió la frecuencia para cada uno de los polimorfismos y haplotipos y la asociación o no de alguno de ellos con alelos sanos o DMD/DMB. En madres y familiares femeninos de primer grado emparentadas con casos índice con deleción se realizó la evaluación de dosis génica mediante MQ-PCR para excluir o asignar el estado de portadora.

El 50.6% (n=38) de los casos índice presentó deleción en uno o más de dos exones en los puntos calientes del gen, y de estas el 76.3% de las deleciones se localizaron en la región central del gen, resultados que han sido reportados para otras poblaciones. La correlación genotipo-fenotipo en los casos índice no mostró concordancia con la hipótesis de Mónaco, sin embargo para corroborar esto se requiere de otro tipo de estrategias. El análisis de polimorfismos o RFLPs evidenció que el 76% de las madres fue informativa para al menos un polimorfismo, sin embargo este análisis sólo contribuyó en un 6.7% en el asesoramiento genético (asignación/exclusión del estado de portadoras en hermanas en casos familiares, exclusión de alelo de riesgo en hermanas de casos esporádicos y detección de un solo evento mutacional *de novo*). En nuestra población se detectó un índice de recombinación intragénica de la región 5' de 0.033%. Por otro lado, el análisis de evaluación de dosis génica por MQ-PCR para detección de portadoras permitió el diagnóstico del 100% de madres y hermanas de los casos índice con deleción. Con nuestros hallazgos no encontramos ninguna familia que sugiriera la presencia de mosaicismo gonadal. La tercera parte de los casos índice con deleción heredaron la mutación de una madre portadora (36.8%) y el resto (63.2%) la adquirió como mutación *de novo*. Este hallazgo sugiere una alta tasa de mutación (tipo deleción) en este gen en familias mexicanas.

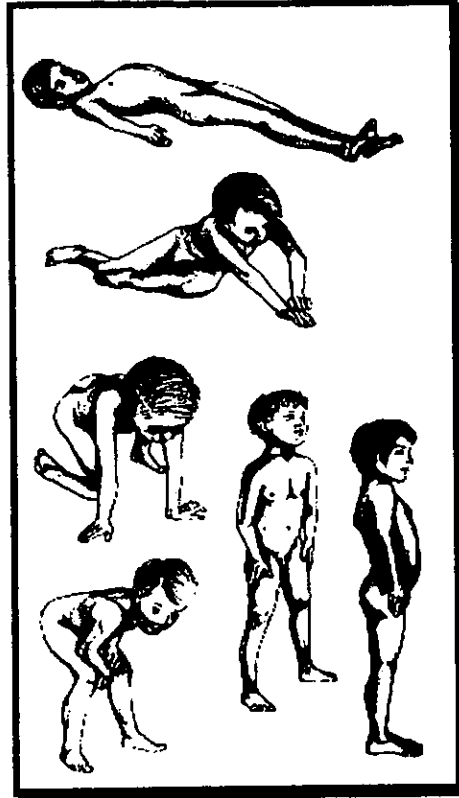


Nuestros resultados indican que el MQ-PCR es un método directo útil para el diagnóstico de portadoras en familias con DMD/DMB, mientras que el análisis de ligamiento utilizando RFLPs (únicamente de la región 5') es un método limitado para brindar asesoramiento genético certero en este padecimiento, sin embargo éste último permitió observar fenómenos de recombinación intragénica. No se observaron asociaciones estadísticamente significativas entre algún polimorfismo o haplotipo y la presencia o ausencia de alelos DMD mutados contra sanos, tal como se espera para genes con tasa de mutabilidad alta. Globalmente la eficiencia de nuestro laboratorio para brindar un consejo genético certero en nuestras familias mediante análisis del árbol genealógico, RFLPs y MQ-PCR fue de 57.4%.

## INTRODUCCIÓN

Las distrofias musculares (DM) son un grupo de desórdenes primarios del músculo estriado que cursan con debilidad muscular progresiva (1). Este grupo de enfermedades muestra degeneración muscular en pruebas electrofisiológicas (patrón miopático), bioquímicas (elevación de creatininfosfocinasa, CPK) e histopatológicas (cambios distróficos de la fibra muscular), algunos de estos padecimientos cursan con anomalías en otros órganos de la economía (2). La severidad clínica varía ampliamente entre las diversas formas y aún dentro del mismo tipo de distrofia muscular (1,2). Estos padecimientos son de las enfermedades hereditarias más frecuentes (1-3) y su herencia puede ser ligada al cromosoma X o autosómica. (1,2). Dentro de las DM ligadas al cromosoma X se encuentran la tipo Duchenne (DMD), la tipo Becker (DMB) y la tipo Emery-Dreifuss (2). La DMD se manifiesta alrededor de los 2 años de edad con trastornos en la marcha, a la que le siguen pseudohipertrofia de gemelos, signo de Gowers positivo (Fig.1), pérdida de la deambulación antes de los 12 años y muerte alrededor de la segunda década de la vida. En la DMB la progresión de la enfermedad es más lenta, la deambulación generalmente se pierde después de los 15 años y algunos de los casos pueden llevar un patrón de vida normal hasta los 40 o 50 años. La diferencia en las manifestaciones clínicas es lo que ha permitido hasta ahora hacer el diagnóstico diferencial entre ambas distrofias musculares y clasificarlas como leves, intermedias o graves (1,2). El consejo genético es una parte muy importante en el manejo clínico de estos padecimientos, ya que hasta el momento no existe un tratamiento definitivo (4,5).

En la década de los 80's se definió que las DMD/DMB son ocasionadas por mutaciones en el gen DMD (6-9), cuyo producto es la proteína denominada distrofina (10). La clasificación clínica de las DM, puede ser complementada hoy en día por el análisis molecular del gen (1,11,12). Esta información, es de gran utilidad para brindar un consejo genético adecuado con base en la detección de portadoras, y para diagnóstico prenatal (1,2,13). También los hallazgos o



**Figura 1. Signo de Gowers que evidencia la debilidad de las masas musculares de cintura pélvica y dorsal común en niños principalmente afectados por fenotipos DMD. La posición en decúbito dorsal en un niño afectado por DMD, pone de manifiesto la dificultad para adoptar la posición supina. Clásicamente inicia con la posición de ambas manos en el piso para obtener el punto de apoyo inicial, seguido de la elevación de ambas rodillas (segundo punto de apoyo); así el peso del tronco es superado y el individuo puede ponerse en pie.**

características moleculares de las DM brindan un atractivo panorama para el desarrollo de terapias para estas enfermedades (14,15,16).

## GENÉTICA DE LAS DMD/DMB.

Las DMD/DMB muestran un patrón de herencia recesivo ligado al cromosoma X (6). El gen mutado, presente en los individuos masculinos afectados se puede originar como resultado de una mutación *de novo* (aproximadamente 30%) o puede ser heredado de una madre portadora (17,18). Aunque aún no está claro, parece que la severidad de la enfermedad, y por ende su clasificación, dependen del tipo de mutación que se encuentre en el gen (19).

La incidencia general para la DMD es de uno por cada 3,000-3,500 varones recién nacidos vivos (2,17). Recientemente se ha intentado redefinir la incidencia de la DMD y la DMB con la ayuda de las técnicas de Biología Molecular (análisis del DNA y la distrofina) en una población europea (20), encontrando que las dos terceras partes de los casos son originados por mutaciones *de novo*, y que la DMB tiene una incidencia superior a la previamente reportada (1:30,000 - 40,000) (21), alcanzando una proporción de 7.2 en 100,000 recién nacidos varones. Es posible que la dificultad para obtener la incidencia real de DMB se deba al inicio tardío de los síntomas y a que fenotípicamente se enmascara con otros trastornos neuromusculares (2,20).

Por otra parte, la enfermedad puede expresarse en sujetos femenino (<8%) (22), bajo condiciones que eliminen al alelo normal, por ej. monosomías de cromosomas sexuales (síndrome de Turner) (1), translocaciones cromosoma X;autosoma (23-25), inactivación preferencial del X normal (26,27), disomías uniparentales (28), etc. Un ejemplo que demuestra el efecto de una inactivación no aleatoria, es la presencia de DMD en una de dos gemelas monocigóticas portadoras; estudios recientes reportaron que la gemela afectada mostró una inactivación preferencial del cromosoma X normal (29). Otro caso de inactivación no aleatoria

que conduce a la inactivación del cromosoma X normal se genera en mujeres afectadas con DMD/DMB, por translocaciones entre el cromosoma X y los autosomas (23-25).

La presencia de un alelo DMD mutado en mujeres citogenéticamente normales (portadoras) puede asociarse en ocasiones, a un cuadro subclínico de DMD/DMB (1,2). Algunos estudios han demostrado que la expresión de la sintomatología correlaciona con el nivel de distrofina detectado por inmunohistoquímica (30,31) o por inmunoblot (2,31,32), mientras que en otros no existe correlación alguna (2,32,33). Esto último puede obedecer principalmente al X predominantemente inactivado o a procesos compensatorios a nivel transcripcional aún no bien dilucidados (2,30). Asimismo, no se ha reportado correlación entre el nivel de distrofina muscular por inmunohistoquímica o por inmunoblot y la CPK sérica presente en portadoras (32-34). Más adelante se discutirán los abordajes de laboratorio y gabinete para el diagnóstico de portadoras así como sus ventajas y desventajas.

#### EL GEN DMD Y SU PRODUCTO: LA DISTROFINA.

El gen de la distrofina se encuentra en el cromosoma X, en la banda Xp21.2 (1,6) (Fig. 2). La localización del gen DMD se logró por estudios citogenéticos (35-40) (Fig. 3) y por análisis de ligamiento genético (41-44). El gen fue caracterizado posteriormente por Koenig y cols. por clonación de tipo posicional gracias a un fragmento del extremo 5' del gen denominado pERT87 (7). Cabe mencionar que históricamente este gen fue el primero en caracterizarse por genética reversa (45).

El gen DMD abarca aproximadamente 2.3 megabases (Mb) del locus Xp21 (46), valor equivalente al 1.5% del genoma correspondiente al cromosoma X. Es 100 veces más grande que un gen promedio y 1,000 veces más que un gen de beta-globina; también su tamaño equivale a la mitad del genoma de *E.coli*, el cual se estima posee 5,000 genes (1,2).

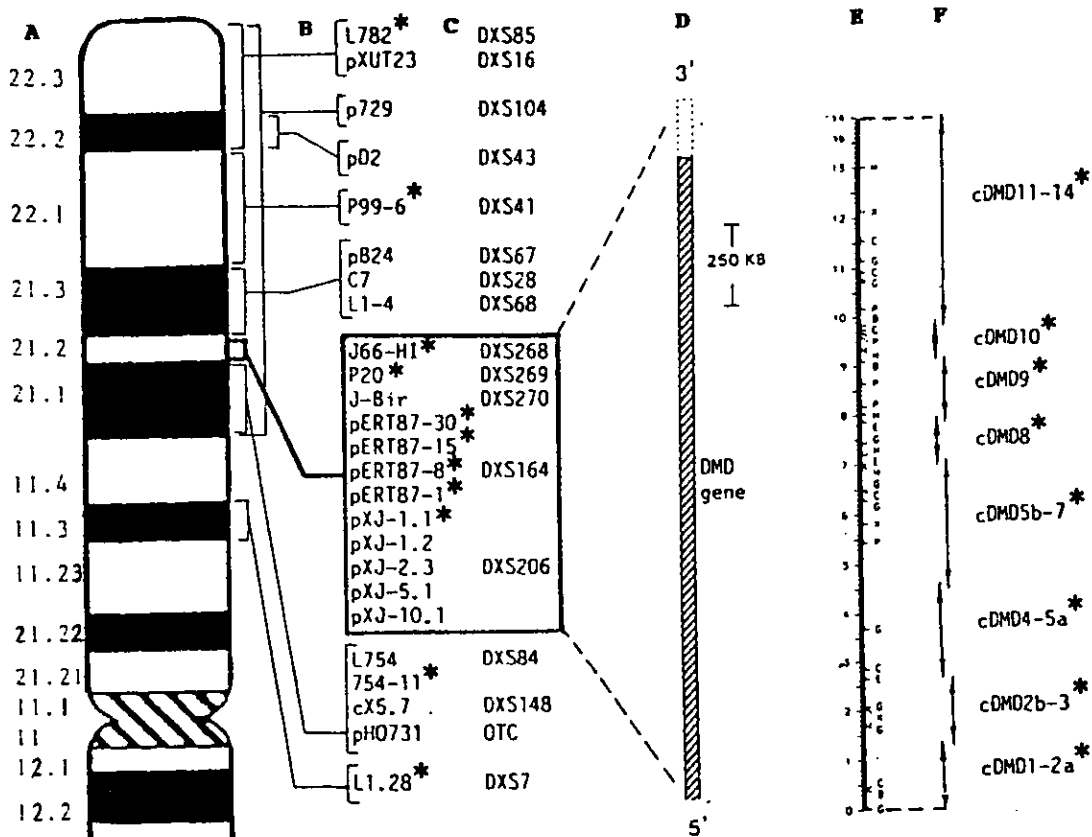
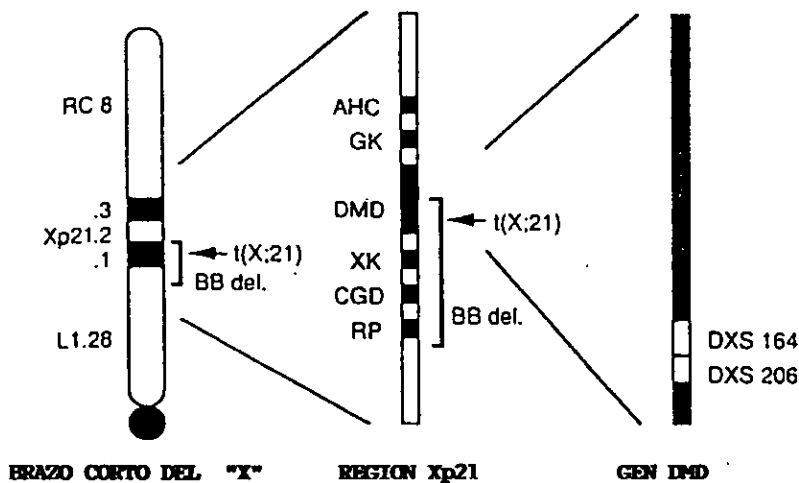


Figura 2. Ubicación del gen DMD en el cromosoma X de humanos. A) Mapa citogenético del brazo corto del cromosoma X. B) y C) Posición de los marcadores genéticos (C) y sondas (B) descritos para Xp. Destacan los marcadores DXS206 (sondas pXJ) y DXS164 (sondas pERT87), como los primeros que demostraron estar estrechamente ligados a DMD/B. D) Las 2.3 Mb del gen DMD. E) Representación del cDNA de 14 kb, así como el mapa de restricción. F) Las principales sondas empleadas en el estudio de Southern blot en deleciones/duplicaciones presentes en DMD/B que analizan la totalidad de la secuencia codificante y su ubicación con respecto a las diferentes regiones del cDNA.



**Figura 3.** Representación esquemática del brazo corto del cromosoma X, mostrando la posición de los marcadores genéticos RC8 y L1.28 de Xp. Xp21 por bandeo citogenético de alta resolución muestra 3 bandas (Xp21.1, Xp21.2, y Xp21.3). En el diagrama de la región Xp21 se representa la localización relativa de los genes AHC, GK, DMD, XK, CGD y RP. También se muestra el sitio de delección intersticial presente en el niño con síndrome de genes contiguos "BB" y el sitio de translocación cromosoma X; cromosoma 21 presente en una mujer afectada de DMD. Históricamente, ambos pacientes fueron punto de partida para iniciar la clonación de tipo posicional del gen DMD. La expansión de la banda Xp21.2 indica la posición relativa de los marcadores DXS164 y DXS206, cuya ubicación corresponde a la región 5' del gen DMD.

El control de la transcripción del gen DMD es complejo (1,2,47). Existen hasta el momento, descritos 5 promotores responsables de la expresión celular constitutiva y tejido-específica de la distrofina; al menos 3 de ellos controlan las isoformas musculares de distrofina de 427 kilodaltones (kDa) (47-49) (Fig. 4). El gen consta de 79 exones (50) y se transcribe en un mRNA de 14 kilobases (kb). Este gen se expresa predominantemente en músculo esquelético y cardíaco (1,2,48), aunque también se han demostrado transcritos en tejido neuronal que se generaron de un promotor exclusivo de este tejido y cuyo tamaño es menor a 14 kb (51,52). La expresión de la isoforma neuronal, dependiente del gen DMD, está probablemente involucrada con el grado variable de retraso mental en algunos de los individuos afectados de DMD (1,53,54).

La distrofina de 427 kDa pertenece al grupo de proteínas de unión a actina, de la superfamilia de las espectrinas (55). Esta proteína conforma el 5% de la proteína total del citoesqueleto subsarcolémico y el 0.001% de la proteína total de la fibra muscular estriada (56). La distrofina contiene 4 regiones "bisagra" (H1-H4) ricas en prolina, a las cuales se les atribuye la flexibilidad de la molécula (55,57) y se compone de 4 dominios (58) (Fig. 5):

El dominio N-terminal se encarga de unir a los filamentos de actina en la línea Z y M del sarcómero; el dominio "rod" consiste en una serie de 24 secuencias repetitivas de 109 aminoácidos, que dan la conformación de triple alfa hélice; el dominio rico en cisteínas está involucrado en la unión del complejo glicoproteico asociado a distrofina (DGAC) y por último el dominio C-terminal es único en la distrofina y en la utrofina (codificada en el cromosoma 6). Los 4 dominios suman un polipéptido altamente hidrofílico de 3,658 aminoácidos., con extremos globulares y una longitud de 150 nm (10,59,60).

En el músculo esquelético, la distrofina se localiza en las estructuras denominadas costámeros, que consisten en conexiones transversas entre las miofibrillas y el sarcolema del



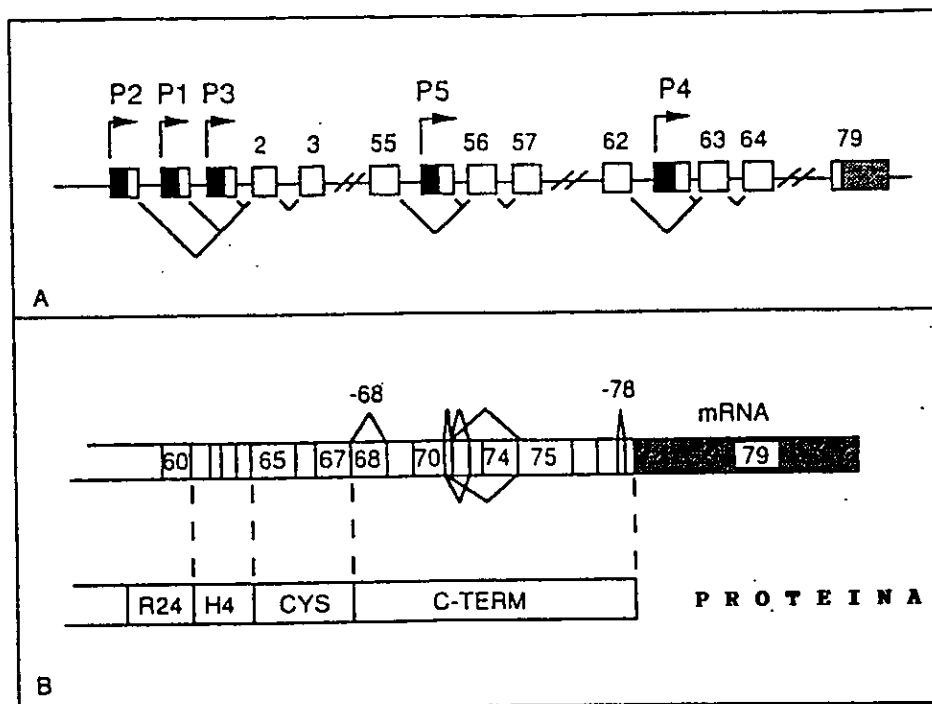


Figura 4. Localización de los diferentes promotores (P1-P5) en el gen DMD que controlan la expresión de las diferentes isoformas de la distrofina y los sitios de "splicing" alternativo. A) Cada uno de los promotores está localizado en un exón, y dentro del mismo existe un sitio ATG de inicio de traducción en el transcrito. Las regiones sombreadas de cada promotor incluyen las regiones 5' UTR, mientras que la región no sombreada corresponde a la secuencia codificante. P1, P2 y P3 producen un transcrito maduro que carece de exón 2 (eliminado por "splicing") y son los responsables de las tres principales isoformas de alto peso molecular (+/- 427 kDa) que varían en pocos aminoácidos. Los exones adyacentes a P4 y P5 conducen el "splicing" de los exones 63 y 56 respectivamente, generando proteínas de 71 y 116 kDa respectivamente. El exón 79 codifica los últimos aminoácidos y contiene una región 3' no traducible de tamaño considerable. B) Los patrones de "splicing" alternativo descritos hasta el momento involucran: 1) la eliminación del exón 68 o del 78, ambas ocasionan corrimiento del marco de lectura y la proteínas resultantes carecen del extremo C-terminal; 2) el "splicing" alternativo en forma individual o colectiva de los exones 71-74 que no altera el marco de lectura, pero generan una proteína con un extremo C-terminal modificado.

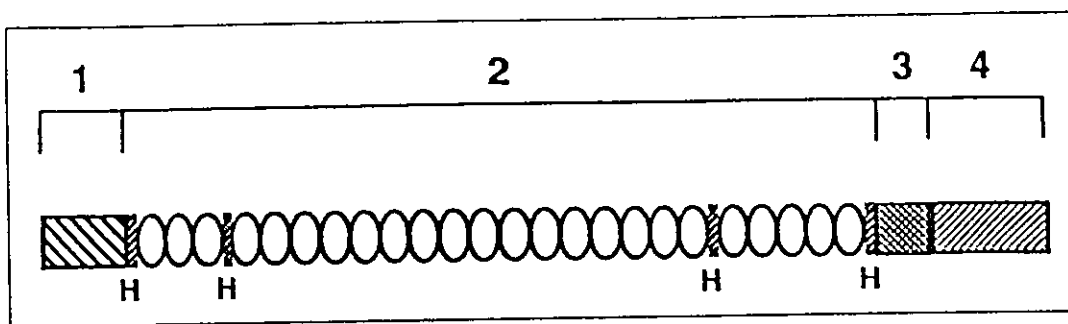


Figura 5. Esquema de la organización por dominios de la isoforma muscular de 427 kDa de distrofina. 1) Extremo amino terminal, 2) dominio "rod" con los 24 repetidos triple alfa hélice, 3) dominio rico en cisteínas y 4) Extremo carboxilo terminal único en utrofina y distrofinas completas. H: regiones bisagra.

músculo esquelético, principalmente a nivel de la línea Z (59,60). La posición estratégica de los costámeros junto a las líneas Z, conduce a un "plegamiento" ordenado de la membrana, paralelo a la contracción de la sarcómera. Este mecanismo protege al músculo del efecto de la contracción (61,62). Por otra parte la distrofina se ancla al citoesqueleto de actina F y al sarcolema mediante el DGAC, que a su vez se ancla con la matriz extracelular, por lo que sirve de puente entre éstos, favoreciendo así la mecánica de la contracción (55,56,60-63) (Fig. 6).

Actualmente hay suficientes evidencias experimentales para demostrar que la ausencia total o parcial o la deficiencia funcional de la distrofina, ocasiona ruptura del sarcolema durante la contracción y relajación muscular (61,63). Así pues, la degeneración muscular es sin duda el resultado más relevante de esta anomalía. La sustitución de este tejido por componentes conectivos (fibrosis endomisial) forma parte de la fisiopatología de la enfermedad. Estos eventos explican las manifestaciones clínicas de individuos con DMD/DMB (1,2,64).

La correlación entre el dominio dañado de la distrofina y el fenotipo DMD o DMB condujo a varias contradicciones (1,19,65,66). Algunos estudios reportaron casos "benignos" o leves de DMD asociados a distrofinas con dominios N-terminal deletados (67), mientras que en otros éste era esencial para la función de la distrofina y por ende su carencia generaba fenotipos graves (66). En forma también contradictoria, salieron a la luz estudios que revelaban pacientes con deleciones en el dominio C-terminal con fenotipos sumamente variables (66,68,69). El único consenso predictivo que relaciona el tipo de alteración en la distrofina con el fenotipo es dependiente del marco de lectura. En los pacientes con DMD, las mutaciones presentes en el gen generan un cambio en el marco de lectura, mientras que en pacientes con DMB éste no se altera. Así, la eliminación de exones que terminan en nucleótidos que corren el marco de lectura, condicionan un fenotipo grave tipo Duchenne, mientras que aquellos que completan un codón no ocasionan corrimiento (dado que eliminan codones completos), y se correlacionan frecuentemente con fenotipo leve o Becker (50), especialmente si la deleción ocurre en exones

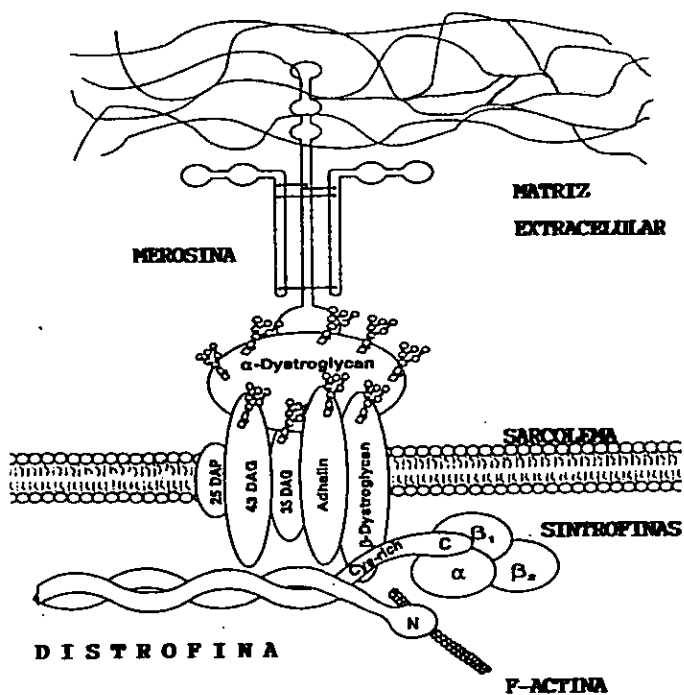


Figura 6. Organización del complejo distrofina/DGAC (complejo glicoproteico asociado a distrofina) en tejido muscular estriado. La merosina es un componente de la matriz extracelular que se une específicamente al  $\alpha$ -dístroglicano, que a su vez interactúa con el complejo glicoproteico insertado en el sarcolema (adalina o 50 DAG,  $\beta$ -dístroglicano, 43 DAG, 35 DAG y la 25 DAP). Las evidencias apoyan que el  $\beta$ -dístroglicano interactúa con el dominio rico en cisteínas de la distrofina y el extremo N-terminal lo hace con el citoesqueleto de F-actina, para con ello cerrar el anclaje entre el citoesqueleto, el sarcolema y la matriz extracelular. En el extremo C-terminal de la distrofina se han detectado tres tipos de proteínas denominadas sintrofinas cuyo papel aún se desconoce.

que codifican para el dominio "rod" de la distrofina (63). Este consenso apoya la hipótesis de Mónaco, la cual propone que las deleciones que no provocan corrimiento del marco de lectura producen una proteína con función residual asociada a fenotipos Becker (63,70), e idealmente se corrobora analizando el marco de lectura de los fragmentos de unión resultantes de los exones conservados en el transcrito maduro o en la organización del gen (19,71).

La organización de los 79 exones y las correspondientes regiones que codifican en la distrofina y los bordes de éstos se muestran en la **tabla 1** (50).

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

De los estudios preliminares realizados en DNA proveniente de pacientes, ha quedado claro que las deleciones intragénicas de tamaño variable (9,39,72,73), son las responsables de aproximadamente el 60% de los casos con DMD/DMB (1,9,73-75), no existiendo diferencias entre las diversas poblaciones (74) (**tabla 2**). Paralelamente con el uso de Southern blot para la detección de deleciones, se pudo corroborar que las duplicaciones parciales intragénicas son responsables del 6-8% de los casos con DMD/DMB (1,75). En la última década, también se han caracterizado un número importante de mutaciones puntuales con diversos efectos en el flujo de la información genética del locus DMD (1,76).

Las deleciones en el gen DMD son muy heterogéneas, pueden eliminar desde un exón hasta el gen completo, incluso produciendo síndromes de genes contiguos (1,9,39). Múltiples estudios han demostrado dos sitios del gen altamente susceptibles (puntos calientes) para sufrir deleciones parciales. Uno de ellos abarca los primeros 20 exones, en tanto que el otro se encuentra entre el intrón 44 y los exones 53/55 (8,73-78) (**Fig. 7**).

Tabla 1. Exones del gen DMD (\*).

No. de exón	Dominio en distrofina	Tamaño del fragmento de DNA genómico que contiene al exón, según patrón de restricción con HindIII	Extremo 3' del exón	
			Último nucleótido	Tipo de borde
1.	UTR/N	3.2	239	1
2.	N	3.25	301	3
3.	N	4.2	394	3
4.	N	8.5	472	3
5.	N	3.1	565	3
6.	N	8	738	2
7.	N	4.6	857	1
8.	N/H1	7.5	1039	3
9.	H1	7.5	1168	3
10.	H1/R1	10.5	1357	3
11.	R1	10.5	1539	2
12.	R2	3.9	1690	3
13.	R2	6.6	1810	3
14.	R2/R3	2.7	1912	3
15.	R3	2.7	2020	3
16.	R3	6	2200	3
17.	H2	1.7	2376	2
18.	R4	12	2500	3
19.	R4	3	2588	1
20.	R4/R5	7.3	2830	3
21.	R5	11	3011	1
22.	R6	20	3157	3
23.	R6	20	3370	3
24.	R7	20	3484	3
25.	R7	20	3640	3
26.	R8	5.2	3811	3
27.	R8	5.2	3994	3
28.	R9	1.2	4129	3
29.	R9	1.2	4279	3
30.	R10	4.7	4441	3
31.	R10	18	4552	3
32.	R11	18	4726	3
33.	R11	18	4882	3
34.	R12	1.8	5053	3
35.	R12	0.45	5233	3
36.	R13	1.3	5362	3
37.	R13	1.5	5533	3
38.	R14	6	5656	3
39.	R14	6	5794	3
40.	R15	6.2	5947	3
41.	R15	6.2	6130	3
42.	R16	4.2	6325	3
43.	R16	11	6498	2
44.	R17	4.1	6646	3
45.	R17	0.5	6822	2
46.	R18	1.5	6970	3
47.	R18	10	7120	3

48.	R19	1.2, 3.8	7306	3
49.	R19	1.6	7408	3
50.	R19/H3	3.7	7517	1
51.	H3/R20	3.1	7750	3
52.	R20	7	7868	1
53.	R20/R21	7.8, 1.0	8080	3
54.	R21	8.3	8235	2
55.	R22	2.3	8425	3
56.	R22	8.8	8598	2
57.	R23	1	8755	2
58.	R23/R24	6	8876	1
59.	R24	6	9145	3
60.	R24/H4	3.5	9292	3
61.	H4	6.6	9371	1
62.	H4	2.8	9432	2
63.	H4	12	9494	1
64.	H4	2.4	9569	1
65.	CYS	2.5	9771	2
66.	CYS	2	9857	1
67.	CYS	1.4	10015	3
68.	C	6.6	10182	2
69.	C	6.6	10294	3
70.	C	1.5	10431	2
71.	C	1.5	10470	2
72.	C	2	10536	2
73.	C	1.9	10602	2
74.	C	2.4	10761	2
75.	C	10	11005	3
76.	C	10	11129	1
77.	C	2	11222	1
78.	C	3	11254	3
79.	C/UTR	6.0, 7.8	13958	

(\*) Tomado y modificado de Roberts RG y cols. (ref. 50).

UTR: Región no traducible.

N: Dominio N-terminal de distrofina.

R: Dominio tipo "rod" de distrofina.

H: Región bisagra de distrofina.

CYS: Dominio rico en cisteínas, único en distrofina y utrofina.

C: Dominio C-terminal de distrofina.

**Tabla 2. Frecuencias de deleciones reportadas en diferentes grupos étnicos (\*).**

Autor(es) / país	Exones analizados	Deleción	% deleciones en exones 45-51 (punto caliente central)	Método
Immoto y cols. 1993, Japón	Todo el cDNA	53/88 60%	47.2%	Southern blot
Tsukamoto y cols. 1991, Japón	cDNA de exones 4,8,12,17,19,44,45,48 y 51.	12/28 48%	75.1%	PCR y Southern blot
Sugino y cols. 1989, Japón	Todo el cDNA	18/42 43%	MPRC	Southern blot
Yang y cols. 1994, China	Exones 1,3,6,8,13,17,43,47,50,52 y 60	15/41 37%	NM	PCR múltiple
Soong y cols. 1991, China	Todo el cDNA	13/29 45%	50%	Southern blot
Ballo y cols. 1994, Sudáfrica	Exones 3,4,6,8,13,19,42,44,45,48,50-53, 60. Sondas para cDNA de exones 1-19 y de 44-60	52/128 40%	65%	PCR múltiple y Southern blot
Hodgson y cols. 1989, Reino Unido	Todo el cDNA	163/287 57%	NM	Southern blot
Covone y cols. 1992, Italia	Pr neuronal y muscular, exones 1,3,4,6,8, 12,13,16,17,19-22,29,32,34,41-52 y 60	96/152 63%	NM	PCR múltiple
Den Dunnen y cols., 1989, Noruega	Todo el cDNA	115/119 59%	MPRC	Southern blot
Kadasi y cols. 1991, Checoslovaquia	Sondas cf56a, cf56b, 1-2a,2b-3,4-5a,5b-7 y 8	14/32 44%	NM	Southern blot
Niemann-Seyde y cols. 1992, Alemania	Pm(1),3,4,6,8,12,13,17,19,43-52 y 60	35/56 62.5%	57.5%	PCR múltiple
Baranov y cols. 1993, Rusia	Pm(1),6,8,12,17,19,42-45,47,48,50,52	49/119 41%	73.5%	PCR múltiple y Southern blot
Gillard y cols. 1989, Canadá	Todo el cDNA	109/181 60%	NM	Southern blot
Chamberlain y cols. 1992, EUA (estudio multicéntrico)	Exones 4,8,17,19,44,45,48,51	346/745 (46%)	NM	PCR múltiple
Baumbach y cols. 1989, USA	Todo el cDNA	90/160 56%	69%	Southern blot
Darras y cols. 1988, USA	Todo el cDNA	21/32 (66%)	MPRC	Southern blot
Vainzof y cols. 1991, Brazil	Sondas cf 56* y cf 56b	19/47 (40%)	NM	Southern blot
Coral-Vázquez y cols. 1993, México (ref. 99)	Exones Pm(1),4,8,12,13,17,19,43,44,45, 48,50, 51,52	21/40 52.5%	86.3%	PCR múltiple
Banerjee y cols. 1997, India (ref. 74)	Pm(1),3,4,6,8,12,13,17,19-22,34,42-44,46-53,55, 60	103/160 64%	69.7%	PCR múltiple

NM: No mencionado

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

(\*) Tomado y modificado de Banerjee M, Verma IC. Are there ethnic differences in deletions in the dystrophin gene?. Am. J. Med. Genet. 1997; 68:152-7 (ref.74).



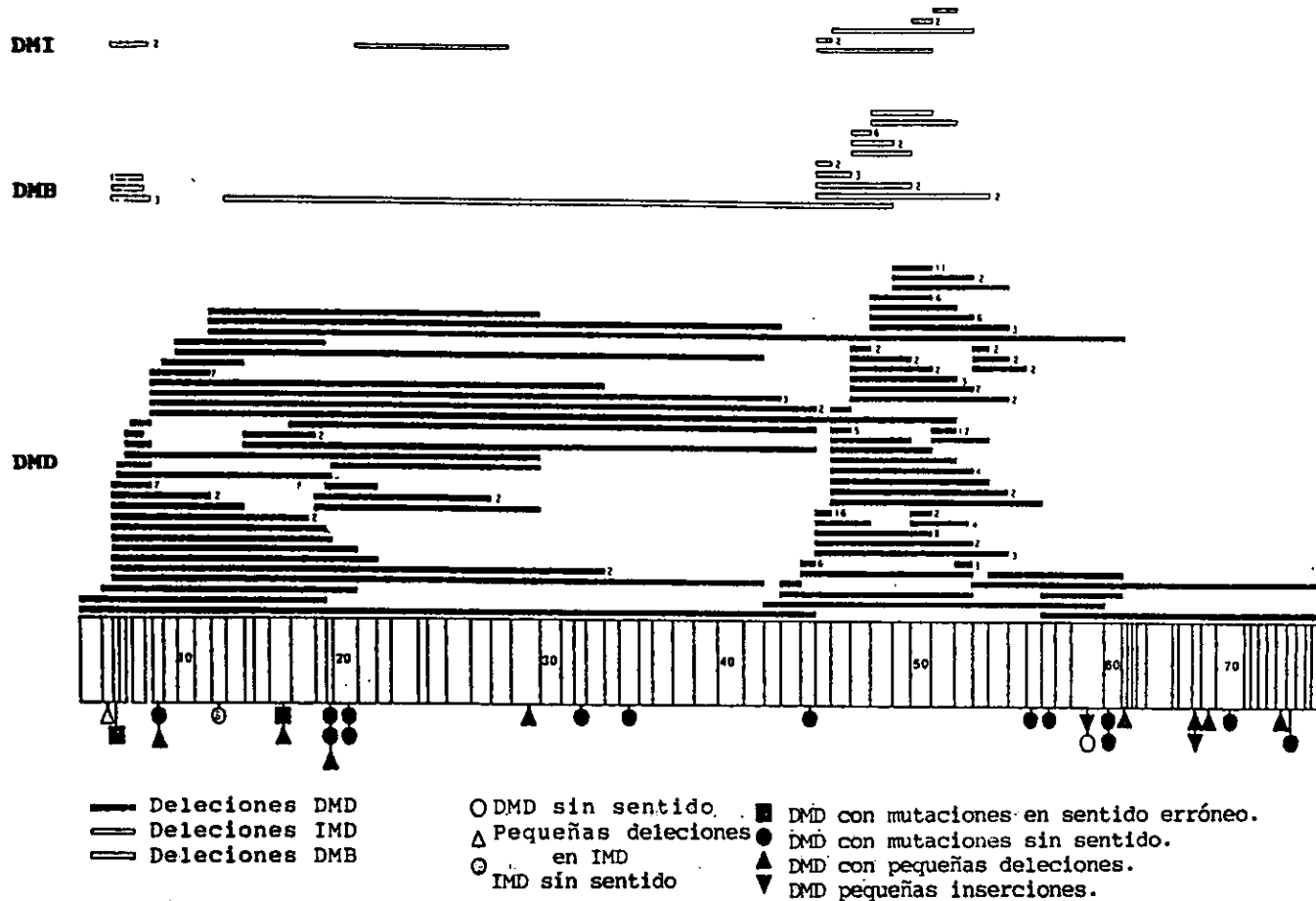


Figura 7. Distribución de pequeñas mutaciones y grandes deletiones en el gen DMD. La barra horizontal numerada del 10 al 70 representa la región codificante del gen DMD dividida en 79 exones y su tamaño proporcional. Las deletiones se esquematizan arriba del cDNA y abajo a las mutaciones de tipo puntual o microinserciones/delecciones. Los números a la derecha de las deletiones indican el número de pacientes no relacionados afectados por la misma deleción.

Los mecanismos de delección pueden explicarse con base en fenómenos de ruptura atribuibles a mecanismos de recombinación. Estos eventos pueden tener lugar durante la meiosis (78) o durante la mitosis en etapas tempranas de la embriogénesis (79). La presencia de dos sitios calientes entre los exones 1 y 20 y del 43 al 55, sugiere la presencia de una característica especial que predispone a estas zonas a fenómenos de ruptura y pérdida; por ejemplo, el intrón 44 (+/-170 kb), posee secuencias ricas en A-T y secuencias polimórficas de repetidos CA (posiblemente involucradas en la recombinación) (80,81), e incluso un elemento tipo transposon (82); este último se encontró en los sitios de ruptura de varios casos de DMD. La presencia de delecciones/duplicaciones parciales intragénicas en la región 5' del gen se asoció a casos debidos a mosaicismos germinales, en tanto que los eventos mutacionales en el extremo 3' y el punto caliente central del gen se asocian a mutaciones *de novo* generadas con mayor frecuencia en línea germinal materna (83-85). Las duplicaciones obedecen a los mismos mecanismos que dan por resultado delecciones, especialmente la recombinación homóloga (tipo ICHs), que origina duplicaciones en tandem (86-88). Asimismo las secuencias *Alu* presentes en regiones intrónicas del gen DMD también pueden estar involucradas en la génesis de estos eventos (87).

Menos de la tercera parte de los pacientes con DMD/DMB son debidos a mutaciones puntuales que conducen al corrimiento del marco de lectura, creación de codones de terminación, eliminación de sitios de "splicing", inactivación o disminución de la función promotora y mutaciones de sentido erróneo (76). Se ha descrito un caso de DMD causado por la inserción de un elemento retrotransponible L1 en secuencias codificantes del gen (89) e inversiones pericéntricas del cromosoma X que interrumpen al gen (90). Cabe mencionar que no existe un sitio caliente para las mutaciones puntuales (1,78,91). Son raros los casos reportados con más de una delección puntual (1,92) (tabla 3).

**Tabla 3. Mutaciones de tipo puntual y pequeñas inserciones/deleciones reportadas en el gen DMD y sus efectos sobre la proteína (\*).**

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

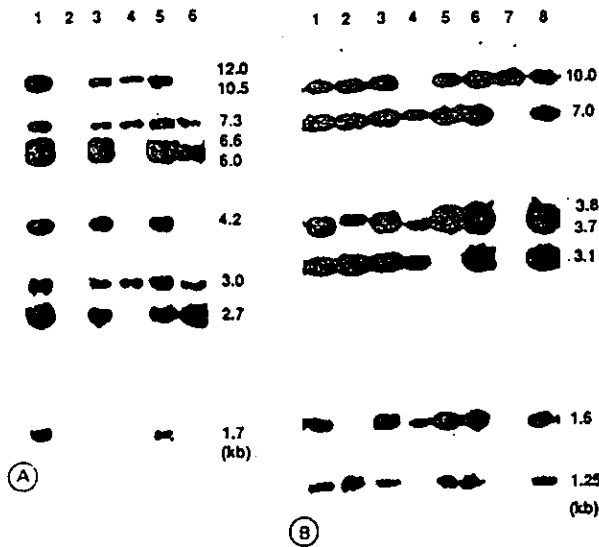
Corrimiento en el marco de lectura.

(\*) Tomada y modificada de Scriver y cols. (ref.1).

## DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE DMD/DMB.

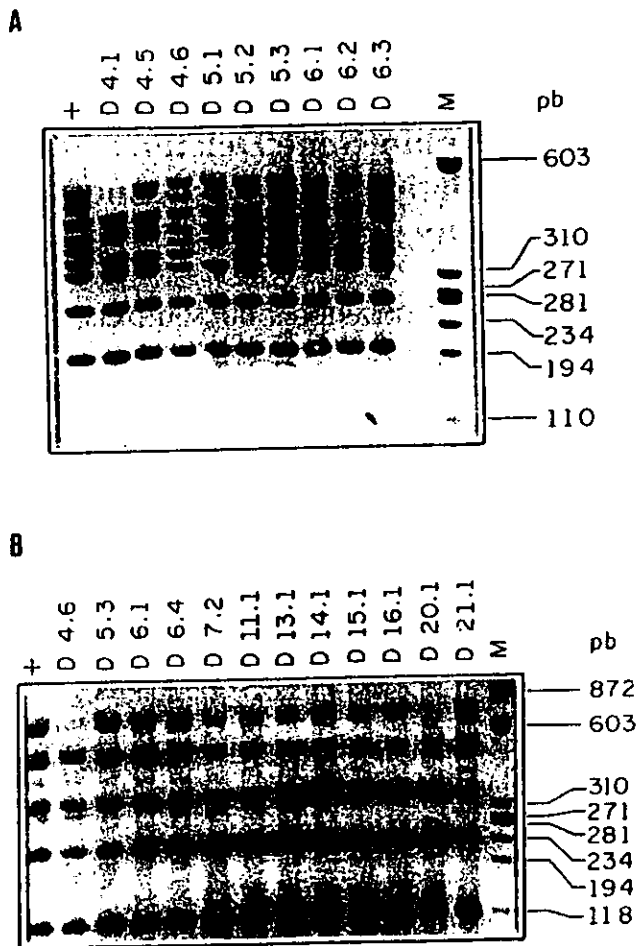
El Southern blot fue la técnica utilizada en los 80s e inicio de los 90s, para el diagnóstico de las DMD/DMB. Este análisis requiere 7-12 sondas que abarcan la longitud total del cDNA (2,7,73,75,93) (Figs. 2 y 8) para detectar duplicaciones parciales y deleciones en pacientes y portadoras (2,7,75,88,93,94). En 1985 se clonaron fragmentos aledaños a la región Xp21 incluyendo un fragmento de DNA que contenía una pequeña parte del gen DMD conocido como pERT87 (95). Utilizando este fragmento como sonda en el Southern blot se lograron detectar deleciones en el 10% de los casos con DMD (72). El Southern Blot ha sido sustituido en gran parte por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), mediante la cual se puede amplificar más de un exón por reacción (PCR múltiple; M-PCR) (77,96,97). La razón de éste desplazamiento se basa en el menor costo, trabajo, tiempo, cantidad y calidad de DNA utilizado en el análisis por M-PCR (77,97).

La técnica de M-PCR aplicada al diagnóstico molecular de DMD/DMB, fue diseñada por Chamberlain y cols. en 1989 (96) y complementada más tarde por Beggs y cols. en 1990 (77). Con esta técnica se pueden evidenciar hasta el 98% de las deleciones intragénicas y completas del gen detectadas por Southern blot (77). Una de las agrupaciones en M-PCR de exones más utilizadas es aquella que analiza 13 exones y el promotor muscular en 2 reacciones por separado (9-plex y 5-plex) (97-99) (Fig. 9). Los exones incluidos en el estudio por M-PCR, abarcan regiones del extremo 5' y la región central del gen. Los exones amplificados, incluyen toda la secuencia codificante del exón, los sitios de splicing y algunas bases de los bordes intrónicos (72,88). Debido a su tamaño (diferencias entre 50 y 100pb), los exones amplificados, son fácilmente visualizados en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (97). Mediante otra estrategia utilizada en nuestro laboratorio, pueden amplificarse 18 exones y el promotor muscular-exón 1, en 4 reacciones separadas (datos no reportados). La técnica de M-PCR, cuando se modifica para hacerla cuantitativa, se puede aplicar a la detección de duplicaciones, defecto



**Figura 8. Análisis de Southern blot para búsqueda de deleciones en los dos puntos calientes del gen DMD en sujetos afectados (\*). El DNA genómico total se restringió con HindIII y en A) se sometió a hibridación con la sonda 2b-3 (exones 11-20, región 5') y en B) con la sonda 8 (exón 47-53, región central). En A) se observan deleciones en líneas 2, 3, 4 y 6. Línea 1 control masculino normal (9 bandas correspondientes a los 9 exones); en B) se observan deleciones en 2, 4, 5 y 7. Línea 1 control masculino sano (7 bandas correspondientes a los 7 exones).**

(\*) Tomado de Zeng y cols. *J. Med. Genet.* 1991; 28:167-170. (ref. 129)



**Figura 9.** Análisis del gen DMD por PCR múltiple (9- y 5-plex) de acuerdo a Beggs y cols. (\*) De mayor a menor peso molecular: A) amplificación de exones 45, 48, 19, 17, 51, 8, 12, 44, 4; B) exones Pm1, 43, 13, 50, 52. Los carriles (+) corresponden a controles masculinos sanos. En A) se observa delección en D4.1 (45-48), D4.5 (48), D5.1 (12), D5.2 (48), D6.2 (48-51), D6.3 (17). B) Delección únicamente en D4.6 (Pm1).

(\*) Tomado de Coral-Vázquez y cols. Arch. Med. Res. 1993; 24:1-6. (ref. 99)

no detectable por simple M-PCR (2,97,100-107). Asimismo ésta se aplica a la determinación de dosis génica en la detección de mujeres portadoras (ver más adelante).

El novedoso análisis del mRNA del gen DMD, por RT-PCR (actividad de reverso transcriptasa acoplada a PCR), tiene la ventaja de analizar completamente la secuencia codificante de 14 kb, sin necesidad de tomar biopsia muscular, ya que se analizan transcritos "ectópicos" (mRNA de linfocitos periféricos) (108). Mediante esta técnica se analizan regiones no estudiadas por un M-PCR, y también es útil en la detección de portadoras (1,2,108). La desventaja son los falsos positivos reportados en algunos casos, debido al "splicing" alternativo realizado en tejidos no musculares (109).

#### DETECCIÓN MOLECULAR DE PORTADORAS.

Una vez que se ha hecho el diagnóstico molecular de DMD/DMB, el siguiente paso es indagar si la madre es o no portadora de la mutación y esto a su vez determinará subsiguientes investigaciones en otras mujeres emparentadas con el caso índice (2,110). El alto índice de mutaciones durante la maduración de la línea germinal, propicia que dos terceras parte de los casos con DMD/DMB se originen *de novo*, pero de estos un tercio de los casos son mutaciones *de novo* en el paciente, un tercio en la madre y el resto son casos familiares; así una madre con un hijo afectado tiene un riesgo que oscila entre 30-60% de ser portadora de una mutación (17,18,111-113). Recientemente existe evidencia para suponer que el riesgo de ser portadora de una delección, especialmente si ésta se localiza en la región central, es de 30%, debido al alto número de mutaciones por grandes rearrreglos en la maduración del ovocito (83-85,112,113).

Antes de la clonación del gen, la variación en los niveles de CPK en suero de mujeres potencialmente portadoras, era la única prueba disponible para determinar el estado de portadora. Este tipo de análisis es un procedimiento rápido, sencillo y barato, sin embargo no es confiable

(1-3,31-34). Posteriormente, en algunas familias el consejo genético se basaba en la identificación del sexo fetal o en la utilización de algunos marcadores extra o intragénicos del locus DMD para identificar al alelo de riesgo al realizar diagnóstico prenatal (13,31,94). A pesar de estos avances, con las sondas genómicas no se logró establecer una estrategia que sustituyera a los métodos tradicionales de diagnóstico (1-3,114).

El análisis de distrofina por inmunoblot e inmunohistoquímica revelan en ocasiones diferentes comportamientos en portadoras (2,30-33,114); de hecho existen estudios donde se pone de manifiesto la inconstancia de resultados provenientes de portadoras en diferentes etapas de su vida (valores menos confiables en mujeres adultas que en niñas) (31-33) y de ahí su limitación para brindar un asesoramiento certero.

Las metodologías basadas en el análisis de DNA, parecen ser las pruebas que arrojan resultados más consistentes y precisos en el diagnóstico de portadoras (1,2,110,115,116). Una vez conocida la mutación responsable de la enfermedad, ésta se puede rastrear en la madre y en los otros familiares con riesgo de portar el defecto. Los estudios aplicados a las potenciales portadoras pueden ser de tipo indirecto (fragmentos de restricción de longitud polimórfica o RFLPs, los repetidos en tandem de número variable o VNTRs y las secuencias repetitivas cortas en tandem o STRs) o directos (Southern Blot cuantitativo, M-PCR cuantitativo, RT-PCR, análisis de heterodúplex, restricción de exones amplificados, etc.) (1,2,110).

El análisis de RFLPs (115) y de STRs/VNTRs (81,107,115,117-120), es el método de elección cuando no se encuentra la mutación responsable del padecimiento o no se cuenta con metodologías más sofisticadas para análisis directos. La información es útil en casos de DMD/DMB familiares y en algunos casos de asignación de no portadoras en familias con un sólo miembro afectado, siempre y cuando la madre sea informativa (heterocigota) (2,110). Los RFLPs han sido ampliamente utilizados (13,31,32,43,94,98,101,115,116) y se basan en el análisis de



sitios de restricción polimórficos que sirven como marcadores para seguir la segregación de los cromosomas en un árbol genealógico. Así, se puede asignar el estado de portadora entre las familiares femeninas de primer grado, excluir el estado de portadora o identificar el alelo en riesgo (2,110). Recientemente han salido a la luz estudios con secuencias microsátélites y altamente polimórficas del tipo STRs con índices de heterocigocidad superiores a los VNTRs (117,120). Desafortunadamente, el análisis de ligamiento pierde en ocasiones su valor predictivo debido a la frecuencia relativamente elevada de recombinación (5-10%) en el gen DMD (1,2,121) o cuando existe mosaicismo germinal (1,2,111). Para aumentar la eficiencia predictiva, puede utilizarse más de un polimorfismo (2,110,115,116).

Posterior a la optimización del M-PCR en DMD, el propio Chamberlain y cols., propusieron que si la reacción de M-PCR permanecía en la fase exponencial de la amplificación, la técnica podría hacerse cuantitativa (MQ-PCR) y por ende útil para la asignación de dosis génica en portadoras, una vez conocida la delección/duplicación del caso propósito (97). A partir de entonces se han diseñado varias metodologías, que permiten evaluar la eficiencia del amplificado utilizando la radioactividad (103), la fluorescencia (103,107), o hasta el simple bromuro de etidio (100,104), siendo los primeros menos utilizados ya que la tendencia actual es eliminar la medición directa o indirecta de la radioactividad acoplada al amplificado (100,106,107) y porque los métodos que utilizan iniciadores ("primers") marcados con fluorocromo, tienen una sensibilidad del 100%, pero requieren equipos de medición y reactivos sumamente costosos (98).

Existen estudios donde la combinación de estrategias basadas en MQ-PCR y RFLPs o STRs, dan por resultado un 100% de eficiencia en el otorgamiento de consejo genético en familias con DMD/DMB (101,107).

En la búsqueda de optimización y simplificación de las técnicas de MQ-PCR para determinar dosis génica, Abbs y cols. en 1992 (100), crearon una reacción de MQ-PCR no radioactiva, no fluorescente, sencilla, confiable, sumamente barata, directa y cuantitativa a relativamente bajo número de ciclos (23 ciclos); esta técnica se considera muy útil en la determinación de dosis génica (105,106). La técnica además se adaptó perfectamente a nuestros recursos, por lo que fue una base importante del proyecto para la detección de portadoras de deleciones en el gen DMD.

## JUSTIFICACIÓN

Las DMD/DMB son los padecimientos musculares hereditarios más frecuentes a nivel mundial y tienen un carácter invalidante y letal en el individuo. En este tipo de padecimientos no existe tratamiento definitivo hasta el momento, por lo que es indispensable el consejo genético para la prevención de la enfermedad. En nuestro país la detección de portadoras en familiares con DMD/DMB se basa en métodos tradicionales indirectos, tales como: determinación de CPK (122), electromiografía y recientemente por RFLPs y VNTRs/STRs (117,119). La importancia de la biología molecular en este campo estriba en su alta sensibilidad y especificidad para la prevención de estos padecimientos invalidantes y con ello la oportunidad de otorgar un consejo genético de certeza.

Actualmente acuden a la consulta externa de Genética en el Departamento de Investigación en Genética Humana, del Instituto Nacional de Pediatría, 101 familias con DMD/DMB. Sólo 14 de ellas tienen antecedentes heredofamiliares para la enfermedad, por lo que se pudo determinar el estado de portadora obligada sólo en la madre; sin embargo en las hermanas y otros familiares femeninos el estado de portadora era incierto lo mismo que en el resto de las madres y hermanas de los casos índice sin historia familiar de la enfermedad. La mayoría de estas mujeres potencialmente portadoras se encuentran en etapa reproductiva, por lo que es indispensable conocer si son o no portadoras del defecto.

## **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar las mutaciones responsables de la DMD/DMB en una muestra de pacientes mexicanos y detectar a las portadoras en los familiares de primer grado.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1) Determinar la frecuencia de las deleciones responsables de DMD/DMB.
- 2) Conocer la frecuencia de los polimorfismos pERT87.8/TaqI y pERT87.15/XmnI (RFLPs) y haplotipos resultantes.
- 3) Determinar la frecuencia de recombinación intragénica del locus DMD.
- 4) Determinar la frecuencia de mutaciones *de novo* (tipo deleción).
- 5) Detectar a las portadoras de las distrofias musculares tipos Duchenne y Becker.
- 6) Conocer la utilidad por separado y en forma conjunta, de los análisis de ligamiento (RFLPs) y por MQ-PCR para otorgar un asesoramiento genético certero en familias con DMD/DMB.
- 7) Proponer un algoritmo diagnóstico fundamentado en biología molecular para familias con DMD/DMB.

## MATERIAL Y MÉTODOS

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

### I. Estrategia general.

Se creó un banco de DNA proveniente de 75 familias no emparentadas entre sí (74 pacientes masculinos con DMD/DMB, una mujer portadora con hermano fallecido a causa de DMB, así como sus familiares de primer grado). A todos los pacientes se les realizó el análisis de deleciones por PCR múltiple del promotor y 19 exones (exones Pm-1, 6, 8, 9, 12, 13, 16, 17, 19, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55), los cuales se amplificaron en 4 reacciones separadas que representan a las regiones más frecuentemente deletadas en el gen. A las madres de los pacientes con deleción se les midió la dosis génica mediante MQ-PCR y densitometría. Se utilizó como control interno cualquiera de los exones no deletados en los pacientes.

Se realizaron RFLPs utilizando dos polimorfismos de la región 5' (pERT87.8/TaqI y pERT87.15/XmnI), se hizo el análisis de segregación en cada árbol genealógico y se determinaron las frecuencias alélicas y de haplotipos en nuestra población.

Con base en los datos generados se determinó: la frecuencia y localización de las deleciones; frecuencia de portadoras de las mutaciones; frecuencia de los polimorfismos intragénicos/haplotipos y su asociación o no con alelos DMD/DMB, porcentaje de recombinación intragénica, ocurrencia de mutaciones *de novo* y la utilidad de los RFLPs y MQ-PCR para otorgar consejo genético a familias con DMD/DMB.

En la Fig. 10 se representa el diagrama de flujo seguido en nuestro diseño experimental.

## ALGORITMO METODOLÓGICO

Diagnóstico Clínico, de laboratorio/gabinete e histopatológico de DMD/DMB



Captación de la familia en Biología Molecular



Creación del banco de DNA



Búsqueda de deleciones por M-PCR de 19 exones en el caso índice  
Análisis de ligamiento (PCR/RFLPs de pERT87.8/TaqI y pERT87.15/XmnI) en cada familia



Deleción presente



MQ-PCR a familiares femeninos.  
Evaluación dosis génica conjuntando  
hallazgos de RFLPs  
(DIAGNOSTICO DE CERTEZA)



Deleción ausente



Análisis de ligamiento (RFLPs)  
Excluir o asignar alelo de riesgo en  
hermanas, evidenciar recombinación  
intragénica ó mutación *de novo*.  
(DIAGNOSTICO INDIRECTO)



**CONSEJO GENÉTICO**



Frecuencia y localización de deleciones en el gen DMD  
Obtención de frecuencias de polimorfismos y haplotipos  
Asociación de haplotipos con alelos DMD  
Frecuencia de recombinación intragénica  
Frecuencia de mutaciones *de novo*.  
Eficiencia diagnóstica para asesoramiento genético por MQ-PCR y RFLPs

Fig. 10. Algoritmo metodológico.

## **II. Población objetivo y estudio clínico.**

El presente estudio analizó las muestras de 214 individuos (120 mujeres y 94 varones) pertenecientes a 75 familias no emparentadas entre sí. La clasificación de los pacientes en fenotipos DMD ó DMB, se realizó con base en la gravedad del cuadro clínico, tomando en cuenta la edad de inicio, evolución y edad de la pérdida de la deambulaci3n. Así, los pacientes que dejaron de caminar antes de los 15 años se clasificaron como DMD, mientras que los pacientes con pérdida de la deambulaci3n después de los 15 años se consideraron como DMB. Al momento de su ingreso al estudio, 14 familias tenian historia familiar positiva de DMD/DMB (5 con fenotipos Becker y 9 con fenotipos Duchenne). Las madres portadoras obligadas de estas 14 familias, tenian antecedentes de hermano, tío o primo por rama materna con DMD/B u otro hijo afectado por la misma patología.

Para fines de análisis, sólo se incluyeron a los familiares de primer grado de los casos índice (n=74), así se analizaron 75 madres, 45 hermanas, 15 hermanos (3 de ellos afectados con DMD/B) y 5 padres. Sin embargo cabe mencionar que en algunas familias se analizaron muestras de primas y primos hermanos, abuelas, tías y tíos de rama materna. A todos los pacientes se les realizó historia clínica completa (anexo 1) con árbol genealógico, determinaci3n sérica de CPK, electromiografía y biopsia muscular.

## **III. Estudio molecular.**

### **III.a. Extracci3n de DNA.**

Se obtuvieron 7-15 ml. de sangre periférica en tubos vacutainer con EDTA o ACD, los leucocitos se separaron por centrifugaci3n a 2,500 rpm, se lavaron con amortiguador para células rojas y se lisaron con proteinasa K. Se eliminaron las proteínas por extracci3n fenólica y el exceso de fenol

fue retirado con 2 lavados de cloroformo:alcohol isoamilico 24:1. El DNA se precipitó con NaCl y etanol a -20°C, se lavó con etanol al 70% a temperatura ambiente y posteriormente se resuspendió en 200-300 µl de amortiguador TE pH 8.0. Para la cuantificación del DNA se realizó una dilución de 1:250 de DNA genómico:agua bidestilada y se cuantificó en un espectrofotómetro a una densidad óptica (D.O.) de 260 nm mediante la siguiente fórmula:

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

donde:

$\text{DO}_{260}$ : – Densidad óptica a una  $\lambda$  de 260 nm

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

Factor de dilución: Equivalente a 1:250 µl.

El criterio de pureza de fenol (lectura a 240 nm) y proteínas (lectura a 280 nm), se obtuvo calculando el cociente entre estas lecturas y la lectura a 260 nm (DNA); el cociente por encima de 1.6 se consideró adecuado para estudio. La integridad del DNA se evaluó en electroforesis en geles de agarosa al 0.7% a 100V por 30 minutos. Posteriormente se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador con luz UV. La integridad del DNA se consideró como óptima cuando se observó 1 banda nítida de alto peso molecular (>23 kb del marcador de pesos moleculares fago  $\lambda$ /HindIII).

### III.b. Síntesis de oligonucleótidos iniciadores F y R.

Los oligonucleótidos se prepararon utilizando el método de fosforoamidita en un oligosintetizador (Pharmacia) y se purificaron en columnas de Sephadex G-25. La secuencia de los 19 exones y los 2 polimorfismos (pERT87.8/TaqI y pERT87.15/XmnI) y el peso de los productos respectivos se muestran en la tabla 4.



**Tabla 4. Secuencias de los primers empleados en M- y MQ-PCR, y análisis de RFLPs (\*).**

SEG.DMD	SECUENCIA PRIMER	TAMAÑO DEL AMPLIFICADO (pb)
<b>Pml</b>	F: GAAGATCTAGACAGTGGATACATAACAAATGCATG R: TTCTCCGAAGGTAATTGCCTCCAGATCTGAGTCC	535
<b>EXON 6</b>	F: CCACATGTAGGTCAAAAATGTAATGAA R: GTCTCAGTAATCTCTTACCTATGACTATGG	202
<b>EXON 8</b>	F: GTCCTTTACACACTTTACCTGTTGAG R: GGCCTCATCTCATGTCTAATTAG	360
<b>EXON 12</b>	F: GATAGTGGCTTTACTTACATCCTTC R: GAAAGCACGCAACATAAGATACACCT	331
<b>EXON 13</b>	F: AATAGGAGTACCTGAGATGTAGCAGAAAT R: CTGACCTAAGTGTCTTCCAAAGCAG	238
<b>EXON 16</b>	F: TCTATGCAAATGAGCAAATACACGC R: GGTATCACTAACCTGTGCTGACTC	290
<b>EXON 17</b>	F: GACTTTCGATGTTGAGATTACTTTCCC R: AAGCTTGAGATGCTCTCACCTTTTCC	416
<b>EXON 19</b>	F: TTCTACCACATCCCATTCTCTCCA R: GATGGCAAAAAGTGTGAGAAAAAGTC	459
<b>EXON 43</b>	F: GAACATGTCAAAGTCACTGGACTTCATGG R: ATATATGTGTACCTACCTTGTGGTCC	357
<b>EXON 45</b>	F: AAACATGGAACATCCTGTGTTGGGAC R: CATTCTATTAGATCTGTGCCCTAC	547
<b>EXON 47</b>	F: CGTTGTTGCAITTTGTCTGTTTCAGTTAC R: GTCTAACCTTTATCCACTGGAGATTG	181
<b>EXON 48</b>	F: TTGAATACATTGGTTAAATCCCAACATG R: CCTGAATAAAGTCTTCTTACCACAC	506
<b>EXON 49</b>	F: GTGCCCTTATGTACCAGGCAAAAATTG R: GCAATGACTCGTTAATAGCCTTAAGATC	439
<b>EXON 50</b>	F: CACCAAATGGATTAAGATGTTTCATGAAT R: TCTCTCACCCAGTCATCACTTCATAG	271
<b>EXON 51</b>	F: GAAATTGGCTCTTTAGCTTGTGTTTC R: GGAGAGTAAAGTGATTGGTGGAAAAATC	388
<b>EXON 52</b>	F: AATGCAGGATTGGAAACAGAGGCGTCC R: TTCGATCCGTAATGATTGTTCTAGCCTC	113
<b>EXON 53</b>	F: GGCTCTGGCTGTCCCTAAGAC R: CAGAACCGGAGGCAACAGTTGA	100
<b>EXON 54</b>	F: AGGATTCAGAAAGCTGTTTACGAAAGT R: AATCCTCATGGTCCATCCAGTTCA	329
<b>EXON 55</b>	F: ATGAGTTCACTAGGTGCACCATTTCT R: TGTTC AATTGGATCCACAAGAGTGC	303
<b>pERT87.8</b> <b>TaqI</b>	F: GTCAGTTGGTCAGTAAAAGCC R: CAGATCAGTGGACCAATTAACCACAGCAG	T1: 145 T2: 71 / 74
<b>pERT87.15</b> <b>XbaI</b>	F: GACTGGAGCAAGGGTCCCC R: CTGATGAAACAATTTCCCTTTCATTCCAG	X1: 740 X2: 520 / 220

(\* Secuencias reportadas por Chamberlain et al. (ref. 96), Beggs et al. (ref. 77), Abbs et al. (ref. 123) para exones, y Roberts et al. (ref. 13) para RFLPs.

### III.c. Reacción de M-PCR.

Con los 19 pares de oligonucleótidos sintetizados se formaron 4 grupos de reacciones:

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

Para los 4 grupos se mezclaron de 250-500 ng de DNA genómico con una solución que contenía: amortiguador para el fragmento Stoffel de la Taq polimerasa (10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl), 200  $\mu$ M de dNTPs, 0.1-0.25  $\mu$ M de oligonucleótidos iniciadores F y R, 3 U de Taq polimerasa y 6.8 mM de  $MgCl_2$ , a un volumen final de reacción de 50  $\mu$ l. Como control de cada reacción se agregó un tubo con todos los reactivos excepto DNA. En todos los casos se utilizaron microtubos de 0.6 ml de pared delgada. El volumen de reacción se cubrió con 25  $\mu$ l de aceite mineral grado molecular para evitar la evaporación de la muestra.

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

### III.d. Electroforesis en geles de agarosa.

Las muestras amplificadas (15  $\mu$ l) se corrieron 30 minutos a 100 V en un gel de agarosa al 2.5%. Los productos de PCR se visualizaron y se fotografiaron en un transiluminador con luz UV con película Polaroid 667. Se corroboraron los pesos moleculares de cada amplificado con base en su migración y con respecto a un marcador de pesos moleculares de 100 pb.

### III.e. Reacción de MQ-PCR.

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

Las condiciones para la amplificación se ajustaron de la siguiente manera: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min seguida de 23 ciclos de desnaturalización a 94°C por 48 seg alineación a 54-56°C por 48 seg (dependiendo de los iniciadores), extensión a 68°C por 3 min con incrementos de 5 seg en cada ciclo, seguidos de una elongación final de 3 min a 68°C. Para cada familia en particular se analizaron uno o dos de los exones afectados en el paciente y se utilizaron como control uno o dos de los no deletados. Asimismo se corrieron en forma simultánea las muestras de un sujeto femenino y masculino normales.

### III.f. Electroforesis en geles de poliacrilamida.

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

### III.g. Determinación de dosis génica.

El negativo fotográfico obtenido del paso anterior se analizó en un densitómetro automático (Cliniscan TM). Se obtuvieron los picos máximos para muestras problemas y en cada una de las reacciones se incluyeron muestras controles de hombres y mujeres normales y se calcularon los valores promedio para cada una de las bandas. Se consideró además la variación intramuestra que resulta de la comparación de la intensidad generada por la amplificación en el mismo individuo, tomando como referencia la eficiencia de amplificación de los mismos exones en sujetos normales (controles). La variación en cuanto a eficiencia de amplificación para cada uno de los exones fue un hallazgo reproducible en los ensayos por duplicado de todas las muestras. Este fenómeno de amplificación desigual intramuestra en todos los segmentos analizados se debe básicamente al tamaño de cada uno de los amplificados, a las diferencias sutiles de las  $T_m$  óptimas respectivas de los oligonucleótidos iniciadores, a la concentración ideal de  $Mg^{++}$  libre para cada uno de los amplificados y finalmente al porcentaje de G-C en cada uno de los exones (96,97,100,123). Así, al igual que en otros reportes, los exones con alta eficiencia

de amplificación producen picos mayores en el análisis densitométrico con respecto a los de menor eficiencia, aún en estudios que utilizan fluorocromos (102,107), sin embargo esto no interfiere con la asignación de dosis génica, ya que incluso los amplificadores de mayor eficiencia de amplificación muestran doble dosis en los controles femeninos con respecto a los masculinos.

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

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

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

### III. h. Análisis de RFLPs.

Para esta parte del estudio se incluyeron las 75 familias. Se estudiaron mediante PCR, 2 sitios polimórficos intragénicos del locus DMD (13), ampliamente utilizados para consejo genético en otras poblaciones (31,98,123): pERT87.15/Xmnl (X) y pERT87.8/TaqI (T). La amplificación de estos sitios polimórficos se llevó a cabo mezclando 500 ng de DNA genómico en una solución con amortiguador para el fragmento Stoffel de la Taq polimerasa (10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl), 2.0 UI de AmpliTaq, 0.1µM de cada oligonucleótido iniciador, 150µM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5% de DMSO (únicamente para Xmnl), en un volumen de reacción final de 50 µl. En el caso de TaqI, la reacción se llevó al cabo bajo las siguientes

condiciones: se inició con una desnaturalización a 94 °C por 5 min., seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 50 seg., alineación a 55 °C por 50 seg. y extensión a 70°C por 3 min. y una elongación final a 70°C por 5 min. Para XmnI, fueron 26 ciclos bajo las mismas condiciones exceptuando la temperatura de extensión que fue a 68°C. La restricción se llevó al cabo mezclando el amplificado con 3UI de TaqI o 12UI de XmnI a 65°C y 37°C respectivamente, durante toda la noche. Los productos de restricción se corrieron en geles de agarosa al 2.5% bajo las condiciones ya descritas. En todas las reacciones de amplificación/restricción se corrieron en forma paralela muestras con genotipos conocidos (controles) para cada una de las combinaciones posibles de RFLPs.

#### **IV. Correlación fenotipo-genotipo.**

Este análisis se realizó de acuerdo a la hipótesis de Mónaco (19,70). Con base al número de nucleótidos en el extremo 3' del exón que antecede al deletado (1, 2 o 3 nucleótidos) y de los nucleótidos 5' del exón siguiente a la deleción, se puede inferir pérdida o no del marco de lectura. Este efecto sobre el marco de lectura, se dedujo del conocimiento de la secuencia y los límites de cada exón y de empalmar los límites de los exones que quedaban contiguos por el efecto de la eliminación del o los exones.

## RESULTADOS

En las 75 familias ingresadas al estudio, la historia clínica, los estudios de laboratorio y gabinete fueron comparables con DMD/DMB en todos los casos índice (CPK elevada en suero al menos en una determinación, biopsia muscular con hallazgos histopatológicos compatibles con distrofia muscular y electromiografía con patrón miopático). Basados en el curso clínico y severidad de la enfermedad, en estas 75 familias, 62 (82.7%), el caso índice tenía el diagnóstico de fenotipo Duchenne, 12 (16%) portaban fenotipos Becker y sólo en una el caso índice tenía un cuadro intermedio (1.3%). Los análisis de árboles genealógicos mostraron que sólo el 18.7% (n=14) de las madres eran portadoras obligadas. Tres de ellas contaban con el registro de CPK elevada en suero.

La calidad y cantidad del DNA genómico obtenido en todas las familias se consideró adecuado (Fig. 11).

### I. Detección de deleciones en casos índice por M-PCR.

Se identificaron deleciones en el 50.6% de las 75 familias (n=38); de las cuales 32 fueron DMD, 5 DMB y 1 con fenotipo intermedio. En la figura 12 se muestran algunos ejemplos de la detección de deleciones por M-PCR. De todos estos, 29 (76.3%) presentaban la deleción en la región central del gen (región comprendida entre los exones 43 y 55), 6 (15.8%) en la región 5' (región que abarca exón 1/Pm hasta exón 19), 1 (2.6%) con una gran deleción ya que sólo se logró amplificar el exón 1/Pm, y 2 (5.3%) tenían una deleción completa ya que ninguna de las regiones 5' y central del gen exploradas por nuestra M-PCR, se logró amplificar, hallazgo que se interpretó como deleción completa del gen (Fig. 13).

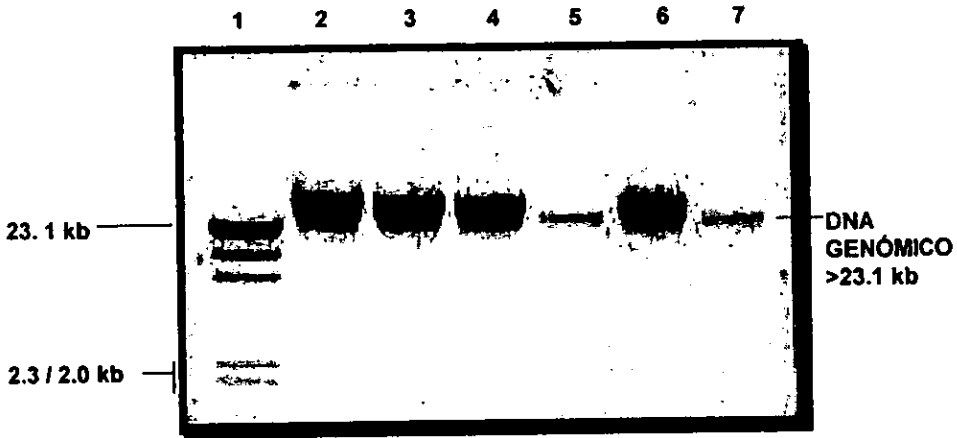


Figura 11. Integridad óptima de DNA genómico (stock y dilución de trabajo 1:10) obtenido por la técnica de extracción fenol:cloroformo y precipitación salina. El carril 1 contiene un microgramo del marcador de pesos moleculares fago  $\lambda$  digerido con HindIII. Los carriles 5 y 7 contienen 100 ng aproximadamente de DNA genómico, provenientes de una primera dilución 1:10 obtenida a partir del DNA stock (carriles 2-4 y 6, que contienen cerca de  $1\mu\text{g}$ ).



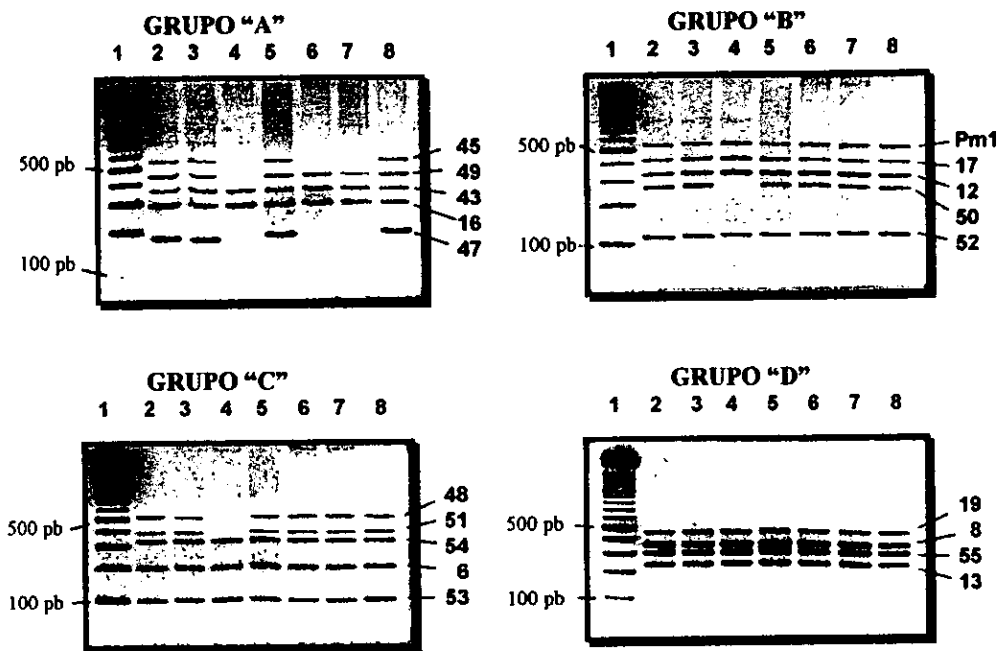
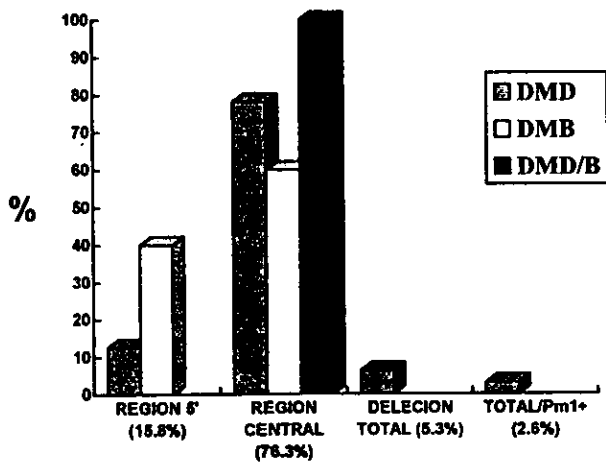


Figura 12. Electroforesis de 6 casos índice DMD/DMB sometidos a análisis por M-PCR de 4 grupos (19 exones). Los pesos para cada uno de los productos de amplificación se muestran en la Tabla 4. En los 4 geles, el carril 1 corresponde al marcador de pesos moleculares (escalera de 100 pb), y el 8 a un control masculino sano. Grupo A: carril 4 paciente con delección de exones 45-49; carriles 6 y 7 caso índice y hermano afectado por la misma delección (exones 45-47). Grupo B: carril 4 delección del exón 50 que correlaciona con los hallazgos del grupo A; resto sin delección. Grupo C: carril 4 pérdida de exones 48 y 51 que también correlaciona con los hallazgos en A y B. Grupo D, sin casos con delección en estos exones.

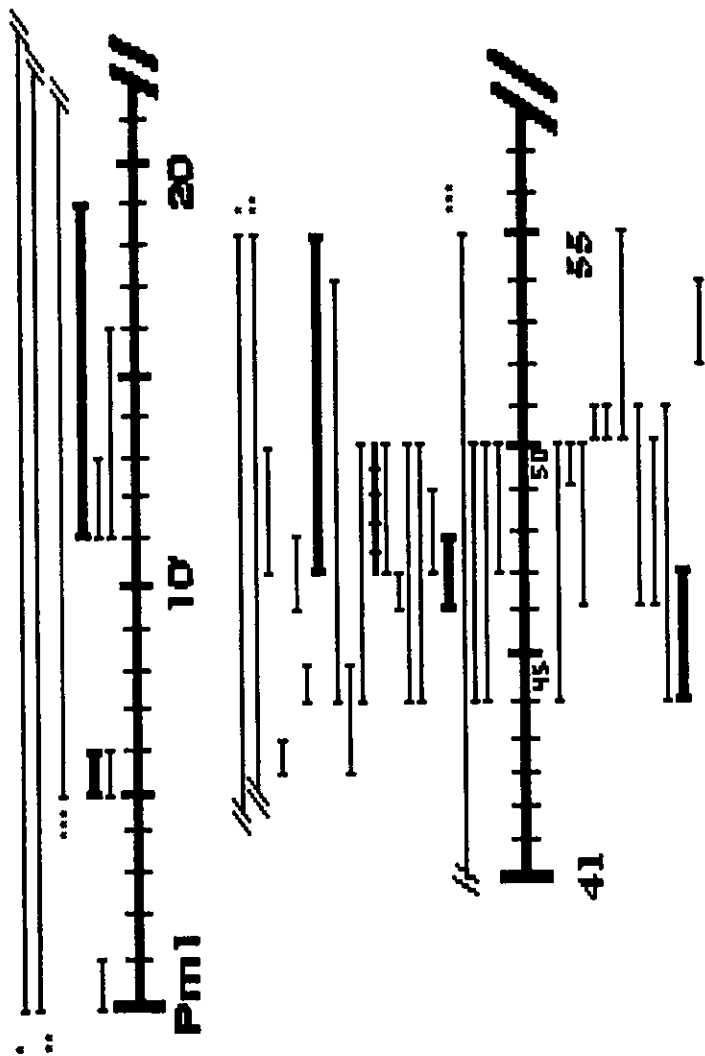


**Fig. 13. Distribución por localización y fenotipos en deleciones del gen DMD.**

Tanto en los pacientes con DMD como en aquellos con fenotipo DMB las deleciones involucraron uno o varios exones de los analizados por M-PCR y no hubo diferencias en la localización de las mismas. Las deleciones completas, semicompletas pero con exón 1 y Pm, y deleción únicamente del Pm/exón 1, sólo se encontraron en pacientes con fenotipos DMD. Cinco de los 12 fenotipos Becker resultaron con deleción (3 en región central y 2 en región 5'). El fenotipo intermedio tenía una deleción en la región central. El análisis en hermanos afectados (N=3) mostró la misma deleción que en el caso índice, lo cual demuestra la heredabilidad y estabilidad de la mutación. En contraparte, hermanos clínicamente sanos (n=7) de casos índice con deleción e hijos de portadora por árbol genealógico y estudios moleculares (n=3) o no portadora (n=4) mostraron ausencia de dicha mutación. La distribución de las deleciones con respecto al cDNA del gen DMD se muestra en la figura 14. Con la excepción de los pacientes con deleciones de ambas regiones, no se encontró deleción que involucrase únicamente al exón 8.

En el 66.7% (20/30) de las deleciones ubicadas exclusivamente en la región central (n=29) y en el paciente con Pm1 pero con el resto del gen deletado (n=1), se encontró que el exón 48 estaba ausente, siendo éste el exón más frecuentemente deletado de esta región. Le siguieron en frecuencia el 49 (60%,n=18) junto con el 50 (60%, n=18), y el exón 47 (53.3%, n=16). En los 6 sujetos con deleción exclusiva de la región 5', 3 de ellos (50%) presentaban pérdida de los exones 12 y 13, le siguió en frecuencia el exón 6, ausente en dos casos índice más (33%).

El intento de correlacionar el diagnóstico clínico DMD/DMB con el tipo de deleción parcial de 35 pacientes, mostró los siguientes resultados: de los 3 pacientes con fenotipos Becker con deleción central, dos de ellos presentan deleción en marco de lectura (exones 48 al 55 y 45 al 47) y uno con corrimiento en el marco de lectura (exones 47 al 48); el paciente con fenotipo intermedio presenta una deleción que no conserva el marco de lectura (exones 48 al 50). En los



**Fig. 14. Localización de las deleciones con respecto a las regiones central y 5' en cDNA encontradas en fenotipos DMD, DMB e intermedios.**

Las barras gruesas indican deleciones en fenotipos Becker, la barra gruesa marcada con líneas verticales indica la deleción presente en los casos con fenotipo intermedio. El resto corresponde a deleciones asociadas a fenotipos Duchenne. Las líneas marcadas con \*, \*\* y \*\*\* corresponden a pacientes con deleciones de exones desde la región 5' con prolongación a la región central.

otros dos pacientes DMB con delección en la región 5', se encontró una delección con corrimiento del marco de lectura ( $\Delta$  6) y otro sin corrimiento ( $\Delta$  12-17). Encontramos que existen algunos pacientes DMD afectados por el mismo tipo de delección "en marco" presente en los fenotipos Becker (Fig. 14).

La detección de delecciones por M-PCR junto con el análisis del árbol genealógico (Fig. 15) mostró que de las 75 familias, sólo 14 contaban con antecedentes heredofamiliares para la enfermedad y de éstas, en 9 (64.3%) presentaban delecciones. En tanto que de las 61 familias restantes con caso único, las delecciones se encontraron en 30 de ellas (49.2%).

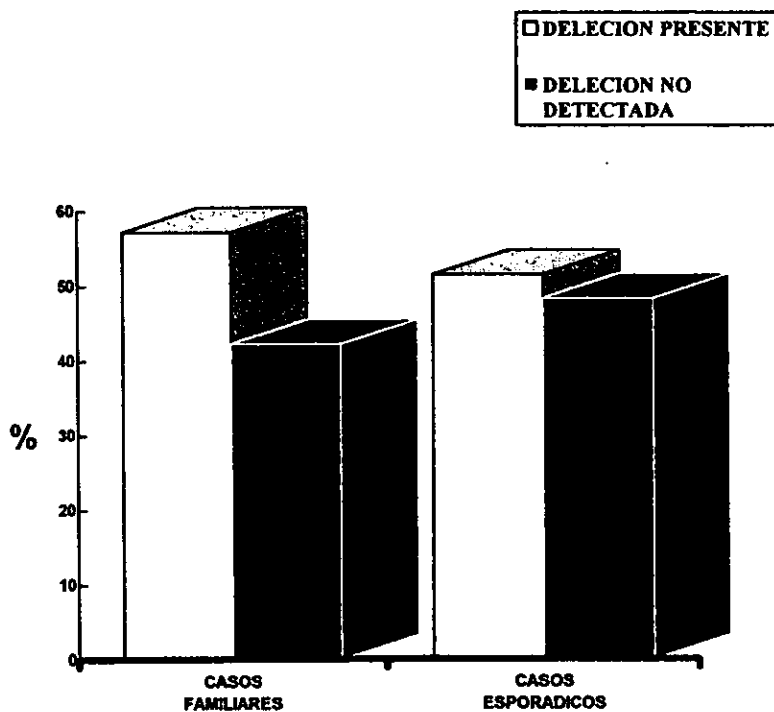
## II. Detección de portadoras.

Al inicio del estudio, de las 120 mujeres incluídas, sólo en 14 se logró el diagnóstico de portadora por genealogía (casos familiares). El resto de las mujeres (61 madres y 45 hermanas) se catalogaron como portadoras probables. Con los datos obtenidos de los estudios del árbol genealógico y la caracterización de delecciones en los casos índice, se iniciaron en forma dirigida los estudios de RFLPs y MQ-PCR.

II. a. Análisis de los polimorfismos pERT87.8/TaqI (T) y pERT87.15/XmnI (X) (RFLPs) mediante el uso de la PCR.

En esta parte se estudiaron un total de 333 alelos de las 75 familias. Los alelos provenían de 75 madres, 74 casos índice varones, 45 hermanas, 15 hermanos y 5 padres.

El primer paso fue identificar los polimorfismos para conocer la frecuencia de madres heterocigotas (informativas). El producto amplificado para estudiar el polimorfismo X es de 740 pb, cuyo polimorfismo se evidencia con la ausencia (fragmento de 740 pb) o presencia para el



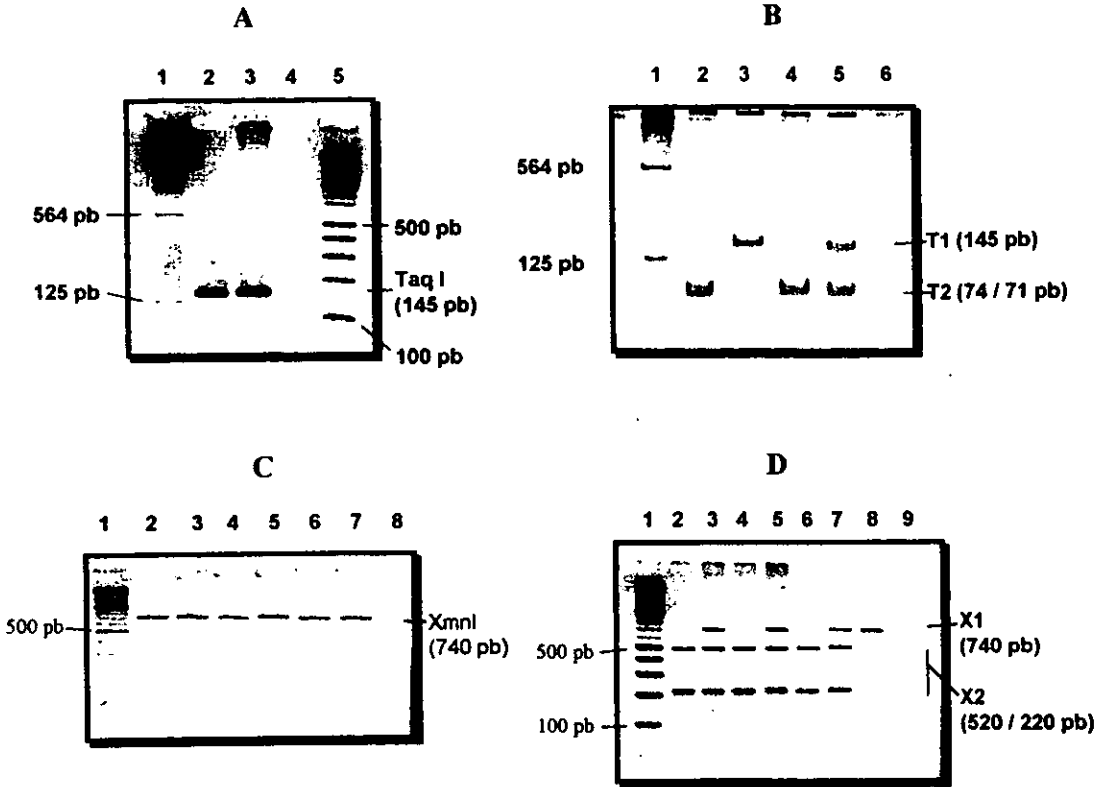
**Figura 15.** Distribución de la familias con caso índice afectado por deleción y presencia o no de antecedentes heredofamiliares. De las 61 familias sin AHF, 30 de ellas (51.6%) presentaron deleción y en los casos familiares (n=14) este mismo tipo de mutación estuvo presente en 9 (64.2%).

sitio de corte reconocido por la enzima XmnI (2 fragmentos con pesos de 520 y otro de 220 pb). 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 4 y Fig. 16). Por convención, se denomina alelo 1 (T1 y X1) al que no contiene el sitio de restricción para la enzima y alelo 2 (T2 y X2) al que sí lo tiene.

La frecuencia de los alelos se muestra en la Tabla 5, en donde se evidencia que el polimorfismo más frecuente para pERT87.8/TaqI fue T2 (frecuencia observada 0.610). Con respecto a pERT87.15/XmnI no existieron diferencias significativas. Debido a la localización intragénica de estos sitios polimórficos en el intrón 13 (T) y 17 (X), se pudo observar la pérdida de éstos ( $\Delta$ ) en un 3.9% ( $\Delta X$ : n=6 y  $\Delta T$ : n=7) de los casos dada la presencia de una deleción total o localizada en la región 5'. El fenómeno se observó en los tres casos índice con deleción total y con deleción donde sólo se conservó el Pml ( $\Delta X$ : n=3 y  $\Delta T$ : n=1), un caso índice con deleción de exones 12-13 ( $\Delta T$ : n=1), una madre portadora de una de estas deleciones totales ( $\Delta X$  n=1 y  $\Delta T$ : n=1) y por último en dos hermanas y una madre portadoras de deleción de exón 12-19 ( $\Delta X$ : n=3 y  $\Delta T$ : n=3).

Para fines de comparación con otras poblaciones, se obtuvieron las frecuencias para X y T en sujetos no emparentados de nuestras 75 familias, es decir todas las madres (n=75, 150 alelos) y padres (n=5, 5 alelos), excluyendo los casos índice, hermanas y hermanos. Las frecuencias para X y T obtenidas en los 155 alelos se muestran en la tabla 6. Para pERT87.8/TaqI el polimorfismo T2 fue el más frecuente (frecuencia observada de 0.613), en tanto que para pERT87.15/XmnI no existió polimorfismo predominante. En la misma tabla se señalan los polimorfismos deletados en las dos madres portadoras comentadas anteriormente.

De las 75 madres estudiadas, encontramos que el 54.7% (n=41) fue heterocigota (informativa) para el polimorfismo X y el 50.7% (n=38) para el polimorfismo T. La frecuencia



**Figura 16. Amplificación y patrones de restricción de los polimorfismos pERT87.8/TaqI y pERT87.15/XmnI. A) Amplificado de TaqI. Carril 1 y 5 marcadores de pesos moleculares (MPM) (fago  $\lambda$ /HindIII y escalera de 100 pb); carril 2 y 3 producto de amplificado TaqI (145 pb) en un sujeto masculino y femenino normales; carril 4 control blanco de la reacción de PCR. B) Patrones de restricción TaqI. Carril 1 MPM (fago  $\lambda$ /HindIII); carril 2 alelo T2 (hombre); carril 3 alelo T1 (hombre); carril 4 alelos T2/T2 (mujer); carril 5 alelos T1/T2 (mujer) y control blanco de PCR/restricción. C) Producto de amplificado XmnI (740 pb). Carril 1 MPM (escalera de 100 pb); carriles 2-7 amplificado en sujetos masculinos y femeninos normales; carril 8 control blanco de PCR. D) Patrones de restricción de XmnI. Carril 1 MPM (escalera de 100 pb); carril 2 alelo X2 (hombre); carril 3 alelos X1/X2, carril 4 alelo X2 (hombre); carril 5 alelos X1/X2 (mujer); carril 6 alelos X2/X2 (mujer); carril 7 alelos X1/X2 (mujer); carril 8 alelo X1 (hombre) y carril 9 control blanco de PCR/restricción.**



**Tabla 5. Frecuencias globales de 333 alelos pERT87, correspondientes a los integrantes de las 75 familias DMD/DMB (\*).**

**pERT87.15/XmnI**

	<b>Alelo</b>	<b>Frecuencia alélica</b>
	<b>X1 (n=145)</b>	<b>0.435</b>
	<b>X2 (n=181)</b>	<b>0.544</b>
	<b>Δ (n=7)</b>	<b>0.021</b>
<b>TOTAL de cromosomas analizados</b>	<b>n= 333</b>	

**pERT87.8/TaqI**

	<b>Alelo</b>	<b>Frecuencia alélica</b>
	<b>T1 (n=124)</b>	<b>0.372</b>
	<b>T2 (n=203)</b>	<b>0.610</b>
	<b>Δ (n=6)</b>	<b>0.018</b>
<b>TOTAL de cromosomas analizados</b>	<b>n = 333</b>	

(\* Alelos correspondientes a 75 madres, 74 casos índice, 45 hermanas, 15 hermanos y 5 padres.

**Tabla 6. Frecuencias de alelos pERT87 de individuos no emparentados.**

**pERT87.15/XmnI**

	<b>Alelo</b>	<b>Frecuencia alélica</b>
	<b>X1 (n=74)</b>	<b>0.477</b>
	<b>X2 (n=79)</b>	<b>0.510</b>
	<b>Δ (n=2)</b>	<b>0.013</b>
<b>TOTAL de cromosomas analizados</b>	<b>n= 155</b>	

**pERT87.8/TaqI**

	<b>Alelo</b>	<b>Frecuencia alélica</b>
	<b>T1 (n=58)</b>	<b>0.374</b>
	<b>T2 (n=95)</b>	<b>0.613</b>
	<b>Δ (n=2)</b>	<b>0.013</b>
<b>TOTAL de cromosomas analizados</b>	<b>n= 155</b>	

de heterocigotas observada fue similar a la esperada. El 76% de las madres (n=57) fue heterocigota para al menos uno de los polimorfismos. Once de las portadoras obligadas (78.6%) fueron madres informativas (POI) y 3 (26.4%) no lo fueron. De las 11 POI sólo en 3, el análisis por RFLPs no permitió determinar el estado de portadoras en hermanas por falta de muestra del padre. En 5 familias( 4 con delección y una sin delección) con POI se detectó o excluyó el alelo mutado en las hermanas y en las tres familias restantes con POI el análisis no tuvo trascendencia ya que no existían hermanas, sin embargo el análisis de MQ-PCR corroboró la asignación de portadora en la madre en dos de estas familias. De las tres familias con madre portadora obligada pero no informativa (PONI), dos tuvieron caso índice sin delección y sólo en una de ellas existe una hermana; en la tercera se trató en realidad de una madre hemicigota y no homocigota para los dos marcadores por delección de exones 12-19, hallazgo corroborado por segregación de alelos (Fig. 17) y análisis de dosis génica por MQ-PCR (ver más adelante).

En las familias sin historia de la enfermedad, se definió como alelo en riesgo a aquel que se heredó al paciente y cuya mutación no ha sido caracterizada. En las familias con casos únicos sin delección (n=31), el análisis de RFLPs logró identificar el alelo sano, por lo que en dos hermanas provenientes de familias distintas se excluyó la presencia del alelo de riesgo, diagnosticándose como no portadoras (Fig. 18). En una familia se detectó un evento mutacional *de novo*, gracias a que habían hermanos varones sanos que compartían el mismo alelo del caso índice. En las 29 restantes, a pesar de contar con madres informativas, en ninguna se logró la asignación de portadora o no portadora en la hermana, por haber heredado el mismo alelo que el hermano afectado y desconocer si la madre era portadora (Fig. 19).

Las frecuencias de polimorfismos encontradas se compararon con las poblaciones marcadas en la tabla 7.

**ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO INTRAGENICO pERT87.8/TaqI**

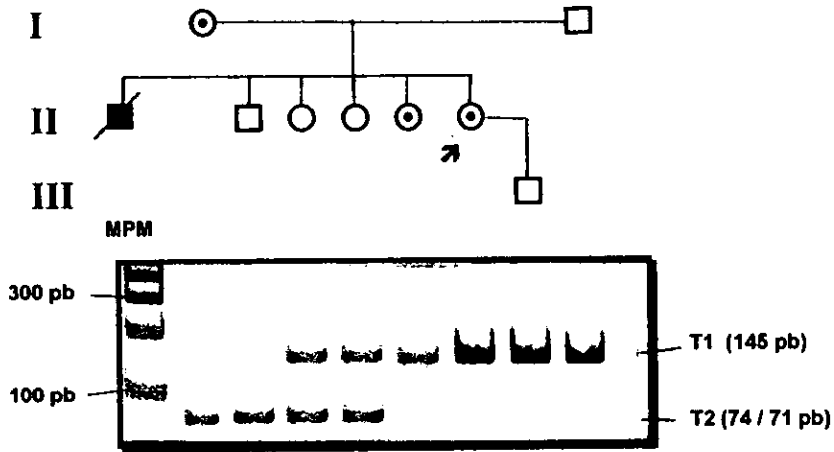


Figura 17. Análisis de TaqI en familia con madre portadora obligada sin disponibilidad de caso afectado por fallecimiento. Se muestran los patrones de restricción para TaqI, en donde dos de las hermanas son heterocigotas, pero claramente en las dos hermanas señaladas como portadoras, existe un estado aparente de homocigocidad para T1, sin embargo T1 es un alelo inexistente en la madre (aparentemente homocigota para T2). El hermano e hijo sanos heredaron el alelo no mutado (T2). Como se explica más adelante, en esta familia existía un alelo DMD con una deleción de la región 5' que eliminaba a ambos RFLPs.

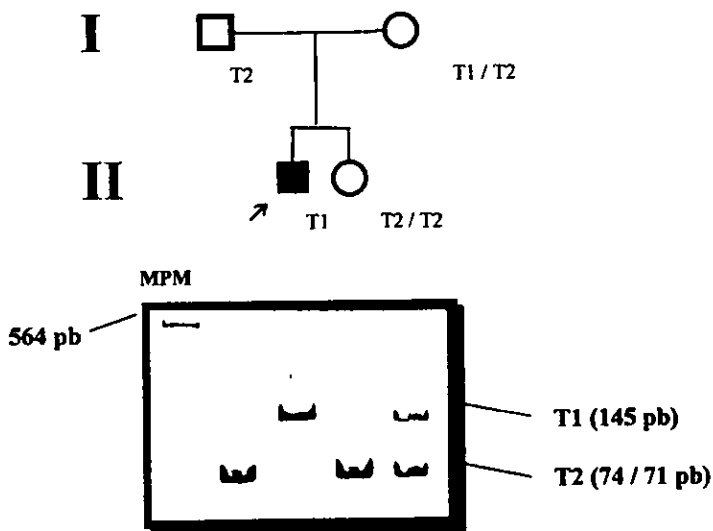
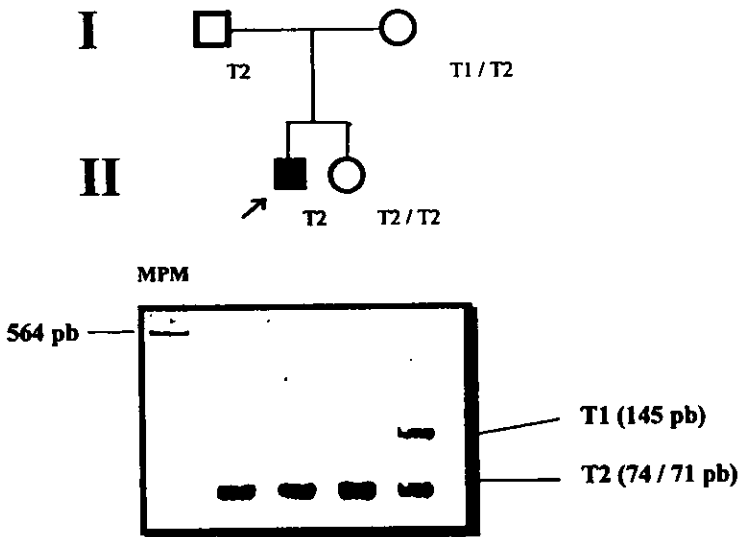


Figura 18. Exclusión de alelo de riesgo en hermana. Esta familia ejemplifica uno de los casos donde el análisis de RFLPs fue útil para descartar la presencia del alelo de riesgo (T1: mutado en el caso índice) en la hermana. La mutación no fue caracterizada en el caso índice, no se tienen antecedentes familiares, pero la madre es informativa (T1/T2). La hermana heredó el alelo sin riesgo (T2) por lo que se puede inferir que aunque la madre fuera portadora, la hermana tiene altas probabilidades de no serlo. En este tipo de análisis se considera la posibilidad de un error de asignación/exclusión por recombinación intragénica (5-10%).



**Figura 19. Presencia de alelo de riesgo en una hermana. El análisis de TaqI evidencia que la hermana ha heredado el mismo alelo que está afectado en su hermano. Dado que no se caracterizó la mutación y tanto la estructura como los antecedentes familiares no fueron de utilidad, a pesar de contar con una madre informativa, la madre y la hermana se catalogan aún como portadoras probables.**

**Tabla 7. Frecuencia de polimorfismos en diferentes poblaciones**

<b>POBLACION</b>	<b>T1 (%)</b>	<b>T2 (%)</b>	<b>X1 (%)</b>	<b>X2 (%)</b>
CHINOS (129)	98/145 (0.68)	47/145 (0.32)	123/206 (0.60)	83/206 (0.40)
GALES (130)	(no esp)0.26	(no esp.)0.74	(no esp.)0.32	(no esp.)0.68
JAPONESES (131)	80/114(0.70)	34/114(0.30)	93/170(0.55)	77/170(0.45)
INGLESES (134)	42/150(0.28)	108/150(0.72)	ND	ND
CAUCASICOS (135)	27/105(0.26)	78/105(0.74)	>75 (0.32)	>75 (0.68)
HINDUES (134)	24/57(0.421)	33/57(0.579)	ND	ND
NIGERIANOS (134)	6/28(0.214)	22/28(0.786)	ND	ND
TURCOS (98)	28/117(0.24)	89/117(0.76)	32/122(0.26)	80/122(0.74)
MEXICANOS (*)	58/155(0.374)	95/155(0.613)	74/155(0.477)	79/155(0.510)

(\*) El presente estudio.

## II. b. Análisis de haplotipos.

Los haplotipos analizados resultaron de las combinaciones de X1/T1 (A), X1/T2 (B), X2/T1 (C) y X2/T2 (D). En el 10.8% de los casos se presentó delección de los haplotipos o no fue posible identificarlos por no lograr definir los haplotipos en los hijos o madres. La frecuencia global de los 4 haplotipos en madres y casos índice se muestra en la tabla 8. Los resultados mostraron que el haplotipo más frecuente fue el D tanto en las madres (32.7%) como en los casos índice (31.5%), mientras que el menos frecuente fue el haplotipo C (casos índice 12.3%, madres 14.7%). Es evidente la gran similitud de frecuencias entre ambas poblaciones, por efecto de herencia, pero no se evidenció la predominancia de un haplotipo en particular en alelos DMD, ya que tienen la misma distribución presente en las madres. Este resultado también correlaciona con los resultados obtenidos del análisis de T y X en sujetos no emparentados (ver tabla 6), donde predomina T2 y en menor proporción X2.

Se investigó si existe asociación de los haplotipos con la mutación presente en el caso índice (delección o no delección) (Fig. 20). En 15 de los pacientes sin delección caracterizada por M-PCR, predominó el haplotipo A (41.7%), pese a no ser el haplotipo más frecuente global. La no amplificación (por delección) de polimorfismos no se presentó en ningún caso índice sin delección.

Para el tercer punto analizamos las frecuencias de haplotipos contra la presencia de alelos heredados de madres portadoras o no portadoras, mismas que fueron clasificadas con certeza por AHF y/o RFLPs y/o MQ-PCR (ver más adelante). El número de madres con diagnóstico de certeza sobre el estado portador o no portador de la enfermedad fue de 44: 14 portadoras obligadas conocidas (9 con delección), 5 portadoras recién diagnosticadas mediante MQ-PCR y 25 donde se descartó el estado de portadora por MQ-PCR (n=24) o RFLPs (n=1, mutación *de novo*) (fig. 21). De manera adicional se obtuvo el registro de haplotipos para las 31 madres restantes en



**Tabla 8. Frecuencias de haplotipos pERT87 correspondientes a 75 madres (A) y 73 casos índice (B) en las 75 familias DMD/DMB (\*).**

**A)**

<i>HAPLOTIPO</i>	<i>NUMERO DE ALELOS</i>	<i>%</i>
A	32	21.3
B	37	24.7
C	22	14.7
D	49	32.7
DELETADOS	2	1.3
INDETERMINADOS	8	5.3
<b>TOTAL DE CROMOSOMAS ANALIZADOS</b>	<b>150</b>	<b>TOTAL : 100%</b>

**B)**

<i>HAPLOTIPO</i>	<i>NUMERO DE ALELOS</i>	<i>%</i>
A	20	27.4
B	17	23.3
C	9	12.3
D	23	31.5
DELETADOS	4	5.5
<b>TOTAL DE CROMOSOMAS ANALIZADOS</b>	<b>73</b>	<b>TOTAL : 100%</b>

(\*) No se contó en este análisis con dos casos índice, uno por fallecimiento antes de ingresar al estudio y otro por que no acudió a toma de nueva muestra para concluir análisis de ligamiento, aunque se le realizó el análisis de M-PCR.

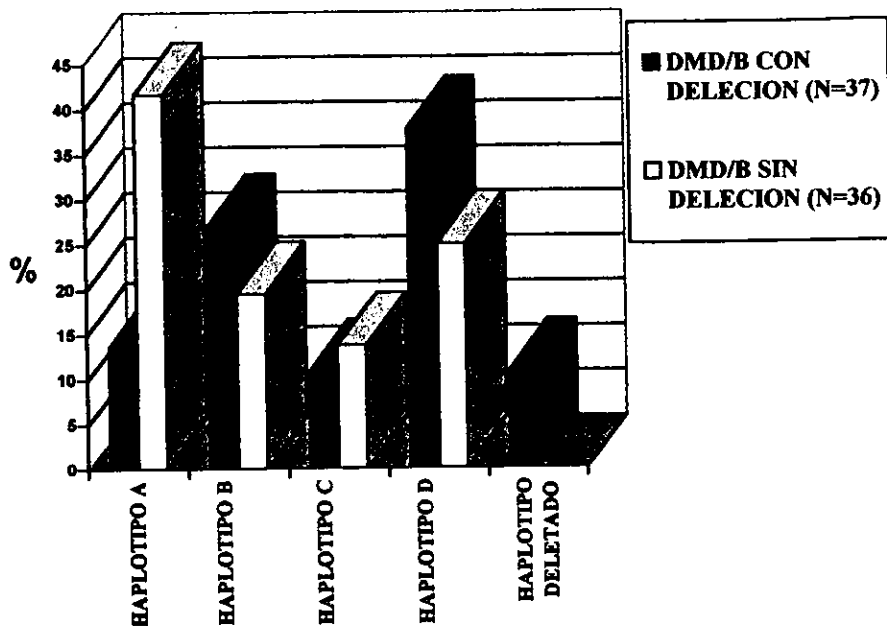
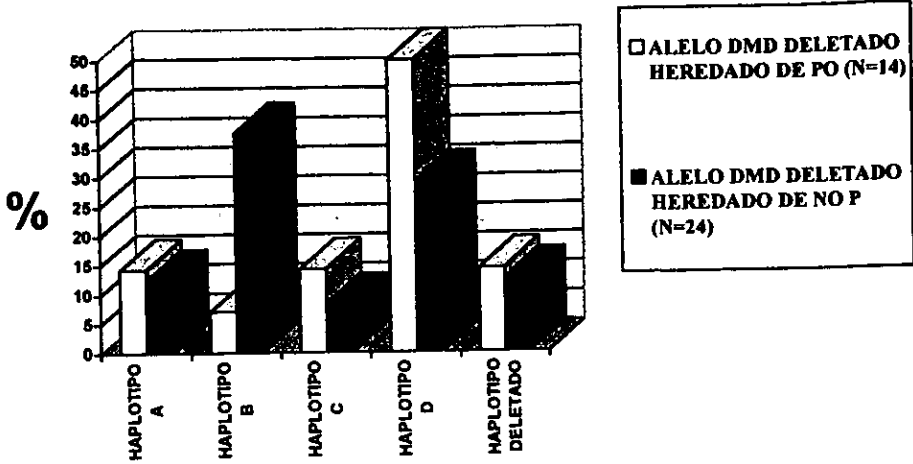


Figura 20. Gráfica que muestra la presencia de los 5 haplotipos con la ausencia o presencia de deleción en pacientes DMD/B. Contrasta la presencia del haplotipo A en el 41.7% (n=15/36) de los pacientes con mutación tipo no deleción, con respecto al 13.6% (n=5/37) de este haplotipo en casos índice con deleción. Para el resto de los haplotipos no existen diferencias significativas. Los haplotipos deletados no se presentaron en pacientes sin deleción caracterizada.

A)



B)

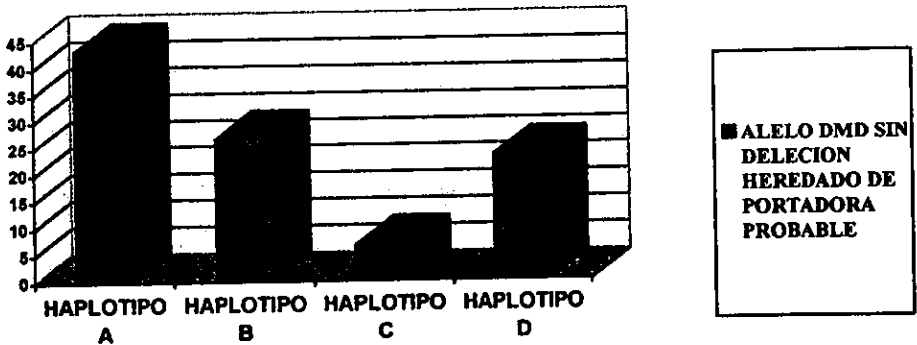


Figura 21. Asociación de haplotipos con mutaciones y procedencia de alelos DMD. A) Destaca la predominancia de los haplotipos B (37.5%, n=9) y D (29.2%, n=7) en casos índice con deleciones heredadas de no portadoras. Asimismo el haplotipo D fue el más frecuente (50%, n=7) en deleciones heredadas de madres portadoras. Los demás haplotipos no tienen distribución característica. B) Alelos DMD de casos índice procedentes de 30 madres portadoras probables, demostraron predominancia del haplotipo A (43.3%), en estrecha concordancia con lo observado en los casos índice sin deleción.

donde no se pudo asignar o excluir el estado de portadora por nuestras estrategias (portadoras probables). Se encontró que el haplotipo B (37.5%), junto con el D (29.2%) estuvieron presentes en más del 60% de los pacientes con delección originada como evento *de novo* en línea germinal materna. En este mismo grupo de alelos, los haplotipos deletados (12.5%) superaron al haplotipo C (8.3%). En el grupo de delecciones heredadas de portadora, el 50% de los haplotipos estuvo conformado por el D. En el grupo de alelos heredados de portadoras probables, sin mutación caracterizada (no delección detectada al menos por M-PCR), el haplotipo predominante fue el A (43.3%), en franca correspondencia con los haplotipos encontrados en los 36 casos índice con delección (ver figura 20).

El estudio de haplotipos nos permitió observar 4 eventos de recombinación intragénica de la región pERT87 (región 5'), en un total de 133 meiosis (73 casos índice, 45 hermanas y 15 hermanos) obteniéndose así una frecuencia de recombinación del 0.03%. No se documentó en nuestro estudio discrepancias entre los hallazgos de MQ-PCR y RFLPs atribuibles a fenómenos de recombinación. Tres de estos eventos se esquematizan en la figura 22. Ninguna de estas 4 familias tenía historia familiar de DMD/B, ni tampoco en el caso índice se documentó delección. En dos familias, no se lograron definir los haplotipos en las madres (informativas para ambos marcadores) a causa del evento recombinacional.

Finalmente se encontró que los RFLPs por sí solos aplicados como un método para detección de portadoras en familias con o sin antecedentes familiares, sin delección detectable y con existencia de hermanas, fue útil sólo en 5 (6.7%) de las 75 familias que conformaron el estudio: 2 por exclusión de alelo de riesgo en hermanas (caso único), 1 por exclusión de alelo mutado en la hermana (caso familiar), 1 por la identificación de un caso ocurrido como mutación *de novo* y la última por asignación y exclusión de alelo mutado en 5 hermanas (ver asesoramiento genético).

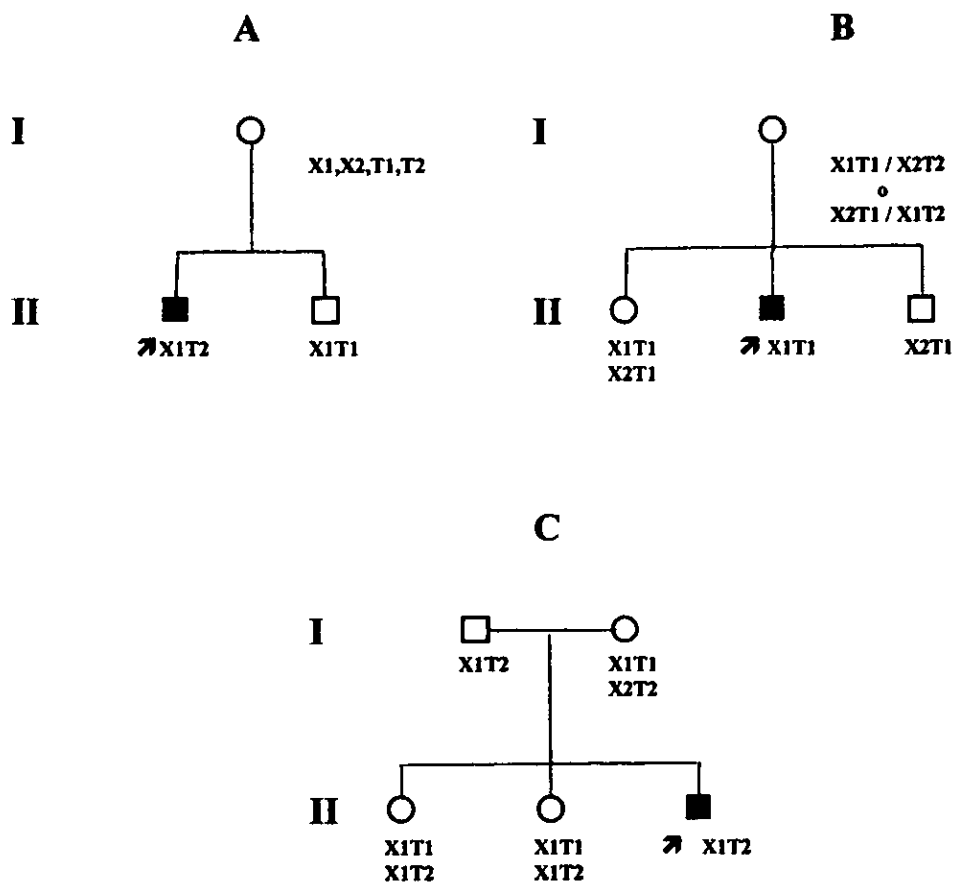


Figura 22. Tres de los cuatro eventos de recombinación en las 75 familias estudiadas por haplotipos. En A) no se tiene ninguna orientación para sugerir un haplotipo en la madre heterocigota para ambos polimorfismos (haplotipo indeterminado); en B) se muestran las dos principales posibilidades de la organización de haplotipos de la madre. Contar con la muestra del padre ayudaría a tal propósito; nótese que en la descendencia existen dos haplotipos A ( $X1T1$ ) y dos C ( $X2T1$ ). C) el evento recombinacional ocurrió en el caso índice (haplotipo B inexistente en los haplotipos maternos), ya que sus dos hermanas (haplotipos A/B) heredaron el haplotipo B del padre y el A de la madre (haplotipos A/D). En las tres familias no existe historia familiar de DMD, ni delección en el caso índice; la recombinación afecta la asignación/exclusión del alelo (haplotipo) de riesgo en las hermanas, especialmente en la familia B).

## II. c. Evaluación de dosis génica por PCR múltiple cuantitativo (MQ-PCR) en familias con casos índice afectados por delección.

Dado que la identificación de las portadoras por RFLPs fue muy baja, se buscaron directamente las delecciones mediante MQ-PCR y densitometría en las madres y las hermanas de los casos índice que presentaron delección (38 familias). Nueve de estas familias con delección, tenían AHF positivos para la enfermedad y en 8 de éstas, las madres fueron informativas para al menos un polimorfismo. Previo al análisis de dosis génica, los RFLPs fueron útiles únicamente en 4 familias para asignar o excluir el estado portador en las hijas (10.5%). Cabe mencionar que la familia comentada en la figura 17 (caso familiar), el análisis de RFLPs permitió la identificación de una delección en hermanas (sin contar con el paciente) a su vez hijas de una mujer aparentemente homocigota (ver más adelante estudio por MQ-PCR). En las cuatro restantes el estudio no trascendió debido a la estructura familiar (ausencia de hermanas o del padre).

El primer paso fue buscar las delecciones en las madres portadoras obligadas y en todos los casos se encontró la mutación ( $n=9$ ). Asimismo en todos estos casos familiares, hubo correlación con los datos del análisis de ligamiento (Fig. 23). Posteriormente se incluyeron en este análisis a las 29 madres portadoras probables de delección (familias sin antecedentes con caso índice afectado de delección). Esto condujo a la identificación de 5 nuevas portadoras (17.2%), por lo que en estas familias se realizó obligatoriamente el mismo análisis en las hermanas ( $n=3$ ). En dos de ellas, se corroboró su estado de portadora por RFLPs y MQ-PCR y sólo una de ellas resultó no ser portadora por MQ-PCR, en ella el estudio por RFLPs no fue de utilidad. En forma inversa, en una familia extensa con caso único donde la madre resultó no ser portadora, el análisis de RFLPs también fue concordante (hijos varones sanos con el mismo alelo) (Fig. 24). Con ello el MQ-PCR condujo al diagnóstico de certeza en el 100% de las mujeres portadoras probables de las 29 familias, descartando el estado de madre portadora en 24 familias y al mismo tiempo indicando

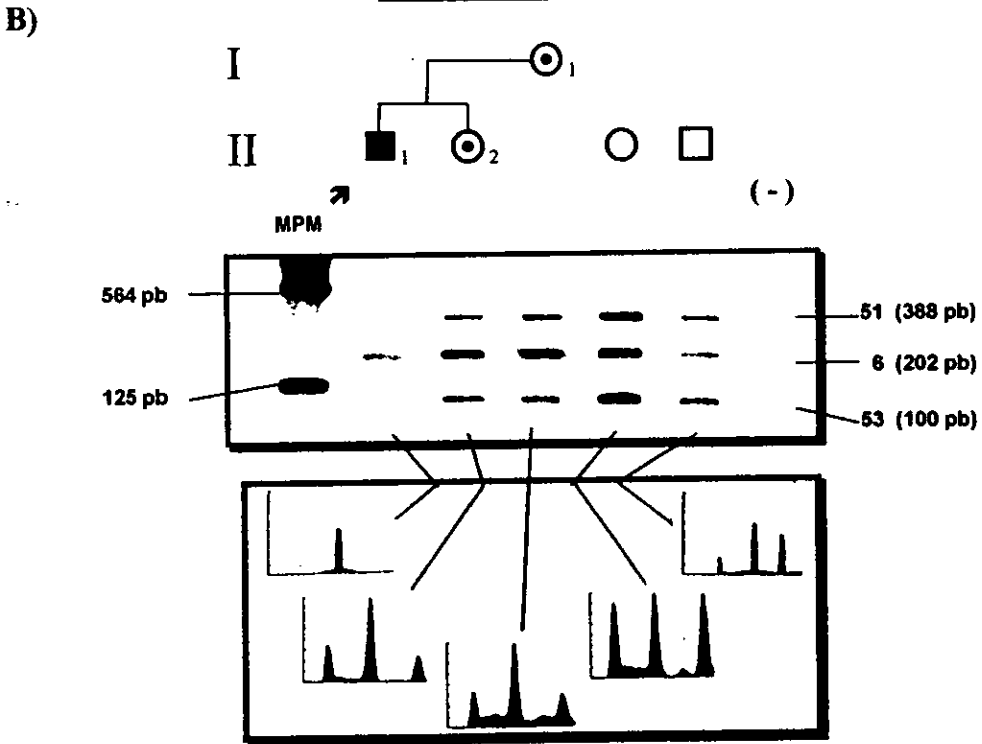
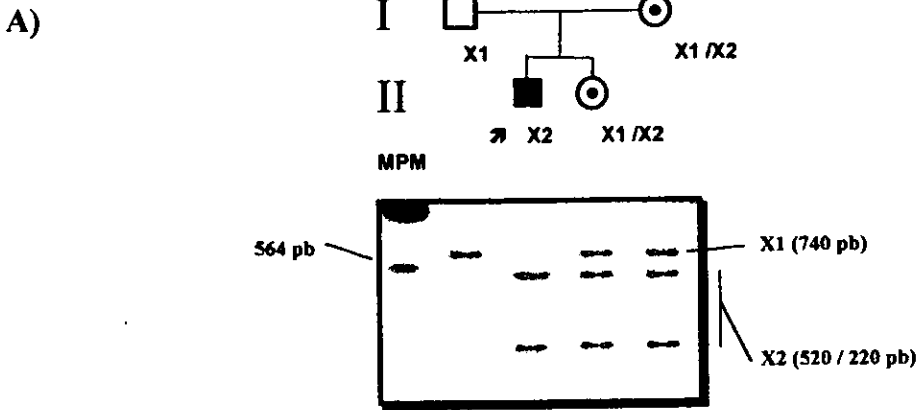


Figura 23. Correlación entre resultados por RFLPs y MQ-PCR. A) muestra el patrón de restricción *XmnI* en familia con portadora obligada de delección del exón 51-54. La madre es informativa y la hija ha heredado el alelo deletado presente también en el caso índice (X2). B) La evaluación de la dosis génica en madre (I-1) y hermana (II-2) para los exones 51 y 53, con respecto al exón 6 y a los controles femenino y masculino, muestran disminución al 50% de la dosis para los exones deletados en el paciente (II-1).

A)

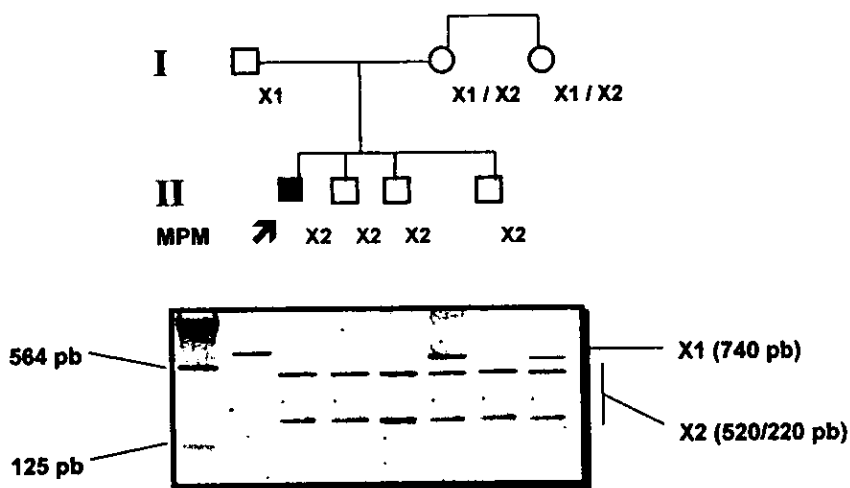


Figura 24. Correlación entre resultados por RFLPs y MQ-PCR. A) muestra la segregación de los polimorfismos XmnI en familia con caso no familiar. Nótese que los dos hermanos varones sanos, al igual que el primo del caso índice heredaron el mismo alelo (X2), lo cual concuerda con una mutación *de novo*. La mutación del caso índice consistía en delección de exones 45-51.



B)

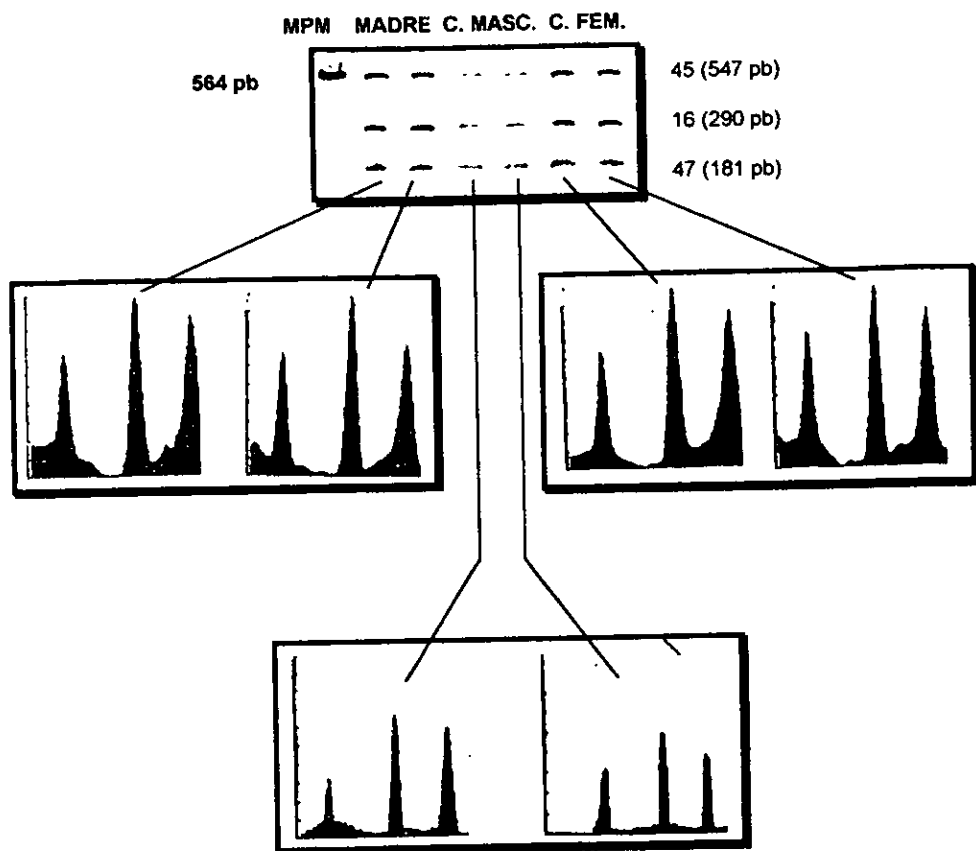


Figura 24 B). El análisis de la dosis génica de la madre indicó doble dosis normal para dos de los segmentos ausentes en su hijo (exones 45 y 47), lo cual confirmó su estado de no portadora.

que de 38 deleciones detectadas por M-PCR, 24 (63.2%) correspondían a eventos mutacionales *de novo* originados muy probablemente en línea germinal materna (deleción presente únicamente en el caso índice) y 14 (36.8%) habían sido heredadas de madre portadora (Fig. 25). Ejemplos de la evaluación de dosis génica por MQ-PCR y densitometría entre portadoras y no portadoras, se muestran en la figura 26.

Para evaluar la eficiencia diagnóstica de cada una de las técnicas, el número de familias donde la evaluación de dosis génica y RFLPs fueron complementarios, se agruparon en forma separada de las familias donde el MQ-PCR fue la única herramienta metodológica para asignar o excluir el estado de portadora de la madre.

En la única familia que estudiamos sin tener al paciente (fenotipo DMB) por fallecimiento, existen cuatro hermanas en etapa reproductiva y debido a que existían antecedentes de la enfermedad (tío por rama materna y un hermano afectado ya fallecidos), eran portadoras probables. Dado que no se tenía muestra del varón afectado, pero se contaba con un hermano sano, se consideró como primera opción realizar el análisis de ligamiento con el propósito de identificar el alelo no mutado presente en el hermano sano. El caso índice, que en este caso es una hermana del varón fallecido a causa de DMB, tenía un hijo varón sano. El análisis de X no fue concluyente ya que la madre fue homocigota para X2, pero el análisis de T sugirió pérdida de polimorfismos por deleción (ver figura 17). Posteriormente se evaluó la dosis génica para exones cercanos a estos sitios (exones 12 y 17) utilizando como control un exón no deletado de la región central (exón 50). Los resultados de la madre y dos hermanas, con aparente homocigocidad para un polimorfismo inexistente en la madre, indicaron reducción de dosis en los exones 12 y 17, conservando la relación de doble dosis para el exón 50 con respecto al control femenino y masculino (fig. 27). Por lo tanto, a esta familia la catalogamos como caso familiar de DMB debido a deleción parcial intragénica de la región 5' que involucra al menos la región comprendida entre los exones 12 a 17. El único hijo varón sano de una de las hermanas

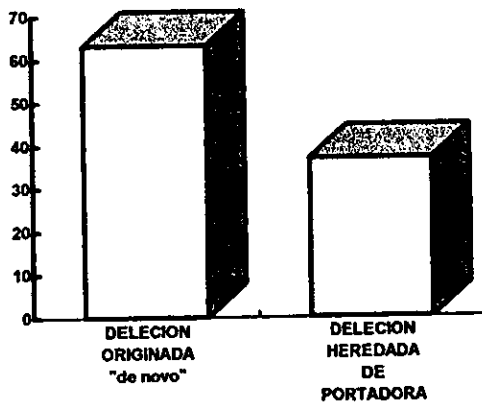


Figura 25. Gráfica que muestra el comportamiento de heredabilidad de las deleciones encontradas en 38 de las 75 familias estudiadas. Nótese que el menor número (n=14, 36.8%) correspondió a deleciones heredadas de portadoras obligadas (n=9) o detectadas por MQ-PCR (n=5). Dos terceras partes (n=24, 63.2%) correspondieron a deleciones originadas *de novo* en línea germinal materna.

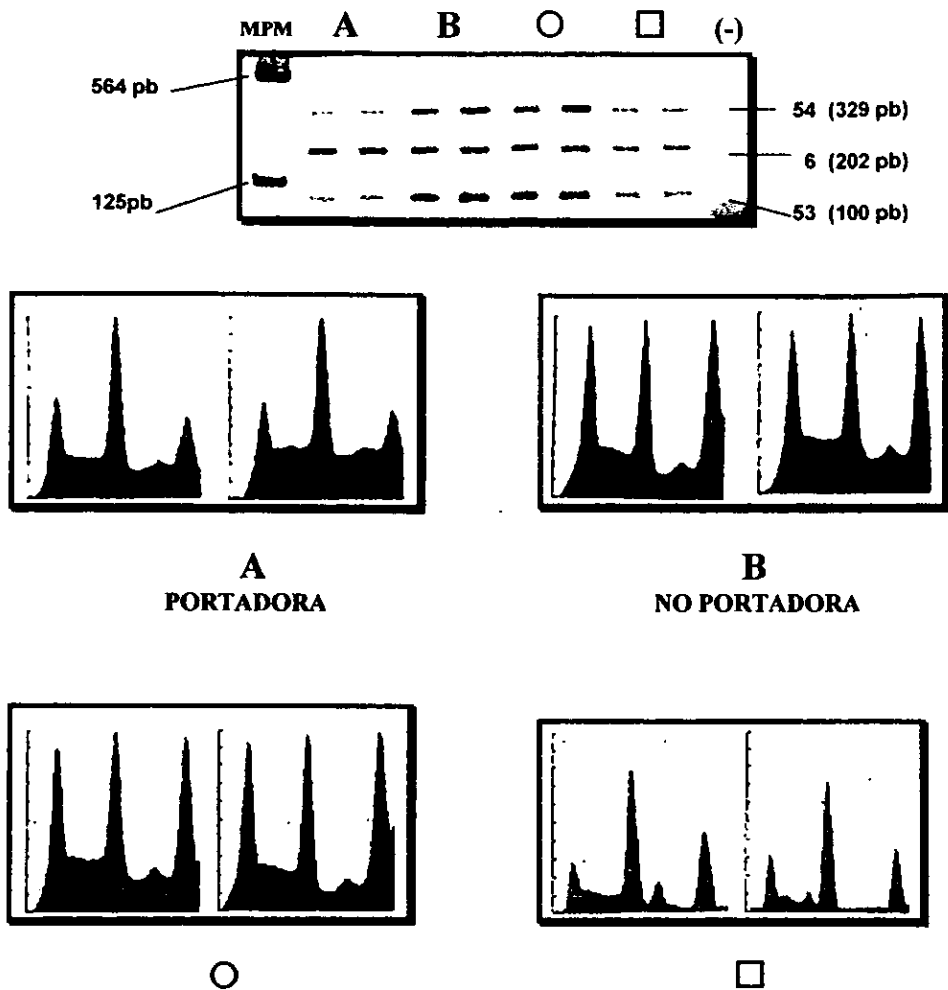


Figura 26. Detección de portadoras en familias con caso único por MQ-PCR y análisis densitométrico. Arriba se muestran los productos de amplificado para evaluar la dosis génica de dos madres cuyos respectivos hijos muestran una delección que involucra a los exones 53 y 54. El exón 6 funge como control interno de la reacción (doble dosis en ambas madres, con respecto a los controles masculino y femenino). Las muestras se corren por duplicado y se observa en los carriles correspondientes a "A" una disminución del 50% de la dosis para los exones problema, según la densitometría del negativo fotográfico y contrasta con el hallazgo de la otra madre que muestra su doble dosis génica normal; lo anterior indica que A es portadora y B no lo es, a pesar de no contar con antecedentes de la enfermedad. Compárense con las lecturas densitométricas obtenidas en controles femenino y masculino sanos.

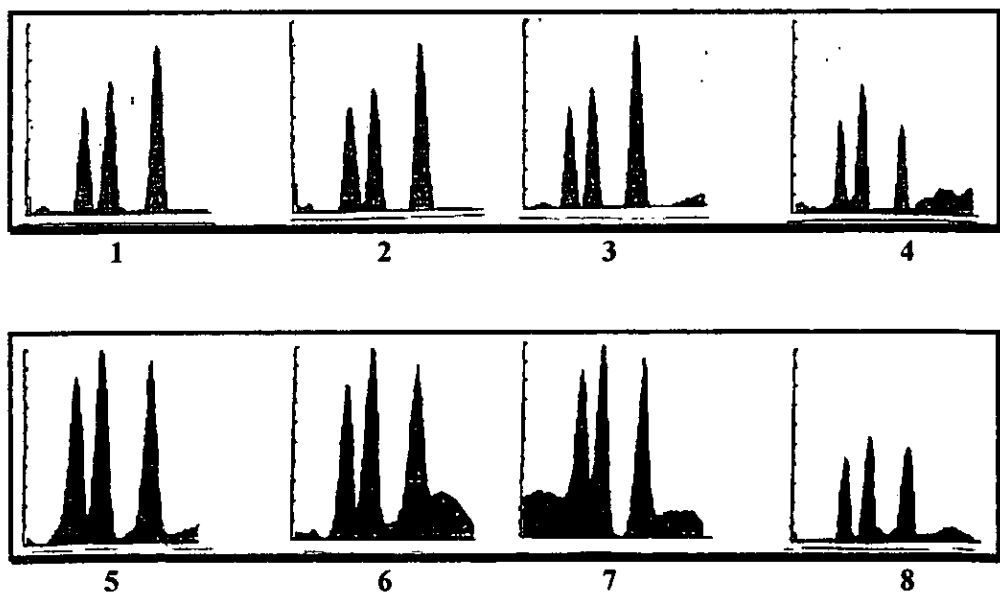
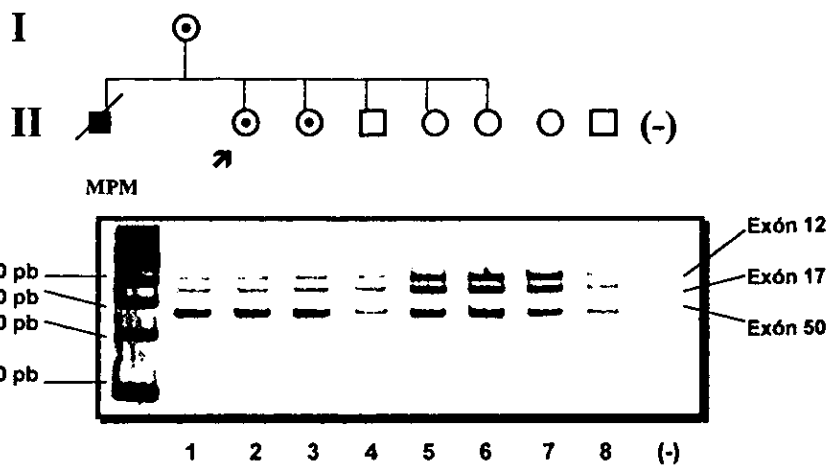


Figura 27. Evaluación de dosis génica en exones 12 y 17 en familia DMB con pérdida de polimorfismo TaqI en dos hijas de portadora obligada. Esta es la única familia que ingresó a nuestro estudio sin caso afectado por fallecimiento. Arriba se muestran los hallazgos de MQ-PCR en negativo para análisis en densitómetro. Abajo los patrones de lectura que evidencian 50% de dosis génica para los exones 12 y 17 de las hijas y madre portadoras. Las hermanas heterocigotas para TaqI mostraron doble dosis génica lo cual confirma su estado de no portadoras. El hermano sano presenta su dosis hemizigota normal.

portadoras, heredó el alelo no deletado marcado como T1 (proveniente del abuelo materno), explicando así la ausencia de síntomas. Actualmente se sabe que esta delección abarca hasta el exón 19.

### **III. Asesoramiento genético.**

#### **III. a. Antecedentes heredofamiliares.**

Para el abordaje inicial de las familias fue indispensable contar con una historia familiar y clínica detallada para confirmar los patrones de herencia y si el cuadro presente en el caso índice era compatible con DMD/DMB. Sin embargo en nuestro estudio únicamente en 14 familias sabíamos por antecedentes familiares, que la madre era portadora, existiendo hermanas que desconocían su condición. Mediante el empleo de RFLPs y de MQ-PCR, se logró brindar asesoramiento genético a 11 de estas 14 familias. En las tres restantes aunque sabemos que la madre es portadora obligada, en ninguna se detectó delección en el caso índice; aún más, 2 de estas familias es no informativa para ambos polimorfismos y existe una hermana cuya condición aún se desconoce (portadora probable). En la tercera, aunque la madre es informativa y portadora obligada, no existen hermanas. En conclusión, de estas tres familias donde no se llegó a ninguna conclusión con RFLPs y MQ-PCR, los antecedentes empleados en forma individual nos permitieron informar sobre el riesgo de recurrencia del padecimiento en la descendencia. Este beneficio no se incluye en la evaluación de la eficiencia diagnóstica del laboratorio.

#### **III. b. Análisis de ligamiento (RFLPs).**

Utilizando como única estrategia a los RFLPs en el asesoramiento, se logró el diagnóstico de portadora en 5 de las 75 familias (6.71%). El diagnóstico fue hecho con base en exclusión de alelo de riesgo en hermanas (mutación no caracterizada) pertenecientes a tres familias (ver figura

18), una asignación y exclusión del alelo mutado en hermanas pertenecientes a caso familiar sin mutación caracterizada (Fig. 28), y el hallazgo de una mutación tipo no delección generada como evento *de novo*. Las 5 familias no se contabilizan con otras 6 donde el análisis por RFLPs también fue útil (madre informativa y hermanas presentes), pero cuyo riesgo de recombinación se descarta por el análisis directo que se obtiene con MQ-PCR al identificar la delección en el caso índice y mujeres emparentadas. Así el análisis combinado se restringió al 8% de nuestras familias (n=6 de 75). La familia DMB que se incluyó sin sujeto afectado está contabilizada como beneficio al conjuntar ambas técnicas, a pesar que la madre no mostró ser informativa para ningún polimorfismo (por estado de hemicigocidad para delección 5').

### III. c. Evaluación de dosis génica por MQ-PCR y análisis densitométrico.

La aplicación de esta estrategia descartó el estado de portadora probable de 29 madres cuyos casos índices (casos únicos) estaban afectados por delección. Como resultado se obtuvieron 24 mutaciones *de novo* (82.8%) y 5 heredadas de portadora (17.2%). El tipo de asesoramiento, al igual que el basado en el análisis de RFLPs/MQ-PCR se consideró de certeza. Tres familias adicionales (caso índice con delección, madre portadora obligada, no informativa y hermanas) se incluyeron en este rubro por confirmación de portadora por dosis génica durante la estandarización del MQ-PCR. Las 32 familias caracterizadas por MQ-PCR, corresponden al 42.7% de las 75 incluidas. Este fue el porcentaje más alto de utilidad diagnóstica de las estrategias realizadas, incluso en relación a la combinación MQ-PCR/RFLPs. El siguiente cuadro muestra las eficiencias por separado y en conjunto de los RFLPs y el MQ-PCR obtenidos para asesoramiento genético en nuestras familias.

	<b>MQ-PCR</b>	<b>RFLPs</b>	<b>RFLPs/MQ-PCR</b>	
<b>FAMILIAS ESTUDIADAS</b>	<b>75</b>	<b>75</b>	<b>75</b>	
<b>FAMILIAS BENEFICIADAS</b>	<b>32</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>TOTAL</b>
	<b>42.7%</b>	<b>6.7%</b>	<b>8%</b>	<b>57.4%</b>



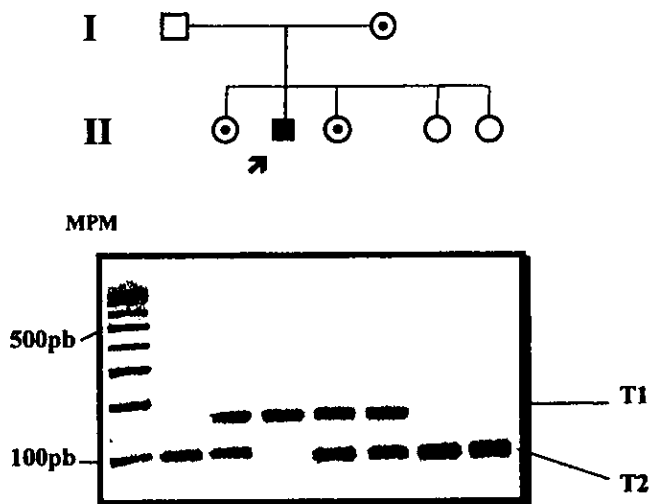


Figura 28. Asignación y exclusión del estado de portadora en hermanas de un caso índice con mutación no caracterizada. Se trata de un caso familiar por lo que la madre es portadora obligada informativa para TaqI. El alelo mutado es T1 y fue heredado a dos de las hermanas (heterocigotas) lo cual las hace también portadoras. Las hermanas homocigotas para T2 han heredado el alelo sano de la madre y el T2 sano del padre (no portadoras). La asignación o exclusión de portadoras como en este caso, debe tomar en cuenta la posibilidad del fenómeno de recombinación intragénica.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## DISCUSIÓN

La aplicación de la biología molecular al estudio de las enfermedades hereditarias vino a mejorar los métodos de diagnóstico no sólo en este tipo de padecimientos sino en muchos otros donde el defecto es invalidante o letal (1,6,12). Uno de los avances más importantes en las DMD/DMB es la posibilidad de identificar las alteraciones moleculares en pacientes y portadoras (7,11-13,73,75,123) lo que permite proporcionar un adecuado asesoramiento genético (1-2,110), con la posibilidad de diagnóstico prenatal (13,93) e incluso de diagnóstico a nivel de preimplantación de blastómeros(124).

Las DMD/DMB son enfermedades degenerativas progresivas que principalmente en el tipo Duchenne, conducen a la muerte antes de los 20 años (1,4,125). En el momento actual no existe un tratamiento definitivo (1,16,125), por lo que a nivel mundial los principales esfuerzos están encaminados a la prevención (diagnóstico de portadoras, así como diagnóstico prenatal y preimplantación) (1-2,110,125). Los ensayos de terapia han tenido cierto éxito en modelos de ratones transgénicos (126) o utilizando vectores *in vivo* en el mismo modelo animal (127), sin embargo aún existe una enorme brecha para su aplicación en humanos (1,16).

En México no se tienen datos de frecuencia para estas enfermedades, sin embargo la literatura reporta que no existen diferencias significativas en cuanto a etnias (74). En el país existen al menos 5 grupos dedicados al estudio molecular de las DMD/DMB, incluyendo el nuestro, que en forma paralela a actividades de investigación realizan diagnóstico molecular con fines de consejo genético. En la actualidad, todos estos grupos de investigación realizan la detección de deleciones en casos índice por M-PCR, mientras que la detección de portadoras se realiza con base en el análisis de ligamiento (diagnóstico de portadoras de tipo indirecto). Sin embargo, en la casi totalidad de los centros de atención médica de 2do. y 3er. nivel, el diagnóstico de portadoras continúa realizándose utilizando la historia familiar y a

determinaciones de CPK (122). Esta última presenta un alto grado de variabilidad entre portadoras y no existen valores patognomónicos con lo que se determine con exactitud a las portadoras (32,34).

En el servicio de Genética Médica del Instituto Nacional de Pediatría, se captan mensualmente alrededor de 6 familias con DMD/DMB. La mayoría de las familias captadas presentan sólo un individuo afectado o caso único, y el asesoramiento genético en ellas no es de certeza sino de probabilidad basado en el árbol genealógico y el análisis bayesiano. Existe entonces una problemática que en ciertos países ha sido superada gracias al empleo de técnicas de DNA recombinante, logrando definir el estado de portadora en aproximadamente el 60%.

Nuestro laboratorio a la fecha ha captado 101 familias, sin embargo alrededor del 25% de estas no tienen estructura familiar adecuada para iniciar el estudio, ya que requerimos al menos madre y caso índice como requisito indispensable para ser incluida en este proyecto; sin embargo se cuenta con un banco de DNA de las 101 familias, para futuros estudios. Con ello el número se restringió a 75 familias. Sólo una de estas familias se consideró que podría ser incluida en el estudio sin caso afectado por detectar una deleción en mujeres por RFLPs. El hecho de que sólo 14 de 75 familias tenían antecedentes familiares positivos, ponía de manifiesto la necesidad de aplicar estrategias de biología molecular. El alto número de familias con caso único al menos en este estudio, es superior a otras series previamente reportadas (125,128-131) (50-60%), lo que sugiere un alto número de mutaciones generadas como evento *de novo*.

Para cumplir con el objetivo principal del estudio, se analizaron las muestras de DNA por M-PCR, que detecta hasta el 98% de las deleciones (77,123) responsables del padecimiento evidenciadas en otros estudios por Southern blot, sin embargo sigue siendo una técnica muy laboriosa y requiere de mayor tiempo (123). Con la amplificación de 19 exones mediante M-PCR se logró caracterizar a las mutaciones de grandes rearrreglos tipo deleción, responsables del

cuadro en el caso índice en el 50.6% de las 75 familias y la localización de éstas correspondió en su mayoría al punto caliente central (76.3%), lo que no difiere de lo reportado para otras poblaciones (74,125,128-131).

Es bien sabido que no hay correlación clara entre el genotipo-fenotipo (19). El presente estudio intentó realizar esta correlación utilizando como criterio la hipótesis de Mónaco, sin embargo el 50% las deleciones encontradas con PCR múltiple con fenotipo Becker, tuvieron efecto de corrimiento en el marco de lectura. También esas mismas deleciones se encontraron en fenotipos Duchenne, lo anterior podría explicarse porque la correlación genotipo-fenotipo obedece a la hipótesis de Mónaco en alrededor de un 93% (70), datos con los que no contamos en el presente trabajo y para lo cual se requeriría realizar el estudio de Southern blot (19,125), para evidenciar la integridad de los fragmentos que contienen a las secuencias exónicas o indagar el efecto de los fragmentos de reunión. Por ejemplo, el hecho de tener un exón íntegro pero carecer del sitio donde se forma la estructura de asa ("branch-point") del intrón precedente ocasiona pérdida del exón en el transcrito maduro, dado que se elimina por "splicing" (125). Una desventaja del estudio de M-PCR en este aspecto, es dar por hecho que un exón deletado tiene al exón que le antecede íntegro, tal es el caso de las deleciones del exón 45, en donde damos por hecho la integridad del exón 44, región que no estudiamos, pero que se incluye en otros diseños de M-PCR (77,96,98,123). Otras explicaciones propuestas para esta no correlación son el efecto del "splicing" alternativo (realizado en forma normal en el gen DMD), sobre un transcrito proveniente de un gen deletado y creación de sitios alternos de inicio de la traducción (125). El análisis de los sitios de empalme por RT-PCR, secuenciación e inmunoblot, deberán ser metodologías aplicables en un futuro para realizar la correlación genotipo-fenotipo (65,66); la misma técnica de RT-PCR en forma adicional permitiría la detección de duplicaciones (108), un tipo de mutación no analizada en el presente estudio pero que es responsable de la enfermedad en un 6-8% de los casos (1,75,86).

En los 37 pacientes en donde no fueron caracterizadas las mutaciones, es probable que las deleciones se encuentren en regiones que no se analizaron, o bien que sean duplicaciones parciales o mutaciones puntuales (76,125). La detección de estas mutaciones podría realizarse mediante el análisis de conformación de cadena sencilla de DNA, análisis de heterodúplex o ensayo de terminación de traducción de proteínas, etc., sin embargo es una labor exhaustiva, ya que se tienen que analizar 14,000 pb si consideramos únicamente a la secuencia codificante (132,133). El reporte de pacientes con mutaciones que alteran el "splicing" o la regulación de la expresión génica hace aún más difícil este propósito (1,132). La estandarización en nuestro laboratorio del MQ-PCR pudiese utilizarse como una herramienta metodológica para detectar duplicaciones en un futuro (100).

La clonación del gen DMD ha permitido la identificación de secuencias polimórficas que han facilitado la detección de portadoras a través del análisis de segregación, estudio especialmente útil cuando no se caracteriza la mutación responsable (2,115,116). Con el propósito de conocer la frecuencia de recombinación, la utilidad de los RFLPs en el asesoramiento genético, la asociación de un determinado haplotipo con alelo DMD/DMB y la frecuencia de los polimorfismos, en el presente trabajo se analizaron dos regiones correspondientes a la región 5' pERT87: pERT87.8/TaqI y pERT87.15/Xmnl (intrón 12 y 17 respectivamente).

Los dos polimorfismos presentaron una frecuencia similar entre los alelos provenientes de sujetos no emparentados (madres y padres), a excepción de T2 que estuvo presente en alrededor del 60% de los alelos. Esta muestra no presentó familias con consanguinidad, aunque 6 familias provenían de poblaciones con menos de 100,000 habitantes, lo cual pudiese hablar de endogamia. La población de estudio se considera representativa de nuestra población y como se observa en la tabla 8 existen diferencias significativas en cuanto a distribución entre los diferentes grupos étnicos.

La población que se semeja a la muestra incluida en este estudio es la hindú en cuanto a TaqI. Las otras poblaciones asiáticas no guardan semejanzas con nosotros en este polimorfismo, ya que sus distribuciones están invertidas en frecuencia (T1 más frecuente). La población caucásica y africana guarda una proporción mayor de T2. La población japonesa muestra una distribución similar en XmnI, con respecto a nosotros. En el resto las distribuciones para X no fueron similares. El análisis de frecuencias de ambos RFLPs, es el primero documentado para una muestra de población mexicana. El análisis de haplotipos en madres únicamente reveló que los alelos con T2 y X2 (haplotipo D) fue el más frecuente (32.7% de los alelos estudiados), encontrando al mismo tiempo que el menos frecuente fue el haplotipo C (X2/T1). El análisis de haplotipos utilizando estos 2 marcadores de la región 5', fue útil especialmente en el análisis de segregación de alelos para evidenciar recombinación, evento que no se logra observar con el análisis de los polimorfismos en forma aislada. También mediante este análisis era de esperarse una frecuencia baja de recombinación intragénica 5', ya que se ha documentado que en esta región del gen y las regiones aledañas de DNA ubicadas en dirección centromérica se caracterizan por 1cM en el mapa genético por 1 Mb del mapa físico; y en efecto correlaciona con el 0.3% de eventos de recombinación encontrados en esta zona. Estos datos limitaron el asesoramiento genético certero a 4 familias. Ninguna de las familias presentó recombinación documentada por el análisis combinado de RFLPs y MQ-PCR (delección que segregara con un marcador de alelo sano o viceversa).

Nuestro estudio por haplotipos con respecto a alelos DMD/DMB mostró únicamente asociación significativa del haplotipo A, con alelos sin delección (41.7%); en tanto que la distribución de alelos deletados fue esencialmente la misma que para la distribución de los haplotipos de la población de madres y padres. En este tipo de padecimientos genéticos debidos a un alto número de mutaciones ocurridas a nivel germinal, se espera no encontrar diferencias significativas en la frecuencia de haplotipos entre la población general y la población afectada, puesto que todos los alelos tienen la misma probabilidad de ser afectados y con ello se disminuye

la probabilidad de ligamiento entre marcador y mutación (1). Sin embargo nuestros resultados parecen indicar que al menos para las mutaciones de tipo no delección esto no pudiese ser así.

Uno de los puntos clave en nuestro estudio fue el de evaluar la eficiencia de los RFLPs como estrategia molecular de tipo indirecto en el asesoramiento genético. Consideramos para la aplicación de estos las siguientes observaciones: 1) que la madre fuera informativa para uno o ambos polimorfismos, 2) la posibilidad de excluir el alelo en riesgo en hijas y otras mujeres emparentadas en familias con caso esporádico, 3) la posibilidad de asignación o exclusión del alelo mutado en las hermanas y otras mujeres emparentadas en familias con madre POI, 4) Un 5-10% de error en la asignación o exclusión de portadoras, especialmente si no se analizan polimorfismos de otras regiones (falsos positivos o falsos negativos) debido a la alta frecuencia de recombinación intragénica.

Encontramos un número similar de madres informativas para al menos un polimorfismo (76%), con respecto al reportado en otras series (98,131,134), lo cual en teoría no indicaba la necesidad urgente de analizar un mayor número de polimorfismos, excepto en aquellas no informativas. Esta cifra se consideró buena para iniciar el análisis de ligamiento. Sin embargo debido a la estructura familiar (alto número de familias con caso único, carencia de la muestra del padre, no hermanas, no hermanos sanos o enfermos) y a los 4 eventos de recombinación, la utilidad individual de estos fue de apenas 6.7% (5 familias), sin embargo fue útil en combinación con MQ-PCR en 6 familias más (8%). Cabe mencionar que de las 14 familias con antecedentes, sólo en 2 la madre fue no informativa para ninguno de los 2 polimorfismos, por lo que en ellas sería conveniente la estandarización de otros polimorfismos como VNTRs, STRs u otros RFLPs. En las familias con caso único sin delección existe un buen número de madres informativas que potencialmente a futuro pueden beneficiarse con los datos obtenidos por RFLPs (confirmación de mutación *de novo* o diagnóstico prenatal). La búsqueda de otros marcadores polimórficos en familias con caso único y no hermanos, quizá no ayude de manera importante, ya que en la

mayoría de estas familias el objetivo primordial es saber si la madre es o no portadora, por lo que se requiere en ellos la realización de otras metodologías. En las 5 familias donde el análisis de RFLPs fue concluyente por sí solo, hay que considerar el riesgo de recombinación en región central y 3' del gen (2). Esta desventaja se explicó en forma detallada a las familias que tuvieron a los RFLPs como único recurso.

La naturaleza de las mutaciones en el gen DMD de sujetos afectados, permitió implementar métodos directos de diagnóstico de portadoras, ya que del 50-70% de las deleciones se localizan en dos regiones perfectamente definidas en el gen DMD (85). En nuestro estudio las siguientes razones avalaron el uso de la evaluación de dosis génica por MQ-PCR: 1) el comportamiento de estas mutaciones fue el mismo que a nivel mundial, 2) 29 de las familias con deleción, acudían con caso único y la madre se encuentra en etapa reproductiva, 3) existencia de hermanas en casos familiares asociados a deleción y con resultados por RFLPs, pero en donde idealmente se debía corroborar en forma directa la ausencia o presencia del alelo deletado y así superar el error por recombinación, 4) la baja eficiencia global de los RFLPs.

La evaluación de dosis génica mediante MQ-PCR es una metodología ampliamente utilizada para indagar en forma directa el estado portador de mujeres emparentadas a casos índice con deleción o duplicación en el gen DMD (97,100,102-107). En la actualidad se han logrado utilizar metodologías fluorescentes sumamente sensibles pero también muy costosas (102,107). La estandarización en nuestro laboratorio de una versión diseñada para evaluar rápida y eficazmente dosis génica utilizando bromuro de etidio y análisis densitométrico en negativo fotográfico (85,100,136), nos permitió incrementar notablemente el número de familias a las que se les pudo brindar consejo genético de certeza. La técnica por sí sola permitió el esclarecimiento del estado portador/no portador de las madres en el 100% de las familias (n=39) con deleción caracterizada. Sorprende el alto número de mutaciones *de novo* en las familias que acudieron como casos únicos (82.8%, 24/29); en el resto (n=5), el caso índice y único había heredado el



alelo mutado de una madre portadora. Considerando que existían 9 casos familiares DMD/DMB asociados a delección más los 5 casos únicos que resultaron ser heredados de portadoras, resulta que sólo el 36.8% de las delecciones se heredaron de una madre portadora y las otras dos terceras partes fueron mutación *de novo* ocurrida, probablemente de acuerdo a la literatura, durante la maduración de línea germinal materna. Esto se contrapone a la cifra clásicamente manejada de que una tercera parte de las mutaciones se deben a mutaciones *de novo* (1), probablemente esta discrepancia se deba a que estos datos son el resultado de análisis de árboles genealógicos y no cuentan con el diagnóstico molecular (1,5) y por lo tanto no se refiere a una mutación en particular. La biología molecular, contando el presente trabajo, ha redefinido frecuencia, distribución e incidencia del padecimiento (20,21,82-85,113,125,128,136) y específicamente un estudio reciente en población hindú mostró el mismo comportamiento de herencia en este tipo de mutaciones con respecto al presente estudio (85). Un estudio en población brasileña (84) ha puesto de manifiesto que se puede esperar en la familia un segundo caso afectado con probabilidades del 4% en hermanos de casos índices con delección en región central, lo cual habla a favor de que la mayoría de éstas se deben a eventos *de novo*. El 50% de delecciones centrales *de novo* concuerda con el índice de recombinación meiótica que ocurre en el intrón 44, índice que es 12 veces mayor con respecto al genoma en general, es decir que el índice de recombinación presente entre los exones 44 y 45 alcanza los 14cM/Mb, cuando el índice de recombinación promedio para el cromosoma X es de 1.2cM/Mb (125). Con base en lo anterior concluimos que las mutaciones *de novo* tipo delecciones se encontraron presentes en 2/3 partes de nuestra población lo cual va de acuerdo con otras poblaciones (84,85) y al elevado índice de rearrreglos por recombinación homóloga en los dos puntos calientes durante la maduración de la línea germinal materna.

Se menciona que la eficiencia de la MQ-PCR no alcanza el 100% debido a la probabilidad aunque remota, de mosaicismo somático (madre o hijo) o germinal (madre) reportados en la literatura como causas de dificultad diagnóstica en DMD/DMB. Passos-Bueno y

cols. (84) mencionan en sus resultados que las deleciones proximales se encuentran hasta en el 80% de los casos asociados a mosaicismo germinal. Con los datos actuales, ninguna de nuestras 6 familias con deleción proximal, ni las 32 restantes con deleción central, hicieron sospechar mosaicismo germinal. De acuerdo a nuestros resultados, la condición de mosaicismo germinal es de las situaciones que el MQ-PCR no detecta. La detección de esta condición se infiere y se busco en forma intencional por el análisis detallado de polimorfismos y árbol genealógico (presencia de alelo mutado y sano con el mismo marcador que aparecen en individuos afectados).

La relevancia de este trabajo estriba en el hecho de que se logró incrementar substancialmente la detección de portadoras. En el 15% de los casos familiares, por estudios clínicos sólo se logró identificar a las madres portadoras obligadas quedando un buen número de portadoras probables con riesgo empírico. En cambio con la combinación de diferentes técnicas moleculares se logró asignar el estado de portadora o no portadora a mujeres en riesgo en el 57.4% de las familias. Estos datos integran una base sólida para emprender otro tipo de análisis en las mismas familias, tales como el diagnóstico prenatal.

Con base en lo anterior hemos contamos con la metodología molecular para seguir una estrategia molecular de las familias con DMD/DMB (Fig. 29).



## CONCLUSIONES

1. El número de familias captadas con caso único es superior a las reportadas para otras poblaciones (>80%).
2. La utilidad de los RFLPs (solos y en combinación con MQ-PCR) para el asesoramiento genético fue limitada debido a la alta frecuencia de casos esporádicos DMD/DMB en nuestras familias.
3. La estrategia de MQ-PCR demostró ser un método rápido, reproducible, de bajo costo y confiable en la asignación de portadoras en el 100% de las familias con DMD/DMB causadas por delección detectable.
4. La frecuencia de deleciones en nuestra muestra fue similar a las reportadas en la literatura.
5. Las deleciones presentes en fenotipos Duchenne y Becker fueron similares en localización y extensión.
6. La alta incidencia de deleciones ocurridas como eventos *de novo*, se contraponen a las cifras clásicamente reportadas, con excepción de lo encontrado en población hindú.
7. El polimorfismo T2 se encontró con una alta frecuencia en alelos provenientes de sujetos no emparentados, similar a lo encontrado para la población hindú.
8. La distribución de los haplotipos en alelos DMD/DMB mostró ser similar a la distribución de los haplotipos en población no emparentada, por lo que no se documentó desequilibrio de ligamiento, situación que obedece a la alta tasa de mutación presente en el gen.
9. La frecuencia de recombinación intragénica 5' observada fue baja (0.03%) y es un factor que debe tenerse en cuenta en el asesoramiento genético. Mediante el empleo de MQ-PCR y RFLPs no se demostraron eventos recombinacionales entre la región 5' y la región central del gen DMD.
10. Con las estrategias empleadas, el mosaïcismo germinal o somático son condiciones que no pueden ser descartadas en las familias como causa de DMD/DMB.
11. El trabajo finca las bases para un nuevo algoritmo diagnóstico en familias DMD/DMB, que mejora las perspectivas para el asesoramiento genético y diagnóstico prenatal.

## **ANEXO 1**



# Instituto Nacional de Pediatría

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION EN GENETICA HUMANA  
LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR



FECHA \_\_\_\_\_

NOMBRE \_\_\_\_\_ EDAD \_\_\_\_\_ M F

LUGAR DE ORIGEN \_\_\_\_\_

DIRECCION \_\_\_\_\_

TELEFONO \_\_\_\_\_

PADRE \_\_\_\_\_ EDAD AL NAC. \_\_\_\_\_ OCUPACION \_\_\_\_\_

MADRE \_\_\_\_\_ EDAD AL NAC. \_\_\_\_\_ OCUPACION \_\_\_\_\_

AHF \_\_\_\_\_

APP \_\_\_\_\_

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

PROBLEMAS DURANTE EL EMBARAZO \_\_\_\_\_

PARTO \_\_\_\_\_ PRESENTACION \_\_\_\_\_ PESO \_\_\_\_\_ TALLA \_\_\_\_\_

ATENDIDO EN \_\_\_\_\_ ANALGESIA \_\_\_\_\_

NEONATAL INMEDIATO \_\_\_\_\_

## ARBOL GENEALOGICO



# Instituto Nacional de Pediatría

D.P.M. \_\_\_\_\_

EDAD DE INICIO \_\_\_\_\_ SINTOMAS PRINCIPALES \_\_\_\_\_

EVOLUCION \_\_\_\_\_

E.F. \_\_\_\_\_

C.P.K. \_\_\_\_\_

E.M.G. \_\_\_\_\_

BIOPSIA MUSCULAR \_\_\_\_\_

E.K.G. \_\_\_\_\_

## RESULTADO POR M-PCR

MUESTRA	PACIENTE	MADRE	HERMANAS	PADRE	OTROS

Normal (N) Alteración (DMD/B)

## BUSQUEDA DE OTRAS MUTACIONES

MUESTRA	PACIENTE	MADRE	HERMANAS	PADRE	OTROS

Normal (N) Alteración (DMD/B)

DIAGNOSTICO \_\_\_\_\_

CANALIZADO POR \_\_\_\_\_

## BIBLIOGRAFIA

1. Scriver CHR, Beaudet AL, Sly WS (editors). The metabolic and molecular basis of inherited disease. In: The X-linked muscular dystrophies. Part 19, Chap. 140. (Vol.III). 7th. Ed. McGraw Hill Inc. 1995.
2. Bushby KM. The muscular dystrophies. *Bailliere's Clin. Neurol.* 1994; 3(2):407-30.
3. Holmgren J, Reyes J, Colombo M, Blanco MA. Duchenne and Becker muscular dystrophy in Chile. *Rev. Med. Chil.* 1992; 120:288-92.
4. Brooke MH, Fenichel GM, Griggs RC, Mendell JR. Duchenne muscular dystrophy: Patterns of clinical progression and effects of supportive therapy. *Neurology* 1989; 39:475-482.
5. Moser H. Duchenne muscular dystrophy: Pathogenetic aspects and genetic prevention. *Hum. Genet.* 1984; 66:17-32.
6. Worton RG, Burghes AH. Molecular genetics of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Int. Rev. Neurobiol.* 1988; 22:601-12.
7. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organisation of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987; 50:509-17.
8. 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.
9. Lindolf M, Kiuru A, Kaariainen H, Kalimo H, Lang H, Pihko H, Rapola J, Somer H, Somer M, Savontaus ML, de la Chapelle A. Gene deletions in X-linked muscular dystrophy. *Am. J. Human Genet.* 1989; 44:496-503.
10. Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM. Dystrophin : the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987; 51:917-28.
11. Beggs AH, Kunkel LM. Improved diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.* 1990; 85:613-19.



12. Nadkarni N, Prior TW, Mendell JR. The impact of molecular genetics on the care of patients with muscle disease. *Curr. Opin. Neurol.* 1994; 7:435-47.
13. Roberts R, Cole C, Hart K, Bobrow M. Rapid carrier and prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Nucleic Ac. Res.* 1989; 17:811-7.
14. Love DR, Flint TJ, Genet SA, Middleton-Price HR, Davies KE. A Becker muscular dystrophy with a large intragenic dystrophin deletion: implications for functional minigenes and gene therapy. *J. Med. Genet.* 1991; 28:860-5.
15. Karpati G, Ajducovic D, Arnold D, Gledhill RB, Gittemann R, Holland P, Worton RG. Myoblast transfer in Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* 1992; 34:8-17.
16. Engel AG. Gene therapy for Duchenne dystrophy. *Annals Neurol.* 1993; 34(1):3-4.
17. Mostaccioulo ML, Lombardi A, Cambissa V, Danieli GA, Angelini C. Population data on benign and severe forms of X-linked muscular dystrophy. *Hum. Genet.* 1987; 75:217-23.
18. Worton RG, Thompson MW. Genetics of Duchenne muscular dystrophy. *Annu. Rev. Genet.* 1988; 22:601-22.
19. 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. Hum. Genet.* 1991; 49:54-67.
20. Mostaccioulo ML, Miorin M. Reappraisal of the incidence rate of Duchenne and Becker muscular dystrophies on the basis of molecular diagnosis. *Neuroepidemiology* 1993; 12(6):326-30.
21. Busby KM, Thambyayah M, Gardner Medwin D. Prevalence and incidence of Becker muscular dystrophy. *Lancet* 1991; 337:1022-23.
22. Penn AS, Lisak RP, Rowland LP. Muscular dystrophy in young girls. *Neurology* 1970; 20:147-52.
23. Boyd Y, Buckle V, Holt S, Munro E, Hunter D, Craig I. Muscular dystrophy in girls with X;autosome translocations. *J. Med. Genet.* 1986; 23:484-91.

24. Bodrug SE, Holden JJ, Ray PM, Worton RG. Molecular analysis of X-autosome translocations in females with Duchenne muscular dystrophy. *EMBO J.* 1991; 10:3931-9.
25. Cockburn DJ, Munro E, Craig I, Boyd Y. Mapping of X chromosome translocation breakpoints in females with Duchenne muscular dystrophy with respect to exons of the dystrophin gene. *Hum. Genet.* 1992; 90:407-13.
26. Burn J, Povey S, Boyd Y, Munro EA, West L, Harper K, Thomas D. Duchenne muscular dystrophy in one of monozygotic twins girls. *J. Med. Genet.* 1986; 23:494-8.
27. Gomez MR, Engel AG, Dewald G, Peterson HA. Failure of inactivation of Duchenne dystrophy X-chromosome in one of female identical twins. *Neurology* 1977; 27:537-42.
28. Quan F, Janas J, Toth-Fejel S, Johnson DB, Wolford JK, Popovich BW. Uniparental disomy of the entire X chromosome in a female with Duchenne Muscular dystrophy. *Am.J.Hum.Genet.* 1997; 60:160-5.
29. Richards CS, Watkins SC, Hoffman EP, Schneider NR, Milsark IW, Katz KS, Cook JD, Kunkel LM, Cortada JM. Skewed X inactivation in a female MZ twin results in Duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 1990; 46:672-9.
30. Arahata K, Ishihara T, Kamakura K, Tsukahara T, Ishiura S, Baba C, Matsumoto T, Nonaka I, Sugita H. Mosaic expression of dystrophin in symptomatic carriers of Duchenne muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* 1989; 320:138-6.
31. 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.
32. Bushby KM, Goodship JA, Nicholson LVB. Variability in clinical, genetic and protein abnormalities in manifesting carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromusc. Dis.* 1993; 3:57-64.
33. Swery C, Sansome A, Clerk A. Manifesting carriers of Xp21 muscular dystrophy: lack of correlation between dystrophin expression and clinical weakness. *Neuromusc. Dis.* 1993; 3:65-70.

34. Perry TB, Fraser FC. Variability of serum creatine phosphokinase activity in normal women and carriers of the gene for Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 1973; 23:1316-23.
35. Lindembaum RH, Clarke G, Patel C, Moncrieff M, Hughes JT. Muscular dystrophy in an X;1 translocation female suggest that Duchenne locus is on X-chromosome short arm. *J. Med. Genet.* 1979; 16:389-94.
36. Jacobs PA, Hunt PA, Mayer M, Bart RD. Duchenne muscular dystrophy (DMD) in a female with an X-autosome translocation: Further evidence that the DMD locus is at Xp21. *Am. J. Hum. Genet.* 1981; 33:513-17.
37. Verellen-Dumoulin C, Freund M, De Meyer R, Laterre C, Frederic J, Thompson MW, Markovic VD, Worton RG. Expression of an X-linked muscular dystrophy in a female due to translocation involving Xp21 and nonrandom inactivation of the normal X chromosome. *Hum. Genet.* 1984; 67:115-21.
38. Guggenheim MA, McCabe ERB, Roig M, Goodman SI, Lum GM, Bullen WW, Ringel SP. Glycerol kinase deficiency with neuromuscular, skeletal and adrenal abnormalities. *Ann. Neurol.* 1980; 7:441-7.
39. Francke U, Ochs HD, de Martinville B. Minor Xp21 chromosome deletion in a male associated with expression of DMD, chronic granulomatous disease, retinitis pigmentosa and McLeod syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 1985; 37:250-67.
40. Clarke A, Roberts SH, Thomas NS, Whitfield A, Williams J, Harper PS. Duchenne muscular dystrophy with adrenal insufficiency and glycerol kinase deficiency: High resolution cytogenetic analysis with molecular, biochemical and clinical studies. *J. Med. Genet.* 1986; 23:501-9.
41. Davies KE, Pearson PL, Harper PS, Murray JM, O'Brien T. Linkage analysis of two cloned sequences flanking the Duchenne muscular dystrophy locus on the short arm of the human X chromosome. *Nucleic Ac. Res.* 1983; 11:2303-14.
42. Davies K, Speer A, Hermann F, Spiegler AWJ. Human X chromosome markers and DMD. *Nucleic Ac. Res.* 1985; 13:3419-23.

43. Walker A, Hart K, Cole C, Hodgson S, Johnson L, Dubowitz V, Bobrow M. Linkage studies in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *J. Med. Genet.* 1986; 23:538-47.
44. Thompson MW, Ray PN, Belfall B, Duff C, Logan C, Oss I, Worton RG. Linkage analysis of polymorphisms within the DNA fragment XJ cloned from the breakpoint of X;21 translocation associated with X linked muscular dystrophy. *J. Med. Gen.* 1986; 23:548-59.
45. Robinson A. Duchenne muscular dystrophy, cystic fibrosis, myotonic dystrophy: gene to protein. *Can. Med. Assoc.* 1993; 148: 1975-9.
46. den Dunnen JT. Reconstruction of the 2.4 Mb human DMD gene by homologous YAC recombination. *Hum. Mol. Genet.* 1992; 12:474-82.
47. Gilgenkrantz H, Hugnot JP, Lambert M, Chafey P, Kaplan JC, Kahan A. Positive and negative regulatory DNA elements including a CCArGG box are involved in the cell type-specific expression of the human muscle dystrophin gene. *J. Biol. Chem.* 1992; 267:10823-33.
48. Klamut HJ, Gangopadhyay SB, Worton RG, Ray PN. Molecular and functional analysis of the muscle-specific promoter region of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Mol. Cell Biol.* 1990; 10:193-208.
49. Chelly J, Hamard G, Koulakoff A, Kaplan JC, Kahn A, Berwald Netter Y. Dystrophin gene transcribed from different promoters in neural and glial cells. *Nature* 1990; 344:64-9.
50. Roberts RG, Coffey AJ, Bobrow M, Bentley DR. Exon structure of the human dystrophin gene. *Genomics* 1993; 16:536-8.
51. Gorecki DC, Monaco AP, Derry JMJ, Walker AP, Barnard EA, Barnard PJ. Expression of four alternative transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Hum. Mol. Genet.* 1992; 1:505-14.
52. Lederfein D, Levy Z, Augier N, Mornet D, Morris G, Fuchs O, Yaffe D, Nudel U. A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscle tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89:5346-51.

53. Rapaport D, Passos-Bueno MR, Brandao L, Love D, Vainzof M, Zatz M. Apparent association of mental retardation and specific patterns of deletions screened with probes cf56a and cf23 a in DMD. *Am. J. Hum. Genet.* 1991; 39:437-4.
54. Uchino M, Teramoto H, Naoe H, Miike T, Yoshioka K, Ando M. Dystrophin and dystrophin-related protein in the central nervous system of normal controls and Duchenne muscular dystrophy. *Acta Neuropatol.* 1994; 87:129-134.
55. Ahn AH, Kunkel LM. The structural and functional diversity of dystrophin. *Nature Genet.* 1993; 3:283-91.
56. Small JV, Fürst DO, Thornell LE. The cytoskeletal lattice of muscle cells. *Eur. J. Biochem.* 1992; 208:559-72.
57. Koenig M, Kunkel LM. Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J. Biol. Chem.* 1990; 265:4560-9.
58. Koenig M, Monaco AP, Kunkel M. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 1988; 53:219-28.
59. Minetti C, Beltrame F, Marcenaro G, Bonilla E. Dystrophin at the plasma membrane of human muscle fibers shows a costameric localization. *Neuromusc. Disord.* 1992; 2:99-109.
60. Straub V, Bittner RE, Lèger JL, Voit T. Direct visualization of the dystrophin network on skeletal muscle fiber membrane. *J. Cell Biol.* 1992; 119:1183-91.
61. Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, Kelly AM, Sweeney HL. Dystrophin protects the sarcolemma from stress developed during muscle contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90:3710-14.
62. Pasternak C, Wong S, Elson E. Mechanical function of dystrophin in muscle cells. *J. Cell Biol.* 1995; 128:355-61.
63. Campbell KP. Three muscular dystrophies: Loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 1995; 80:675-9.

64. Yamazaki M, Minota S, Sakurai H, Miyazono K, Yamada A, Kanazawa I, Kawai M. Expression of transforming growth factor- $\beta$ -1 and its relation to endomysial fibrosis in progressive muscular dystrophy. *Am. J. Pathol.* 1994; 144:221-6.
65. Baumabach LL, Chamberlain JS, Ward PA, Farwell NJ, Caskey CT. Molecular and clinical correlations of deletions leading to Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Neurology* 1989; 39:465-78.
66. Nicholson LV, Johnson MA, Gardner MD, Bhattacharya S, Harris JB. Heterogeneity of dystrophin expression in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Acta Neuropathol.* 1990; 80:239-52.
67. Takeshima Y, Nishio H, Narita N, Wada MD, Ishikawa Y, Matsuo M. Amino-terminal deletion of 53% of dystrophin results in an intermediate Duchenne-Becker muscular dystrophy phenotype. *Neurology* 1994; 44:1648-51.
68. Higuchi I, Fukunaga H, Usuki F. Phenotypic Duchenne muscular dystrophy with C-terminal domain. *Pediatric Neurol.* 1992; 8:310-2.
69. Arahata K, Beggs AH, Honda H, Ito S, Ishiura S, Tsukahara T, Ishiguro T, Eguchi C, Orimo S, Arikawa E. Preservation of the C-terminus of dystrophin molecule in the skeletal muscle from Becker muscular dystrophy. *J. Neurol. Sci.* 1991; 101:148-56.
70. Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 1989; 2:90-5.
71. Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Betteckenn T, Meng G, Müller CR, van Ommen GJB, Kunkel LM. The molecular basis for Duchenne versus Becker Muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am. J. Hum. Genet.* 1989; 45:498-506.
72. Monaco AP, Bertelson CJ, Middlesworth W, Colletti CA, Aldrige J, Fischbeck KH, Bartlett D, Kunkel LM. Detection of deletions spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA segment. *Nature* 1985; 316:842-8.

73. Kunkel LM, Monaco AP, Bertelson CJ, Middlesworth W, Colletti CA, Aldrige J, Fischbeck KH, Bartlett D. Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 1986; 322:73-85.
74. Bancrjee M, Verma IC. Are there ethnic differences in deletions in the dystrophin gene?. *Am. J. Med. Genet.* 1997; 68:152-7.
75. den Dunnen TJ, Grootsholten PM, Bakker E, Blondin LA, Ginjaar HB, Wapenaar MC, van Paassen HM, van Broeckhoven C, Pearson PL, van Ommen GJ. Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *Am. J. Hum. Genet.* 1989; 45:835-47.
76. Roberts RG, Bobrow M, Bentley DR. Point mutations in the dystrophin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89:2331-7.
77. Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum. Genet.* 1990; 86:45-61.
78. Grimm T, Meng G, Liechti-Gallati S, Bettecken T, Muller CR, Muller B. On the origin of deletions and point mutations in DMD: most deletions arise in oogenesis and most point mutations result from events in spermatogenesis. *J. Med. Genet.* 1994; 31:183-6.
79. Bunyan DJ, Crolla JA, Collins AL, Robinson DO. Fluorescence in situ hybridisation studies provide evidence for somatic mosaicism in de novo dystrophin gene deletions. *Hum. Genet.* 1995; 95:43-5.
80. Blondin LA, Grootsholten PM, den Dunnen JT, Bakker E, Abbs S, Bobrow M, Boehm C, van Broeckhoven C, Baumbach L, Chamberlain J. 242 breakpoints in the 200-kb deletion-prone P20 region of the DMD gene are widely spread. *Genomics* 1991; 10:631-43.
81. Kochling S, den Dunnen JT, Dworniczak B, Horst J. Two polymorphic dinucleotide repeats in intron 44 of the dystrophin gene. *Hum. Genet.* 1995; 95:475-7.
82. Pizzuti A, Pieretti M, Fenwick RG, Gibbs RA, Caskey CT. A transposon-like element in the deletion prone region of the dystrophin gene. *Genomics* 1992; 13:594-600.

83. Caskey CT, Nussbaum RL, Cohan LC, Pollack L. Sporadic occurrence of Duchenne muscular dystrophy: evidence for new mutation. *Clin. Genet.* 1980; 18:329-41.
84. Passos-Bueno MR, Tarleton J, Popovich B. Different mosaicism frequencies for proximal and distal Duchenne muscular dystrophy (DMD) mutations indicate difference in etiology and recurrence risk. *Am. J. Hum. Genet.* 1992; 8:310-2.
85. Sinha S, Mishra S, Singh V, Mittal RD, Mittal B. High frequency of new mutations in North Indian Duchenne/Becker muscular dystrophy patients. *Clin. Genet.* 1996; 50:327-31.
86. Hu XY, Ray PN, Murphy EG, Thompson MW, Worton RG. Duplicational mutation at the DMD locus: its frequency, distribution, origin and phenotype-genotype correlation. *Am. J. Hum. Genet.* 1990; 46:682-97.
87. Hu XY, Pay PN, Worton RG. Mechanism of tandem duplication in the DMD gene include both homologous and nonhomologous intrachromosomal recombination. *EMBO J.* 1991; 10:2471-83.
88. Kodaira M, Hiyama K, Karakawa T, Kameo H, Satoh C. Duplication detection in Japanese Duchenne muscular dystrophy patients and identification of carriers with partial deletions using pulsed-field gel electrophoresis. *Hum. Genet.* 1993; 92:237-43.
89. Narita N, Nishio H, Kitoh Y, Ishikawa Y, Ishikawa Y, Minami R, Nakamura H, Matsuo M. Insertion of a 5' truncated L1 element into the 3' end of exon 44 of the dystrophin gene resulted in skipping of the exon during splicing in a case of Duchenne muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.* 1993;91:1862-7.
90. Shashi V, Golden WL, Allinson PS, Blanton SH, von Kap-Herr CH, Kelly TE. Molecular analysis of recombination in a family with Duchenne muscular dystrophy and a large pericentric X chromosome inversion. *Am. J. Hum. Genet.* 1996;58:1231-8.
91. Prior TW, Papp AC, Snyder PJ. Heteroduplex analysis of the dystrophin gene: application to point mutation and carrier detection. *Am. J. Med. Genet.* 1994; 50(1):68-73.



92. Winnard AV, Jia-Hsu J, Gibbs RA, Mendell JR, Burghes AHM. Identification of a two base pair nonsense mutation causing a cryptic splice site in a DMD patient. *Hum. Mol. Genet.* 1992; 1:645-52.
93. Cross GS, Speer A, Rosenthal A, Forrest SM, Smith TJ, Edwards Y, Flint T, Hill D, Davies KE. Deletions on fetal and adult muscle cDNA in Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. *EMBO J.* 1987; 6:3277-83.
94. Prior TW, Friedman KJ, Highsmith WE, Perry TR, Silvermann LM. Molecular probe protocol for determining carrier status in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Clin. Chem.* 1990; 36:441-5.
95. Kunkel LM, Monaco AP, Middlesworth W, Ochs HD, Latt SA. Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X-chromosome deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985; 82:4778-85.
96. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the DMD locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Ac. Res.* 1988; 56:135-56.
97. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (editors). PCR protocols: A guide to methods and applications. In: Optimization of PCRs; Amplification of genomic DNA; Thermostable DNA polymerases; Procedures to minimize PCR-product carry-over; sample preparation from blood, cells and other fluids; Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne Muscular Dystrophy; Basic equipment and supplies. Academic Press, Orlando FL, 1990.
98. Gokgoz N, Kuseyri F, Topaloglu H, Yuksel-Apak M, Kirdar B. Screening of deletions and RFLP analysis in Turkish DMD/BMD families by PCR. *Clin. Genet.* 1993; 43:261-6.
99. Coral-Vazquez R, Arenas D, Cisneros B, Peñaloza L, Kofman-Alfaro S, Salamanca F, Montañez C. Analysis of dystrophin gene deletion in patients from the Mexican population with Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Arch. Med. Res.* 1993; 24:1-6.
100. Abbs S, Bobrow M. Analysis of quantitative PCR for the diagnosis of deletion and duplication carriers in the dystrophin gene. *J. Med. Genet.* 1992; 29:191-6.

101. Fassati A, Tedeschi S, Bordoni A, Amboni P, Curcio C, Bresolin N, Scarlato G. Rapid direct diagnosis of deletion carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Lancet* 1994; 344:302-3.
102. Mansfield ES, Robertson JM, Lebo RV, Lucero MY, Maynard PE, Rappaport E, Parrella T, Sartore M, Surrey S, Fortina P. Duchenne/Becker muscular dystrophy carrier detection using quantitative PCR and fluorescence-based strategies. *Am. J. Hum. Genet.* 1993; 48:200-8.
103. Bronzova J, Todorova A, Kalaydjieva L. Detection of carriers of deletions in the dystrophin gene in Bulgarian DMD/BMD families. *Hum. Genet.* 1994; 93:170-4.
104. Minaminakawa-Tachino R, Ishii K, Sakuraba H. Quantitative analysis of dystrophin gene amplification products using a PC-based image analysis system. *Int. J. Biomed. Compu.* 1993; 33:277-86.
105. Grompe M. The rapid detection of unknown mutation in nucleic acids. *Nature Genetics* 1993; 5:111-7.
106. Mullis K (editor). *The polymerase chain reaction. In: quantitative PCR.* Oxford University Press, 1994.
107. Schwartz LS, Tarleton-Popovich B. Fluorescent multiplex linkage analysis and carrier detection for Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 1992; 51:721-9.
108. Roberts RG, Barby TF, Manners E, Bobrow M, Bentley DR. Direct detection of dystrophin gene rearrangements by analysis of dystrophin mRNA in peripheral blood lymphocytes. *Am. J. Hum. Genet.* 1991; 49:298-7.
109. Lenk U, Demuth S, Kraft U, Hanke R, Speer A. Alternative splicing of dystrophin mRNA complicates carrier determination: report a DMD family. *J. Med. Genet.* 1993; 30:206-9.
110. Laing NG. Molecular genetics and genetic counselling for Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Mol. Cell Biol. Hum. Dis. Ser.* 1993;3:37-84.
111. Edwards JH. The population genetics of DMD: natural and artificial selection in Duchenne muscular dystrophy. *J. Med. Genet.* 1986; 23:521-32.

112. Muller B, Dechant C, Meng G, Liechtti-Gallati S, Doherty RA, Bakker E, Read AP, Jeanpierre M, Fishbek KH, Romeo G, Francke U, Wilichowski E, Greenberg CR, van Broeckhoven C, Junien C, Muller CR, Grimm T. Estimation of the male and female mutation rates in Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Hum. Genet.* 1992; 89:204-18.
113. Barbujani G, Russo A, Danieli GA, Spiegler AW, Borkowska J, Petruszewicz IH. Segregation analysis of 1885 DMD families: Significant departure from the expected proportion of sporadic cases. *Hum. Genet* 1990; 84:522-46.
114. Bernier FP, Greenberg CR, Halliday WC, Wrogemann K. Single-blind study of dystrophin staining in carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Can. J. Neurol. Sci.* 1993; 20:44-7.
115. Perlin MW, Burks MB, Hoop RC, Hoffman EP. Toward fully automated genotyping: allele assignment, pedigree construction, phase determination, and recombination detection in DMD. *Am. J. Hum. Genet.* 1994; 55:777-87.
116. Shi YJ, Fischbeck KH, Ritter A. Potential pitfalls in using DNA probes to counsel Duchenne and Becker muscular dystrophy families. *Chin. Med. J.* 1992; 105:469-75.
117. Chakraborty R, Zhong Y, de Andrade M, Clemens PR, Fenwick RG, Caskey CT. Linkage disequilibria among (CA)<sub>n</sub> polymorphisms in the human dystrophin gene and their implications in carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Genomics* 1994; 21:567-70.
118. Arenas D, Coral R, Cisneros B, Peñaloza L, Salamanca F, Kofman S, Mercado R, Méndez J, Martínez C, Montañez C. Carrier detection in Duchenne and Becker Muscular dystrophy using dinucleotide repeat polymorphisms. A study in mexican families. *Arch. Med. Res.* 1996; 27(2):151-6.
119. Roberts RG, Montandon AJ, Bobrow M, Bentley DR. Detection of novel genetic markers by mismatch analysis. *Nucleic Ac. Res.* 1989; 17:5961-71.
120. Kruyer H, Miranda M, Volpini V, Estivill X. Carrier detection and microsatellite analysis of Duchenne and Becker muscular dystrophy in Spanish families. *Prenat. Diagn.* 1994; 14:123-30.

121. Melis MA, Cau M, Congiu R, Puddu, Muntoni F, Cao A. Germinal mosaicism in a Duchenne muscular dystrophy family: implications for genetic counselling. *Clin. Genet.* 1993; 43:247-9.
122. Alvarez LM, Ortiz JDM, Narro JA, Solís AJG, Morales AA. Evaluación de la actividad de la creatinofosfocinasa (CPK) para la detección de portadoras de distrofia muscular tipo Duchenne en familias de la ciudad de Monterrey, México. *Rev. Invest. Clin.* 1990; 42:39-45.
123. Abbs S, Yau SC, Clark S, Mathew CHG, 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; 28:304-11.
124. Holding C, Bentley D, Roberts R, Bobrow M, Mathew Ch. Development and validation of laboratory procedures for preimplantation diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. *J. Med. Genet.* 1993; 30:903-9.
125. Roberts RG. Dystrophin, its gene, and the dystrophinopathies. *Adv. Genet.* 1995; 33:177-231.
126. Cox GA, Cole NM, Matsumura K, Phelps SF, Haushka SD, Campbell KP, Faulkner JA, Chamberlain JS. Overexpression of dystrophin in transgenic *mdx* mice eliminates dystrophic symptoms without toxicity. *Nature* 1993; 364: 725-9.
127. Ragot T, Vincent N, Chafey Ph, Vigne E, Gilgenkrantz H, Couton D, Cartaud J, Briand P, Caplan JC, Perricaudet M, Kahan A. Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of *mdx* mice. *Nature* 1993; 361:347-50.
128. Ballo R, Viljoen D, Beighton P. Duchenne and Becker muscular dystrophy prevalence in South Africa and molecular findings in 129 persons affected. *S. Afr. Med. J.* 1994; 84:494-7.
129. Zeng YT, Chen MJ, Ren ZR, QiuXK, Huang SZ. Analysis of RFLPs and DNA deletions in the Chinese Duchenne muscular dystrophy gene. *J. Med. Genet.* 1991; 28:167-170.
130. Norman AM, Upadhyaya M, Thomas NST, Roberts K, Harper PS. Duchenne muscular dystrophy in Wales: impact of DNA linkage analysis and cDNA deletion screening. *J. Med. Genet.* 1989; 26:565-71.

131. Sugino S, Fujishita S, Kamimura N, Matsumoto T, Wapenaar C, Deng HX, Shibuya N, Miike T, Nikawa N. Molecular-genetic study on Duchenne and Becker muscular dystrophies: Deletion analyses on 45 Japanese patients and segregation analyses in their families with RFLPs based on the data from normal Japanese females.
132. Prior TW, Bartolo C, Pearl D, Papp A, Snyder P, Sedra MS, Burghes AHM, Mendell JR. Spectrum of small mutations in the dystrophin coding region. *Am. J. Med. Genet.* 1995; 57:22-33.
133. Garder RJ, Bobrow M, Roberts R. The identification of point mutations in DMD patients by using reverse transcription PCR and the protein truncation test. *Am. J. Hum. Genet.* 1995; 57:311-20.
134. Papiha SS, Roberts DF, Clarke A, Burn J, Gardner-Medwin D, Bhattacharya SS. Population frequencies of three DNA alleles linked to the Duchenne muscular dystrophy gene. *J. Med. Genet.* 1989; 26:390-2.
135. Pearson PI, Kidd KK, Willard HF. Report of the committee on human genetic mapping by recombinant DNA techniques. *Cytogenet. Cell Genet.* 1987; 46:390-566.
136. Christodoulou K, Iaconou P, Middleton I. Molecular genetic detection of Xp21 muscular dystrophy carriers in Cyprus. *Biomed. Pharmacother.* 1994; 48:355-8.

El jurado designado por la División de Estudios de Posgrado, de la Facultad de Ciencias de la  
Universidad Nacional Autónoma de México, aprobó la presente tesis

**PRESIDENTE**

\_\_\_\_\_  
D. EN C. ALFONSO MIGUEL TORRE BLANCO

**PRIMER VOCAL**

**SEGUNDO VOCAL**

\_\_\_\_\_  
D. EN C. SARA FRÍAS VÁZQUEZ

\_\_\_\_\_  
D. EN C. LUIS FELIPE JÍMENEZ GARCÍA

**TERCER VOCAL**

\_\_\_\_\_  
D. EN C. LORENA SOFÍA OROZCO OROZCO

**SECRETARIO**

\_\_\_\_\_  
M. EN C. ARIADNA ESTELA GONZÁLEZ DEL ANGEL

**SUPLENTE**

**SUPLENTE**

\_\_\_\_\_  
M. EN C. RICARDO JUAN GARCÍA CAVAZOS

\_\_\_\_\_  
MED. CIR. ALESSANDRA CARNEVALE CANTONI