



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

"Análisis del marcador tipo RFLP PERT 87.15/xmnl en familias con distrofia muscular de Duchenne y Becker (DMD/DMB)"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
BEATRIZ AMELIA ACEVEDO HERNANDEZ

DIRECTOR: M. en C. Miguel Angel Alcántara Ortigoza

Adscripción: Investigador Asociado Tipo B del Instituto Nacional de Pediatría



MÉXICO, D. F.,

NOVIEMBRE 2001 4

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por darme la oportunidad de superarme en el ámbito profesional.

AL INP por haberme aceptado en la realización de este trabajo.

Al M. en C. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza por darme la oportunidad de realizar este trabajo, sin cuya dirección no hubiera sido posible.

A la Biol. Cristina Alvarado por sus aportaciones que ayudaron al enriquecimiento de este trabajo.

A mis sinodales por su valioso tiempo y dedicación en la revisión del presente trabajo.

A mis maestros por su tiempo y dedicación en mi formación.

A Santiago Camacho por ayudarme y apoyarme en todo momento.

DEDICATORIA

A mi mamá por haberme dado la vida, por su ayuda constante y generosidad.

A mi hijo por darme el impulso necesario para continuar día a día intentando la superación constante, por ser mi amigo, por apoyarme siempre y por brindarme toda la felicidad del mundo.

A Miguel Angel Eligio por su amistad, cariño, comprensión, por ser la persona con quien he compartido los momentos más alegres y tristes, gracias por todo.

A mis amigos Anita, Delia, Victoriano, Felipe, Ray y Aída por ser los mejores amigos.

ÍNDICE

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMEN | 4 |
| INTRODUCCIÓN | 6 |
| I. LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN GENÉTICA | 6 |
| II. DNA RECOMBINANTE | 7 |
| III. ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN | 8 |
| IV. ANÁLISIS SOUTHERN BLOT | 10 |
| V. FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN DE LONGITUD POLIMÓRFICA (RFLP) | 10 |
| VI. NÚMEROS VARIABLES DE REPETICIONES EN TANDEM (VNTR) | 12 |
| VII. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) | 12 |
| VIII. DISTROFIAS MUSCULARES | 16 |
| IX. GENÉTICA DE LAS DMD/DMB | 18 |
| X. EL GEN DMD Y SU PRODUCTO: LA DISTROFINA | 18 |
| XI. ESTUDIOS MOLECULARES | 20 |
| XII. DETECCIÓN MOLECULAR DE PORTADORAS | 20 |
| XIII. DIAGNÓSTICO PRENATAL | 21 |
| XIV. ANÁLISIS DE LIGAMIENTO | 22 |
| JUSTIFICACIÓN | 23 |
| OBJETIVOS | 24 |
| MATERIAL Y MÉTODO | 24 |
| a) POBLACIÓN OBJETIVO | 24 |
| b) CREACIÓN DEL BANCO DE DNA | 24 |
| c) ANÁLISIS DEL MARCADOR TIPO RFLP PERT87.15/xmnl | 25 |
| d) DETERMINACIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS, ÍNDICE DE HETEROCIGOCIDAD (INFORMATIVIDAD) | 27 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESULTADOS | 28 |
| 1. DISTRIBUCIÓN DE FAMILIAS CON CASOS ÚNICOS, CON ANTECEDENTES HEREDOFAMILIARES Y DESCONOCEN | 28 |
| 2. DISTRIBUCIÓN DE FAMILIAS CON DMD,DMB, DMD/DMB | 29 |
| 3. FRECUENCIAS ALÉLICAS | 30 |
| 4. PRUEBA ESTADÍSTICA | 31 |
| 5. FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS EN DIFERENTES POBLACIONES | 32 |
| 6. ÍNDICE DE HETEROCIGOCIDAD | 33 |
| DISCUSIÓN | 35 |
| CONCLUSIONES | 38 |
| COMENTARIOS FINALES | 39 |
| BIBLIOGRAFÍA | 40 |

RESUMEN

Las distrofias musculares de Duchenne (DMD) y Becker (DMB) son desórdenes degenerativos del músculo estriado que se heredan en forma recesiva ligada al cromosoma X, su frecuencia es muy superior en hombres que en mujeres. Se caracterizan por debilidad muscular progresiva, pseudohipertrofia de gemelos y elevación en los niveles séricos de la creatinínfosfocinasa (CPK). El gen DMD es el gen humano de mayor tamaño hasta ahora caracterizado. El gen consta de 2.3 Mb de ADN que dan lugar a un transcrito de 13 kb y consta de 79 exones que representan menos del 1 % de la longitud total del gen. Este gen codifica para una proteína del citoesqueleto subsarcolémico denominada distrofina con un peso de 427 kD y se ha demostrado su presencia en distintos tejidos con sus isoformas específicas. Tiene un total de 3.685 aminoácidos y presenta una estructura repetitiva.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), logra identificar el 98% de las deleciones responsables de la enfermedad. 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 acuden al Instituto Nacional de Pediatría (INP) 176 familias con DMD/DMB a la consulta externa de genética, de las cuales 104 fueron incluidas en el estudio. De acuerdo con los antecedentes familiares solo en 30 (28.75%) de éstas había sido posible brindar un asesoramiento genético de certeza a la madre. Sin embargo, sigue siendo incierto en las hermanas de los pacientes y en las mujeres de las familias restantes.

En la presente tesis se propuso: 1) determinar la utilidad del análisis del marcador tipo RFLP PERT87.15/xmnl en la asignación del estado de portadoras en familias con y sin antecedentes de casos afectados de DMD/DMB que acuden al Instituto Nacional de Pediatría, S.S y que son canalizadas al departamento de Biología Molecular; 2) determinar la frecuencia del polimorfismo PERT87.15/xmnl; 3) determinar las frecuencias de mutaciones de *novó*; y 4) detectar a las portadoras de las distrofias musculares de Duchenne y Becker.

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. A todas las familias y a sus integrantes se les hizo análisis de ligamiento por PCR/RFLPs utilizando el marcador intragénico de la región 5' del gen DMD (PERT 87.15/xmnl).

Se definió la frecuencia para el polimorfismo; también las frecuencias de mutaciones de *novó* y detectó a las portadoras de las distrofias musculares de Duchenne y Becker.

Del total de familias analizadas (n=104) 71 familias son casos únicos, 30 familias son casos familiares y 3 familias no saben.

De las 104 familias integradas al estudio, 80 familias presentaron DMD (76.9230%), 21 familias presentaron DMB (20.1923%), dos tenían el cuadro intermedio DMD/DMB (1.9230%) y solo una familia acudió porque un familiar había muerto de DMD.

Para fines de comparación con otras poblaciones, se obtuvo la frecuencia de X en sujetos no emparentados de nuestras 104 familias, es decir todas las madres (n=104, 208 alelos) y padres (n=14, 14 alelos). La frecuencia de los alelos para PERT87.15/xmnl fueron para $X_1 = 0.4730$ y para $X_2 = 0.5270$ basándonos en estos resultados el polimorfismo más frecuente fue X_2 , pero al aplicar la prueba estadística se observó que X_1 y X_2 no difieren entre sí, con un 5% de significancia.

De las 104 madres estudiadas, encontramos que el 50% (n=52) fueron heterocigotas y el 50% (n=52) fueron homocigotas para el polimorfismo X. De las 52 madres heterocigotas 80.769230% (n=42) son casos índice sin antecedentes heredofamiliares y 19.2307% (n=10) son casos índice con antecedentes familiares, no se puede asignar el estado de portadoras a todas las familias, debido a que el porcentaje de homocigotas y heterocigotas es el mismo.

INTRODUCCIÓN

Gracias al desarrollo de la ingeniería genética en los últimos 20 años, el DNA pasó de ser la molécula más difícil y complicada de estudiar, a ser la más fácil. Procesos metabólicos del DNA tales como la duplicación, la transcripción del DNA en RNA, la unión entre dos moléculas de DNA, etc, son llevados a cabo por enzimas que han sido identificadas, clonadas y secuenciadas y que existen, por lo tanto, a disposición comercial para su utilización en un laboratorio de investigación. Gracias a la tecnología del DNA recombinante es posible manipular *in vitro* el DNA de manera tal que cada investigador puede estudiar un sin número de aspectos con relación a su proteína favorita (1).

I.- LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN GENÉTICA

Tabla 1. Técnicas de biología molecular.

| Principio | Enzima/ Método |
|---------------------------------|-------------------------------------|
| Fragmentación de DNA | Enzimas de restricción |
| Secuenciación de DNA | DNA polimerasa |
| Reproducción de DNA | DNA polimerasa/clonación |
| Síntesis de DNA a partir de RNA | Transcriptasa reversa |
| Detección de DNA en bloque | Southern blot |
| Detección de RNA en bloque | Northern blot |
| Detección de DNA/RNA en tejido | Hibridación <i>in situ</i> |
| Amplificación de secuencias | Reacción en cadena de la polimerasa |
| Traslación de DNA a células | Transfección |
| Traslación de DNA a animales | Animales transgénicos |

En la tabla 1 se muestran algunos ejemplos de cómo la manipulación del DNA es el fundamento de las técnicas utilizadas en un laboratorio de biología molecular; así, las endonucleasas de restricción son útiles para fragmentar el DNA en sitios específicos y obtener diversos genes (1).

La DNA polimerasa sirve para sintetizar DNA *in vitro* que puede posteriormente ser utilizado para clonación o bien secuenciación, con lo que podremos conocer la secuencia de bases en el DNA y por lo tanto, la estructura primaria de la proteína. Con la transcriptasa reversa podemos sintetizar DNA a partir de RNAm, y así generar lo que conocemos como genoteca de DNA complementario, que representa el DNA que codifica para proteínas en un tejido o célula particular. Podemos marcar DNA o RNA con métodos radioactivos o no radioactivos y generar una sonda que será útil para detectar DNA o RNA específico tanto en bloques (Southern y Northern blot) como en el tejido mismo (hibridación *in situ*). Con la reacción en cadena de la polimerasa podemos amplificar ciertos fragmentos de DNA y así, aunque sean muy escasos, poder detectarlos, clonarlos y modificarlos. Finalmente podemos trasladar el DNA a células extrañas con lo que conseguimos clonar fragmentos de DNA o crear modelos de animales transgénicos (1).

II.- DNA RECOMBINANTE

El desarrollo de la metodología de DNA recombinante (ingeniería genética) ha revolucionado la biología al permitir el análisis directo de los genes y su expresión.

El descubrimiento de las enzimas de restricción a principios de los años 70's fue el parte aguas que inició la era de la tecnología de DNA recombinante. Las enzimas de restricción son propias de las bacterias y representan una especie de sistema de defensa que las protege de la invasión por DNA extraño. Las enzimas de restricción, conocidas como endonucleasas, tienen la función de reconocer una secuencia específica en el DNA invasor y cortarlo en ese sitio. El DNA propio no es digerido porque las bacterias cuentan con una metilasa que se encarga de marcar (por metilación) el DNA en dicha secuencia específica, con lo que se protege del corte. Así, al otorgar la naturaleza este mecanismo de defensa a las bacterias, otorgó también a los científicos un arsenal de enzimas altamente específico para manipular el DNA.

Los requerimientos básicos de esta metodología son: enzimas de restricción que sirven para cortar específicamente moléculas de DNA, vectores que son moléculas de DNA capaces de replicarse de forma autónoma en una célula huésped y a los cuales se inserta el gen exógeno y técnicas de clonación que permiten obtener múltiples copias del vector que contiene el gen de interés al introducirlo en una célula huésped (1).

III.- ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Las enzimas de restricción también llamadas endonucleasas de restricción (cortan la doble hélice del ADN), tienen la propiedad de reconocer una secuencia específica de cuatro a ocho bases, generalmente palindrómica, fragmentando el DNA de manera específica y reproducible (fig.1) (2).

Existen tres tipos de enzimas de restricción conocidas como I, II, y III. Las enzimas tipo I y III no tienen gran utilidad práctica. Primero, el corte al DNA no lo hacen precisamente en el sitio de reconocimiento, sino a muchas bases de distancia y segundo, porque poseen tanto la actividad de restricción, como la de metilación. En cambio, las endonucleasas tipo II realizan el corte en el sitio de reconocimiento, o a unas cuantas bases de distancia, carecen de actividad de metilación, tienen altísima especificidad para reconocer un pequeño fragmento de DNA (sitio de restricción) y además, existen muchas enzimas diferentes que reconocen sitios diferentes.

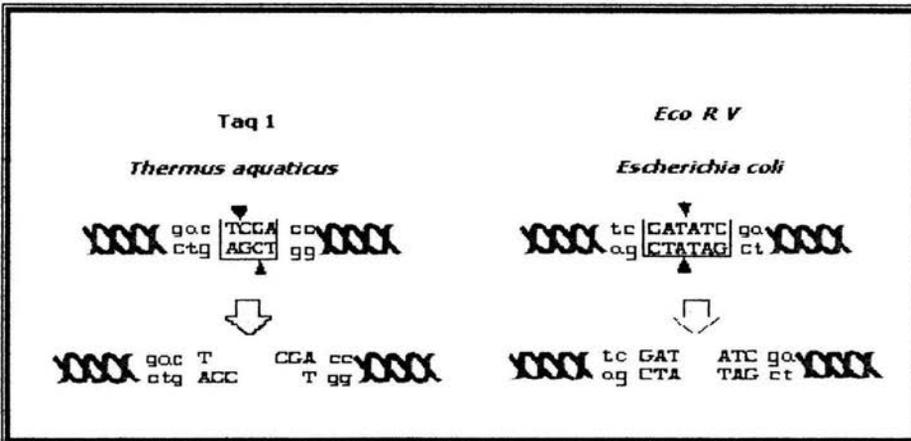


Figura 1. Las enzimas de restricción (ER). En la figura se presenta la actividad endonucleasa de las ER Taq I (obtenida de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*) y EcoRV (obtenida de la enterobacteria *Escherichia coli*). Ambas enzimas tienen especificidad para la secuencia reconocida (diana) y cortan a la misma liberando fragmentos con extremos cohesivos respectivamente este tipo de enzimas tiene una total especificidad por la secuencia diana y el cambio de un solo nucleótido en esta produce la pérdida de reconocimiento. Las mutaciones debidas a variaciones nucleotídicas o las pequeñas deleciones o inserciones pueden producir la pérdida de una diana o la aparición de una nueva diana donde antes del cambio ésta no existía.

El análisis del DNA cambió con el descubrimiento de las enzimas de restricción, ya que estas sirven para reducir segmentos grandes de DNA, o genomas complejos, a fragmentos pequeños que son analizables con métodos convencionales.

Los más utilizados son los geles semisólidos hechos con agarosa o poliacrilamida, en los cuales al aplicar un campo eléctrico, los fragmentos de DNA se desplazan con una velocidad inversamente proporcional a su tamaño, por lo que los más pequeños corren a lo largo del gel más rápido que los de mayor tamaño, y así los fragmentos obtenidos de una molécula de DNA, expuesta a digestión con una o varias enzimas de restricción, pueden ser separados uno del otro. Si en un carril del gel se coloca DNA de tamaño conocido, se puede calcular con bastante precisión el tamaño de cada fragmento (fig.2) (1,2).

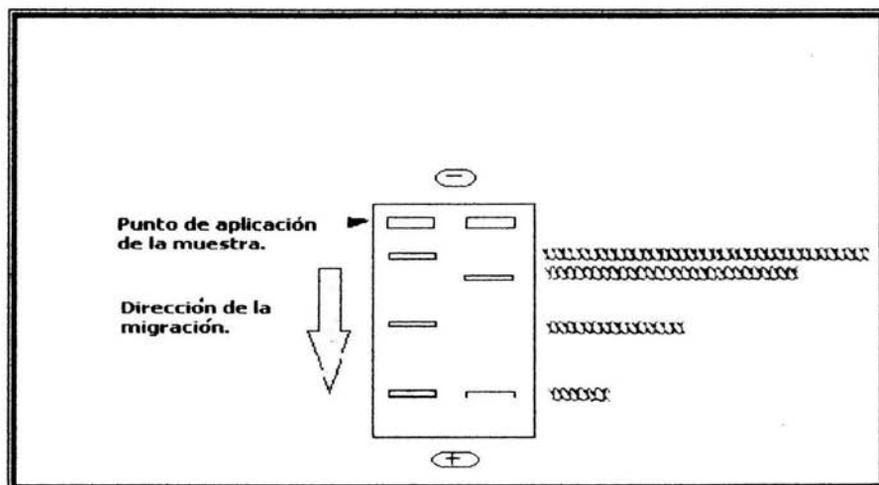


Figura 2. Separación electroforética de ácidos nucleicos. La muestra se aplica próxima al polo negativo y migra hacia el polo positivo. Los fragmentos grandes de ADN quedan retenidos en su migración al pasar con mayor dificultad a través del poro. Los fragmentos más pequeños alcanzan el extremo final del gel, pasando con facilidad a través de los poros

Las enzimas de restricción cortan una cadena de DNA cada vez que encuentran en ella la secuencia blanco o sitio de restricción. Por tanto, de una molécula dada de DNA, se obtendrán siempre los mismos fragmentos cuando sea expuesta a una enzima de restricción en particular. El mapa que se obtiene es lo que se conoce como mapa de restricción. Este es el paso inicial para analizar cualquier molécula de DNA. La complejidad del mapa depende del tamaño de la molécula y del número de enzimas utilizadas.

Como en el caso de los mapas de restricción, se pueden utilizar endonucleasas, en combinación con marcadores, para construir mapas genéticos a partir del DNA humano.

La construcción de mapas genéticos se basa en el hecho de que existen muchas variaciones en la constitución genética de la población. La mayor parte del DNA que tenemos no constituye genes ni codifica para proteínas. Aun dentro de un gen, existen fragmentos con información codificante (exones) y otros con información no codificante (intrones). Además, debido a la redundancia del código genético, aún en los exones pueden existir cambios sutiles en la secuencia de bases que cambian sitios de restricción, pero que no afectan la secuencia de las proteínas. Es decir, en la población existen múltiples variaciones del material genético que no resultan en cambios fenotípicos; este fenómeno se conoce con el nombre de polimorfismo genético. Algunos de estos polimorfismos en el genoma pueden ser detectados con enzimas de restricción, si comparamos los cambios en el patrón de fragmentos del DNA de varios sujetos. Esta diferencia en los mapas de restricción entre dos o más individuos es lo que se conoce como fragmentos de restricción de longitud polimórfica o RFLP (1).

IV.- ANÁLISIS SOUTHERN BLOT

El análisis tipo Southern es útil para detectar y analizar segmentos de DNA específicos presentes en una mezcla compleja de fragmentos. Este estudio puede ser realizado en el DNA de células fetales obtenidas por amniocentesis, sin necesidad de cultivo y tiene la ventaja de detectar genes anormales que no se expresan en estas células. Esta técnica es muy sensible y ha sido ampliamente utilizada para detectar secuencias polimórficas en el genoma humano (1,2).

V.-FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN DE LONGITUD POLIMÓRFICA (RFLP).

Un polimorfismo genético es una variación en el genoma, generalmente en secuencias no codificantes y sin efecto sobre el fenotipo. Cuando este polimorfismo causa que un sitio de corte para una enzima de restricción aparezca o desaparezca, puede ser reconocido por la variación en la longitud del fragmento resultante mediante un análisis tipo Southern y se convierte en un RFLP (Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica).

Pueden ser utilizados como marcadores genéticos en el diagnóstico indirecto de enfermedades hereditarias en las que aún se desconoce el gen responsable o el defecto bioquímico, como fibrosis quística, corea de Huntington, distrofia muscular de Duchenne y Becker, distrofia miotónica, enfermedad de Alzheimer, fenilcetonuria, retinitis pigmentosa, hipercolesterolemia familiar, hemofilia A y B, carcinomas de colon hereditarios con y sin poliposis, retinoblastoma y muchas otras.

Los RFLPs tienen mucha utilidad en genética médica porque se heredan en forma mendeliana. La mayor parte de los polimorfismos se explican por dos razones: una es que los individuos tengan diferentes RFLPs para un marcador determinado porque tienen diferente número de sitios de restricción para una enzima dada y, por tanto, el número y tamaño de los fragmentos obtenidos serán diferentes cuando se analiza el DNA con dicho marcador, digerido con la enzima apropiada. La segunda es que, en los genes, con frecuencia, un triplete puede repetirse cierto número de veces, sin afectar el fenotipo de la proteína porque estas repeticiones suceden en las regiones no codificantes. El número de veces que el triplete se repite varía entre individuos, por lo que la longitud de los fragmentos de restricción para una enzima dada puede cambiar, sin que exista variación en el número de sitios de restricción.

La existencia de los RFLPs es la base de una técnica que permite establecer inequívocamente la relación padres e hijos.

Otra aplicación importante de los RFLPs en la clínica es la identificación de genes asociados a enfermedades hereditarias.

Como los polimorfismos de restricción ocurren de manera aleatoria, con frecuencia un polimorfismo puede estar muy cerca de un gen; por tanto, se puede hacer un mapa de una región cromosómica con los RFLPs, y relacionar los hallazgos del mapa con la presencia o no de la enfermedad. La identificación de un marcador de este tipo ofrece un procedimiento diagnóstico para detectar la enfermedad, tanto en la fase prenatal como en algún momento posterior (2,3).

VI.- NÚMEROS VARIABLES DE REPETICIONES EN TANDEM (VNTR)

Los VNTR (Números Variables de Repeticiones en Tándem) son secuencias de DNA de 2 a 10 pb (pares de bases) repetidas en tándem, son resultado del número diferente de veces que se repite la secuencia base, por medio de éstas se obtiene un patrón de bandas específico para cada individuo que se conoce como huellas de DNA o perfil de DNA. Las huellas genómicas únicamente serán iguales en gemelos monocigotos. Este análisis de DNA es utilizado en medicina legal para la identificación precisa de individuos en casos de paternidad, crímenes, violaciones, etc. El reconocimiento de la secuencia génica ha facilitado la identificación no solo de un gran número de genes responsables de enfermedades, sino de los productos de estos genes, Este procedimiento se conoce como genética reversa o clonación posicional (2).

VII.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) permite la amplificación de una región particular de DNA. Esta técnica es de una gran sensibilidad y permite tener un resultado confiable al cabo de un par de horas. Puede utilizarse para el estudio de numerosos padecimientos hereditarios, incluyendo la detección presintomática de portadores y el diagnóstico prenatal. También se utiliza en el diagnóstico de enfermedades infecciosas como tuberculosis y SIDA. En la actualidad esta siendo ampliamente utilizada en medicina forense, ya que es suficiente un cabello o bien una gota de sangre o de semen, para realizar la identificación precisa de individuos mediante huellas de DNA (2).

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida mundialmente por las siglas PCR, fue desarrollada a principios de la década de los 80 s.

Con la creación de la tecnología del DNA recombinante, se pudo avanzar hacia el estudio de genes que producen proteínas menos abundantes. Posteriormente, el advenimiento de la PCR revolucionó la biología molecular porque permitió el acceso fácil y rápido al estudio de los genes, especialmente de aquellos que se expresan en mucha menor proporción.

La PCR es una metodología que se basa en el principio de amplificar un fragmento de DNA en forma ilimitada en unas cuantas horas, lo que abre la posibilidad de estudiar cualquier gen. El poder de la PCR es tal que, además, ha permitido la identificación y estudios de genes de los que no se tenía evidencia de su existencia.

La PCR es una técnica que permite la síntesis *in vitro* de un fragmento de DNA de forma tal que, en cada ciclo del proceso, se duplica el número de moléculas. Es por esta razón que la PCR se ha convertido en una rama tan poderosa en la investigación. A este incremento geométrico en el número de copias de una secuencia en particular de DNA es lo que se denomina amplificar el DNA.

Para su realización se requiere de que los reactivos básicos sean expuestos a ciclos de cambios de temperatura que permitan la amplificación exponencial del DNA.

Estos ciclos se conocen como desnaturalización, hibridación y polimerización. Los reactivos básicos que se utilizan en una reacción de PCR son el molde de DNA del cual se quiere partir, los iniciadores que son necesarios para que la DNA polimerasa funcione, una mezcla de deoxinucleótidos (dGTP, dATP, dTTP, y dCTP), un amortiguador adecuado y la enzima que polimeriza al DNA.

La desnaturalización es el inicio de cada ciclo, para que la DNA polimerasa funcione se necesita que ambas cadenas de DNA se separen: A este proceso se le llama desnaturalización y se consigue al exponer a la doble cadena de DNA a altas temperaturas (94°C). Después de la desnaturalización sigue la hibridación, esta es la fase del ciclo que le confiere una alta especificidad a la PCR. Para que la DNA polimerasa inicie la síntesis de una nueva cadena de DNA, se requiere de un pequeño fragmento de DNA con secuencia antisentido que hibride a la cadena molde y sirva como sitio iniciador o de anclaje para la DNA polimerasa. A partir de una alícuota en la que existan miles de fragmentos diferentes de DNA, esta enzima iniciará la síntesis de una nueva cadena de DNA, únicamente en el sitio en el que se encuentre una de estas secuencias iniciadoras hibridadas a la cadena molde (de ahí el nombre de iniciadores). Para una reacción de PCR se utilizan dos iniciadores; uno que se hibridará con la hebra del DNA molde que tiene sentido 5' a 3' y el otro con la hebra 3' a 5'.

El tamaño del fragmento obtenido en la PCR será del número de bases que queden entre ambos iniciadores. El iniciador puede variar en el número de bases: mientras mayor sea el tamaño la especificidad será mayor.

Generalmente se utilizan iniciadores de 18 a 22 bases por que con este tamaño se considera poco probable que el iniciador encuentre dos sitios de unión en el genoma. Además, la especificidad se incrementa más aún al utilizar dos iniciadores de 22 bases cada uno.

La temperatura para la fase de hibridación varía según la longitud y secuencia de los iniciadores; en general esta temperatura se fija entre 42 y 60°C. Es importante utilizar la temperatura óptima para cada par de iniciadores para evitar la posibilidad de que se hibriden en lugares no específicos.

La tercera fase del ciclo es la polimerización, aquí es la fase en la que la DNA polimerasa agrega al iniciador las bases correspondientes a la cadena complementaria. Esta fase se lleva a cabo a 72 °C por ser la temperatura óptima de función de las DNA polimerasas termoestables. Al término de esta fase, una cadena doble de DNA se ha convertido en dos cadenas dobles de DNA (fig.3).

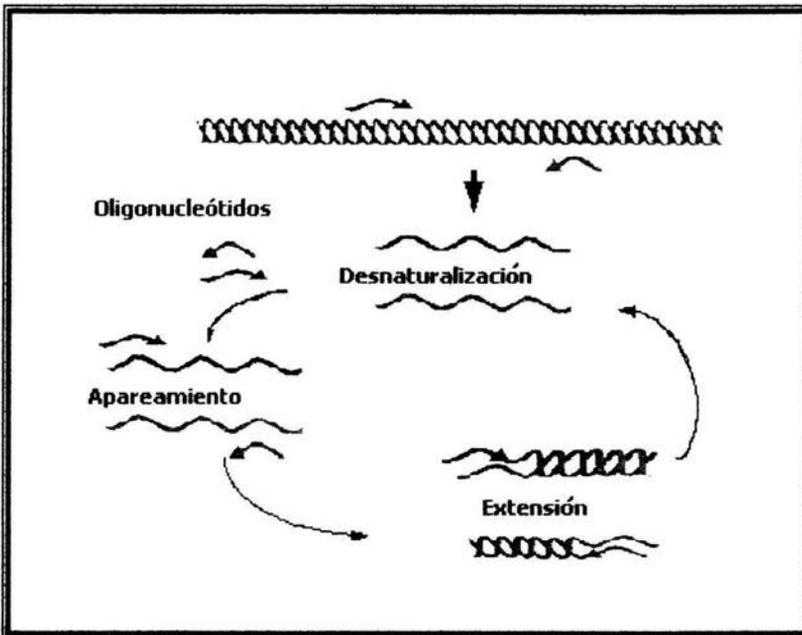


Figura 3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR consiste básicamente en repeticiones de estos ciclos en los que la amplificación de un fragmento específico de DNA se lleva a cabo en forma exponencial, con un crecimiento que será igual a 2^n , en donde n es el número de ciclos.

Una de las razones de por qué la PCR es tan útil es que este proceso de ciclaje térmico se lleva a cabo en forma automatizada gracias a máquinas conocidas como termocicladores que combinan un refrigerador con un calefactor, controlados con un microprocesador, en forma tal que pueden programarse la temperatura y el número de ciclos deseados (fig.4).

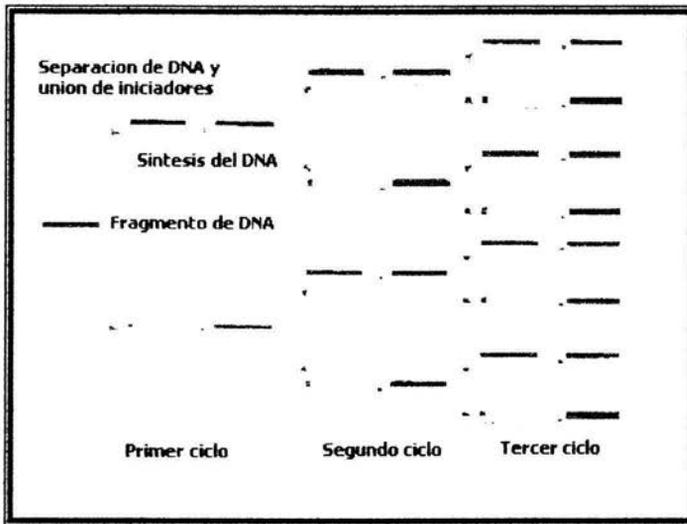


Figura 4. La PCR consiste en repeticiones de ciclos en los que la amplificación de un fragmento específico de DNA se lleva a cabo en forma exponencial, con un crecimiento que será igual a 2^n , en donde n es el número de ciclos.

El producto obtenido por PCR puede ser evaluado de varias formas. Lo primero es determinar que se obtuvo el fragmento de DNA y que es del tamaño apropiado. Cuando un investigador diseña iniciadores para PCR generalmente lo hace sobre secuencias conocidas, y por lo tanto, conoce la distancia que hay entre los dos iniciadores, y con esto, el tamaño del fragmento que deberá de obtener. Los productos de PCR se analizan en geles de acrilamida o agarosa, junto con un marcador de peso molecular y las bandas se visualizan con bromuro de etidio sobre un transiluminador de luz UV (4).

VIII.- DISTROFIAS MUSCULARES

Las distrofias musculares (DM) son un grupo de desórdenes primarios del músculo estriado que cursan con debilidad muscular progresiva (5). Este grupo de enfermedades muestra degeneración muscular en pruebas electrofisiológicas (patrón miopático), bioquímicas (elevación de creatinínfosfocinasa, CPK) e histopatológicas (cambios disróticos de la fibra muscular), algunos de estos padecimientos cursan con anomalías en otros órganos de la economía (6).

La severidad clínica varía ampliamente entre las diversas formas y aún dentro del mismo tipo de distrofia muscular (5,6).

Estos padecimientos son de las enfermedades hereditarias más frecuentes (5,7) y su herencia puede ser ligada al cromosoma X o autosómica (5,6). Dentro de las distrofias musculares ligadas al cromosoma X se encuentran la tipo Duchenne (DMD), Becker (DMB) y Emery-Dreifuss (6,8). Las primeras descripciones de esta enfermedad se hacen en la segunda mitad del siglo XIX por neurólogos franceses y alemanes. Se destacó entre ellos, por su detallada descripción, Duchenne de Boulogne, en la década de 1860 por quien la enfermedad recibe su nombre. Él describió una parálisis muscular pseudohipertrófica que aparece en niños y afecta fundamentalmente los músculos de miembros inferiores, lo que dificulta el cambio de postura de decúbito a la posición erecta y en la cual se observa un aumento considerable del volumen de las masas gemelares. Erb, en 1891, introdujo el término de distrofia muscular progresiva (9). La distrofia muscular de Becker (DMB) lleva su nombre en honor al médico alemán Peter Emil Becker, quien describió primero esta variante de DMD en la década de 1950. 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.5) pérdida de la deambulación antes de los 12 años y muerte alrededor de la segunda década de la vida, por inanición, infección respiratoria o fallo cardíaco. 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 ó 50 años. La diferencia entre 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 (6,7).

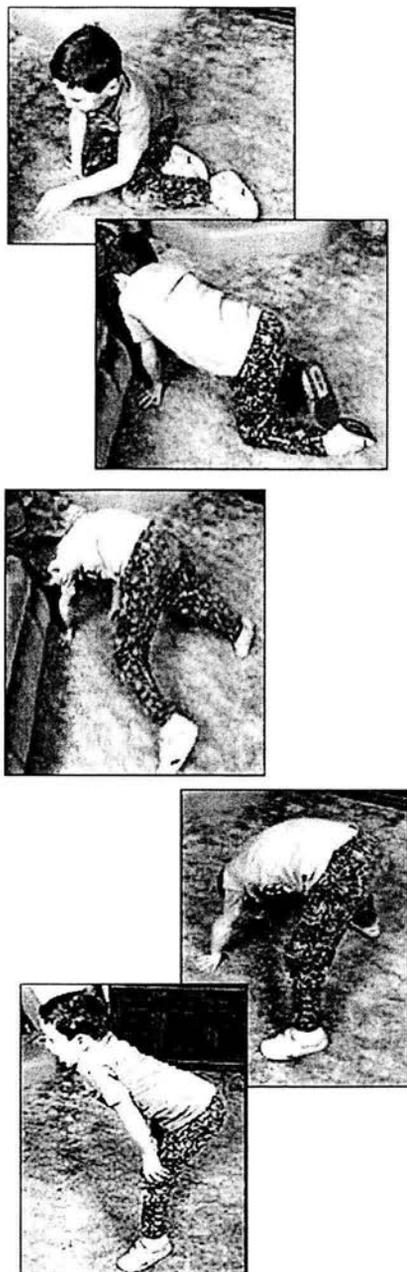


Figura 5. Signo de Gowers.

IX.- GENÉTICA DE LAS DMD/DMB

Las distrofias musculares tipos Duchenne (DMD) y Becker (DMB) son entidades alélicas que se heredan en forma recesiva ligada al cromosoma X (Xp21.2) (9,10). 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 (11,12). Aunque aún no esta claro, parece que la severidad de la enfermedad, y por ende su clasificación, dependen del tipo de mutación que se encuentre en el gen (13).

La incidencia mundial de la DMD es de 1 afectado por cada 3,500 varones nacidos vivos, mientras que la DMB es de 7.2 por 100,000 varones nacidos vivos (7,11). En la DMD los pacientes pierden la capacidad de deambular antes de los 12 años y generalmente fallecen alrededor de la 2ª década de la vida, por complicaciones cardiorrespiratorias. Los pacientes con DMB se caracterizan por quedar confinados a silla de ruedas después de los 15 años y con amplia variación del inicio, progresión y gravedad de los síntomas y en alguno de los casos pueden llevar un patrón de vida normal hasta los 40 ó 50 años.

X.- EL GEN DMD Y SU PRODUCTO: LA DISTROFINA

El gen responsable de esta enfermedad está localizado en el brazo corto del cromosoma X, región Xp21 y su aislamiento a finales de la década de los 80's ha permitido obtener valiosa información sobre su estructura y organización funcional (14,15).

Un hito importante en el camino que llevó al aislamiento del gen afectado en los pacientes con DMD, fue la descripción de un paciente con una delección citogenética en el Xp 21 y varias otras enfermedades diferentes asociadas, entre ellas, la retinopatía pigmentaria (16).

Ambas enfermedades se deben a mutaciones en el gen DMD, localizado en la banda mXp21.2 del cromosoma X (10,17). El gen DMD es el gen humano de mayor tamaño hasta ahora caracterizado. El gen consta de 2.3 Mb de ADN que dan lugar a un transcrito de 13 kb (18) y consta de 79 exones que representan menos del 1% de la longitud total del gen (19,20).

Este gen codifica para una proteína del citoesqueleto subsarcolémico denominada distrofina con un peso de 427 kDa (fig.6) (21,22) y se ha demostrado su presencia en distintos tejidos con sus isoformas específicas (23). Tiene un total de 3.685 aminoácidos y presenta una estructura repetitiva.

Las mutaciones responsables son en su mayoría deleciones parciales intragénicas (50-70%), aunque también se han caracterizado duplicaciones parciales intragénicas (6-8%) y de tipo puntual u otras (<30%). Para las dos primeras existen puntos calientes bien definidos en la región 5' (intron1) y central del gen (intrón 44) (24,25) y una importante característica del gen DMD es que la deleción es el defecto génico más frecuente (26), con incidencias de hasta el 70 % en algunas poblaciones estudiadas.

Estas deleciones son muy heterogéneas, tanto en su ubicación como en su longitud. Algunas involucran a todo el gen, mientras que en la mayoría de los casos es sólo una deleción parcial de tamaño variable, aunque con regiones *hot spot* en el gen (con mayor frecuencia de mutaciones) bien caracterizadas.

La caracterización de las deleciones en el gen DMD es de gran importancia para esclarecer la patogénesis de la enfermedad; no obstante, aunque se han realizado muchos estudios para tratar de correlacionar el tipo de deleción con el cuadro clínico de la DMD, no se ha podido establecer ninguna conclusión (27), con lo cual se ha demostrado la complejidad de la relación genotipo-fenotipo en esta enfermedad.

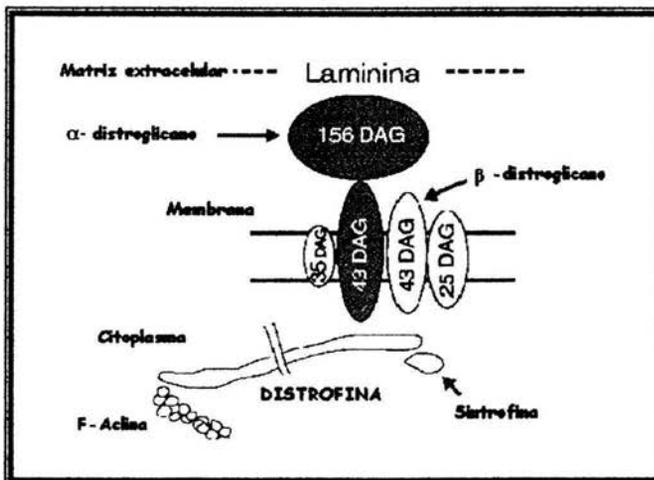


Figura 6 Citoesqueleto de la proteína denominada Distrofina.

XI.- ESTUDIOS MOLECULARES

Las deleciones pueden evidenciarse por estudios de Southern blot (7, 15, 25, 28, 29, 30, 31), PCR múltiple o análisis del transcrito por análisis del transcrito mediante reverso transcripción acoplada a PCR (RT-PCR) (31). Las duplicaciones se demuestran por Southern blot cuantitativo, PCR múltiple cuantitativo y RT-PCR. Las mutaciones de tipo puntual son difíciles de demostrar debido a que no se ha demostrado un punto caliente para la ocurrencia de estos eventos y por el gran tamaño del gen. La gravedad de las DMD y las DMB se fundamenta en el efecto que tenga la mutación responsable sobre el marco de lectura (hipótesis de Mónaco) y el dominio afectado, situaciones que se correlacionan con la presencia parcial (DMB) o ausencia (DMD) de distrofina en músculo estriado (32,33).

Con base en el análisis bayesiano, genética de poblaciones y mediciones de CPK sérica en madres de casos afectados, se ha descrito que las mutaciones "*de novo*" conforman una tercera parte en los casos. En la actualidad, sin embargo, diversos estudios han demostrado un comportamiento totalmente inverso. En un estudio previo realizado en 75 familias mexicanas con DMD/DMB por PCR múltiple cuantitativo se demostró un predominio (2/3 partes) de las mutaciones tipo deleción originadas "*de novo*", así como la misma frecuencia y distribución de deleciones parciales intragénicas demostradas por PCR múltiple con respecto a la literatura mundial (34).

XII.- 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 (6, 35). El alto índice de mutaciones durante la maduración de la línea germinal, propicia que dos terceras partes 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% y 60% de ser portadora de una mutación (10, 12, 36, 37, 38).

Recientemente existe una 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 (37, 38, 39, 40, 41).

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 (5, 6, 7, 42, 43, 44, 45). 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 el alelo de riesgo al realizar diagnóstico prenatal (30, 42, 46). A pesar de estos avances, con las sondas genómicas no se logró establecer una estrategia que sustituyera a los métodos tradicionales de diagnóstico (5, 6, 7, 47).

El análisis de distrofina por inmunoblot e inmunohistoquímica revelan en ocasiones diferentes comportamientos en portadoras (6, 42, 43, 44, 45, 47, 48).

XIII.-DIAGNÓSTICO PRENATAL

En la actualidad aún no se dispone de un tratamiento curativo y los esfuerzos a nivel mundial se enfocan al aspecto preventivo mediante la detección de portadoras y el diagnóstico prenatal e incluso a nivel de pre-implantación. La detección de portadoras mediante los métodos tradicionales de diagnóstico tales como la medición de CPK sérica o evaluación inmunohistoquímica en biopsia de músculo generan resultados inconsistentes y se consideran muy poco confiables (6, 8, 42, 43, 44, 45). Una vez asignado el estado de portadora, el embarazo puede ser monitoreado desde el primer trimestre de la gestación para toma de material biológico para estudio molecular, tales como vellosidades coriales (8-10 semanas de gestación, SDG) o amniocitos (14-16 SDG), en donde inicialmente se realiza la asignación del sexo del producto (citogenéticamente o por biología molecular) y si éste resulta complemento 46 XY, se busca en forma dirigida el alelo de riesgo mutado, ya sea por análisis de ligamiento o evidenciando directamente la mutación por otras estrategias (45). El método de PCR múltiple tiene una proporción muy baja de errores de diagnóstico, es muy versátil, rápido (en tan solo un día es posible analizar varios individuos) y barato.

Así mismo, las cantidades de DNA necesarias para el análisis son muy reducidas por lo que su aplicación es posible tanto en el diagnóstico postnatal como en el prenatal. Los métodos basados en análisis del DNA son los que brindan los resultados más consistentes (6, 7, 35, 49, 50).

XIV.- ANÁLISIS DE LIGAMIENTO

El abordaje para la detección de portadoras cuando se desconoce la mutación responsable, se basa en el análisis de ligamiento (tipo indirecto) utilizando marcadores intragénicos del tipo RFLPs, VNTR, y STRs, permitiendo un seguimiento del alelo mutado o en riesgo en la descendencia y en ocasiones fungiendo como un análisis de tipo directo evidenciando eventos de delección o duplicación en casos índice y/o portadoras (6, 7, 35). Existen tres limitantes importantes en la aplicación del análisis de ligamiento que es contar con una estructura familiar adecuada (familia extensa o casos familiares), la presencia de heterocigocidad (informatividad) en al menos un marcador en la madre del caso afectado y la presencia de un alto índice de recombinación intragénica que conduce a falsos positivos o negativos en la asignación o exclusión de las portadoras o del alelo de riesgo (7, 35). Este error se ha calculado en 5-10%, especialmente cuando se utiliza un número limitado de marcadores con distancias genéticas cercanas (<1cM). Este porcentaje de error puede solventarse utilizando marcadores ubicados a distancias superiores a 1 cM, es decir, localizados en la región 5', central y 3' del gen DMD (51).

JUSTIFICACIÓN

El campo de la genética en los últimos 30 años, ha trascendido en el diagnóstico de enfermedades hereditarias, especialmente las de carácter monogénico. Las DMD/DMB son entidades que aún no cuentan con tratamiento curativo, por lo que la prevención (diagnóstico de portadoras y prenatal) es un aspecto importante del asesoramiento genético. En México, la mayoría de los centros hospitalarios, persiste el uso de métodos tradicionales de detección de portadoras, que conllevan a un alto índice de error. El empleo de marcadores intragénicos permite identificar la segregación de alelos mutados (casos familiares) y/o de riesgo (casos únicos) en familias con estas enfermedades y puede solventar el problema de no tener una mutación caracterizada, Así mismo esta estrategia puede ser empleada en el diagnóstico prenatal.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la utilidad del análisis del marcador tipo RFLP PERT87.15/xmnl en la asignación del estado de portadoras en familias con y sin antecedentes de casos afectados de DMD/DMB que acuden al Instituto Nacional de Pediatría, S.S y que son canalizadas al departamento de Biología Molecular.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la frecuencia del polimorfismo PERT87.15/xmnl mediante las frecuencias alélicas.
2. Determinar la frecuencia de mutaciones *de novo* mediante la presencia del mismo alelo de riesgo en madres y hermanas.
3. Detectar a las portadoras de las distrofias musculares de Duchenne y Becker mediante análisis de ligamiento por PCR/RFLPs utilizando el marcador intragénico de la región 5' del gen DMD (PERT 87.15/xmnl).

HIPÓTESIS

Si se detectan a las portadoras de las familias con y sin antecedentes de Distrofia Muscular de Duchenne y Becker mediante análisis de ligamiento por PCR/RFLPs utilizando el marcador intragénico de la región 5' del gen DMD (PERT 87.15/xmnl), entonces se podrá determinar la utilidad del marcador, dando un asesoramiento genético adecuado.

MATERIAL Y MÉTODOS

a) Población objetivo.

Se analizaron a 104 familias con al menos un paciente afectado de DMD o DMB y su madre, no emparentados entre sí (103 pacientes masculinos con DMD, DMB, una mujer portadora con hermano fallecido a causa de DMB). Se incluyeron en el estudio, a los familiares femeninos y masculinos en 1er. y 2o. grado.

b) Creación del banco de DNA.

A todos los integrantes se les realizó extracción fenólica, cuantificación y valoración de la integridad del DNA genómico a partir de sangre periférica, mediante la técnica fenol-cloroformo.

Se obtuvieron 7-15 ml de sangre periférica en tubos vacutainer con EDTA, los leucocitos se separaron por centrifugación a 2500-3000 rpm, se lavaron con amortiguador para células rojas (RCLB, el cual contiene TRIS pH 7.6, 10 milimolar y 121.14, MgCl₂ 1 milimolar y NaCl 10 milimolar) y se lisaron con proteinasa K 200 microgramos/ mililitro. Se eliminaron las proteínas por extracción fenólica y el exceso de fenol fue retirado con dos lavados de cloroformo: Alcohol 24:1. El DNA se precipitó con NaCl al 1 molar y etanol a menos 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 260nm mediante la siguiente fórmula:

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

donde:

DO₂₆₀: Densidad óptica a una λ de 260 nm.

F: Constante equivalente a 0.05 (1 D.O.)= 5 µg de DNA

Factor de dilución: Equivalente a 1:250 µl.

El criterio de pureza de fenol (lectura 240 nm) y proteínas (lectura 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 el estudio. La integridad del DNA se evaluó en electroforesis en gel de agarosa al 0.7% a 100 V por 30 minutos.

Posteriormente se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en un trasiluminador con luz UV.

La integridad del DNA se consideró óptima cuando se observó una banda nítida de alto peso molecular (> 23 kb del marcador de pesos moleculares fago λ /HindI).

c) Análisis del marcador tipo RFLP PERT87.15/xmnl (46).

La amplificación y subsiguiente restricción del polimorfismo pERT87.15/Xmnl, se realizó bajo las siguientes condiciones:

Se colocaron 250 ng del DNA genómico de cada integrante en un microtubo para PCR con los siguientes reactivos:

Oligos:

R: 0.2 micromoles. CTG ATG AAC AAT TTC CCT TTC ATT CCA G

F: 0.2 micromoles. GAC TGG AGC AAG GGT CGC C

| | |
|----------------------------------|--------------------------------|
| Bases (dNTPs): | 250 micromolar |
| Buffer de PCR: | 5 microlitros |
| MgCl ₂ (25 mM): | 3.5 microlitros |
| Taq polimerasa Gold (5UI/ul): | 0.25 microlitros (1.5 UI) |
| DNA genómico (0.1-1 microgramo): | 0.2 microlitros |
| Agua bidestilada: | cbp 50 microlitros de reacción |

Una vez colocados todos los componentes en la mezcla maestra, se agitó brevemente en vórtex y centrifugó para bajar toda la mezcla.

Se repartieron 47 microlitros a cada uno de los microtubos de pared delgada para PCR de 0.6 ml.

Se agregó a cada tubo (a excepción del tubo negativo) el DNA genómico, tanto de las familias, como de controles con genotipos conocidos (X_1 , X_1/X_2 , X_2/X_2).

Se agitó brevemente en vórtex cada uno de los microtubos. Dar un spin.

Se agregó a cada microtubo aceite mineral grado molecular.

Se centrifugó de 10-30 seg. Velocidad máxima.

Se colocaron las muestras en el termociclador 480.

Se amplificó bajo los siguientes parámetros:

95°C 10 minutos (desnaturalización inicial)

| | |
|-----------|----------------------------------------------|
| 95°C | 50 segundos |
| 30 ciclos | 55°C 1 minuto |
| 68°C | 3 minutos con incremento de 4 seg cada ciclo |
| 68°C | 7 minutos (elongación final) |
| 4°C | 5 minutos. |

En un gel de agarosa al 3% (agarosa 1.5 en 50 ml de TBE 1X y 100 microlitros de bromuro de etidio para geles de agarosa 1mcg/ml), se colocó en cada pozo 20 microlitros de amplificado más 3 microlitros del acarreados (xilen-cianol, azul de bromofenos y glicerol) de cada una de las muestras.

Se corrió de manera paralela un marcador de pesos moleculares (escalera de 100pb).

Se corrió a 160 volts por 30 minutos.

Se visualizó con luz UV y se obtuvo registro fotográfico.

Se verificó la presencia del amplificado por corrimiento en gel de agarosa al 3% con bromuro de etidio, para posteriormente restringirse con la enzima respectiva, utilizando 5 UI de enzima endonucleasa de restricción XmnI y el buffer recomendado por el fabricante, a una temperatura de 37°C. La restricción fue de 12 horas.

Mediante el corrimiento de geles de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio (150 volts, 40 minutos) y visualización con UV, se asignaron los alelos esperados (sistema bialélico X₁ y X₂).

d) Determinación de frecuencias alélicas, índice de heterocigocidad (informatividad).

Las frecuencias alélicas de este marcador se obtuvieron a partir de la totalidad de los alelos maternos y paternos, pues son individuos no relacionados. Con ello el presente trabajo dio a conocer la distribución de los alelos xmnI en esta muestra.

Se obtuvo el índice de heterocigocidad en la totalidad de las madres de los casos índice.

Posteriormente, se procedió a obtener la proporción de familias, donde el marcador fue de utilidad para brindar un asesoramiento genético de certeza, y con ello la posibilidad de definir si la mutación presente en el caso índice fue heredada como evento *de novo* o de una madre portadora.

RESULTADOS**1. DISTRIBUCIÓN DE FAMILIAS CON CASOS ÚNICOS, CON ANTECEDENTES HEREDOFAMILIARES Y DESCONOCEN SUS ANTECEDENTES.**

Total de familias analizadas = 104

Casos únicos = 71

Casos familiares = 30

Desconocen = 3



Fig. 7. Representación gráfica de todas las familias.

De las 104 familias analizadas se observa que 71 familias pertenecen a los casos únicos, este número es alto debido a que se debe principalmente a las mutaciones de novo esto se comprobó mediante estudios moleculares, que se realizan para detectar a las madres heterocigotas (informativas), confirmó que 42 madres sin antecedentes heredofamiliares, no presentaron el mismo alelo de riesgo que su hijo, (ver fig.11), esto se confirma también por que se incluyen a las hermanas y ninguna de ellas lo presentó. El número de familias con casos familiares es de 30, lo cual se debe a que se heredó por una madre portadora y solo 3 familias desconocen sus antecedentes heredofamiliares.

2. DISTRIBUCIÓN DE FAMILIAS CON DMD,DMB, DMD/DMB

Total de pacientes = 104

Total de pacientes con DMD = 80 → x x= 76.9230%

Total de pacientes con DMB = 21 → x x= 20.1923%

Fenotipo intermedio (DMD/DMB) = 2 →x x= 1.9230%

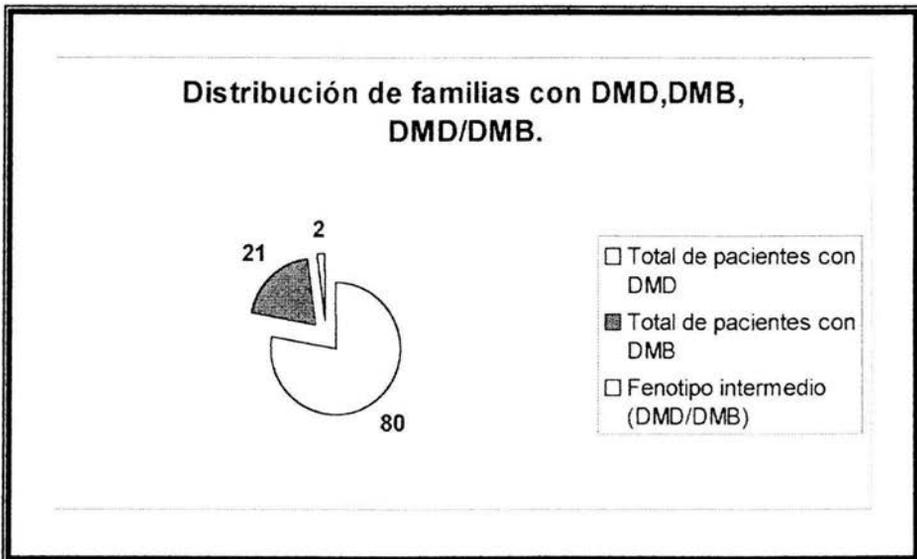


Fig. 8. Distribución de familias con DMD, DMB y DMD/DMB.

Del total de las 104 familias, 80 familias presentan casos con DMD, esto debido a que se detecta a más temprana edad y también a que llegan familias que ya conocen sus antecedentes heredofamiliares (30 casos familiares, ver fig. 7), mientras que la DMB se manifiesta a una edad más tardía y quedan a veces incluidas en otras enfermedades, antes de ser canalizados al departamento de Biología Molecular, nuestros resultados muestran a 21 familias con este caso y sólo 2 familias con fenotipo intermedio.

3. FRECUENCIAS ALÉLICAS:

| | |
|-----------|---------|
| Madres | Padres |
| $X_1=96$ | $X_1=9$ |
| $X_2=112$ | $X_2=5$ |

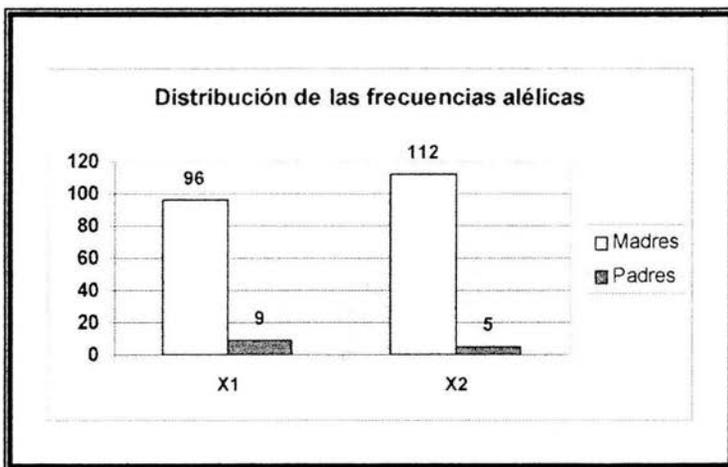


Fig. 9. Gráfica que muestra la distribución de las frecuencias alélicas.

| | | |
|--------------------------|-----------|--------------------------|
| Madres $X_1=96$ | $X_2=112$ | 105 |
| + | + | + |
| Padres $X_1=9$ | $X_2=5$ | 117 |
| --- | --- | --- |
| 105 | 117 | 222 |
| 222 → 100% | | 222 → 100% |
| 105 → X_1 | | 117 → X_2 |
| $X_1 = 47.30\%$ ó 0.4730 | | $X_2 = 52.70\%$ ó 0.5270 |

Aquí se observa el total alelos de madres ($n=208$) y padres ($n=14$) no emparentados incluidos en el estudio, estos se determinan mediante el uso del marcador PERT 87.15/xmnl en corrimiento de geles de agarosa donde el sitio de corte para X_1 es de 740 pb y para X_2 es de 520/220 pb (ver fig. 12).

PRUEBA ESTADÍSTICA

$n = 222$ alelos

$$\hat{\Lambda}$$

$$X_1 = P = 105 / 222$$

$$H_0 = \pi = 0.50 \quad \Rightarrow \quad X_1 = X_2$$

$$H_a = \pi = 0.50$$

$$Z_c = \frac{105/222 - 0.50}{\sqrt{\frac{\pi_0 (1 - \pi_0)}{n}}}$$

$$Z_c = \frac{105/222 - 0.50}{\sqrt{\frac{(0.50)(0.50)}{222}}}$$

$$Z_c = -0.8054$$

H_0 no se rechaza por lo cual con el 5% de significancia no hay evidencia estadística de que $X_1 \neq X_2$.

Se aplicó la prueba estadística para determinar la diferencia entre las frecuencias alélicas (X_1 , X_2), encontrándose que no hay evidencia estadística de que X_1 sea diferente de X_2 , con un 5% de significancia. Esto nos indica que los dos alelos se presentan de igual manera debido a que no se cuenta con un cuadro familiar completo.

4. FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS EN DIFERENTES POBLACIONES.

Tabla 2.

| POBLACIÓN | X ₁ (%) | X ₂ (%) |
|---------------|--------------------|--------------------|
| Chinos | 123/206 (0.60) | 83/206 (0.40) |
| Gales | (no esp.) 0.32 | (no esp.) 0.68 |
| Japoneses | 93/170 (0.55) | 77/170 (0.45) |
| Ingleses | ND | ND |
| Caucásicos | <75 (0.32) | <75 (0.68) |
| Hindúes | ND | ND |
| Nigerianos | ND | ND |
| Turcos | 32/122 (0.26) | 80/122 (0.74) |
| Mexicanos (*) | 105/222 (0.4729) | 117/222 (0.5270) |

(*) El presente estudio.

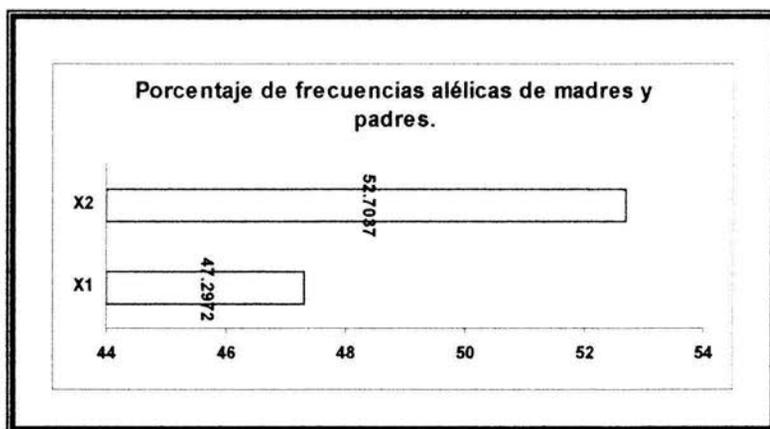


Fig.10 La frecuencia de los alelos para pERT87.15/Xmnl fueron para X₁ = 0.472972 y para X₂ = 0.527027

Nuestros resultados se comportan de manera diferente comparándolos con otras poblaciones, debido a que nuestro número de alelos es mayor (n=222), esto se ve en el número de alelos de X₁ y X₂ (ver tabla 2). También se debe a que nuestras familias incluidas en el estudio no están completas, esto influye en el total de las frecuencias alélicas ya que se toman en cuenta todos los alelos de madres y padres.

5. ÍNDICE DE HETEROCIGOCIDAD

De las 104 madres estudiadas, encontramos que el 50% (n=52) fueron heterocigotas y el 50% (n=52) fueron homocigotas para el polimorfismo X.

| | | |
|---------------------------|------------|--------|
| Madres homocigotas = 52 | 104 → 100% | X= 50% |
| + | | |
| Madres heterocigotas = 52 | 52 → X | |
| ----- | | |
| 104 | | |

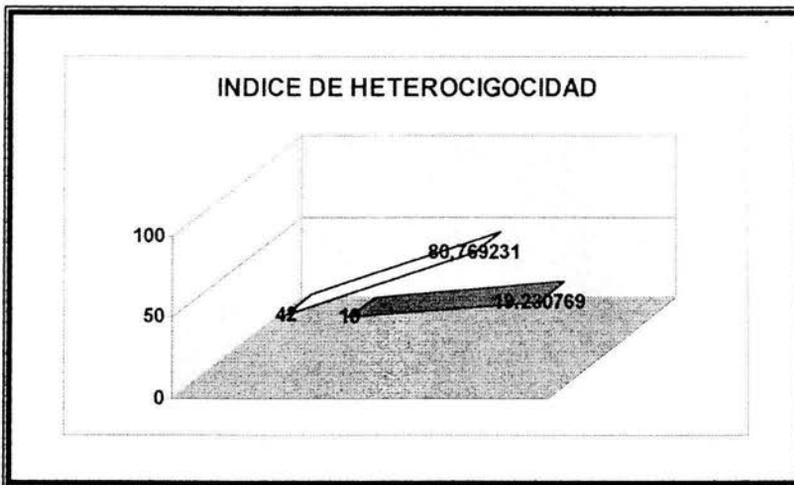


Fig. 11. Distribución de las 52 madres heterocigotas .

Aquí hay que resaltar el índice de heterocigocidad, ya que las madres heterocigotas son las más importantes debido a que son informativas, dentro de las 52 madres, 42 de ellas son casos índice sin antecedentes familiares lo cual representa el 80.76%, esto sugiere que se debe principalmente a mutaciones de novo, y 10 madres son casos índice con antecedentes familiares y representan el 19.24%, solo a ellas se les da el asesoramiento genético ya que son portadoras, lo cual no sirve de mucho ya que no se puede asignar el estado de portadoras al otro 50% de las madres por ser homocigotas, por lo cual deberían utilizarse otros marcadores para tener más certeza en esta determinación.

Para analizar la eficacia del marcador tipo RFLP PERT87.15/xmnl se procedió a identificar la frecuencia de madres heterocigotas (informativas). El producto para estudiar el polimorfismo X es de 740 pb, cuyo polimorfismo se evidencia con la ausencia (fragmento de 740 pb) o presencia para el sitio de corte por la enzima Xmnl (2 fragmentos con pesos de 520 y otro de 220 pb). Este procedimiento nos indica como asignar el estado de portadoras.

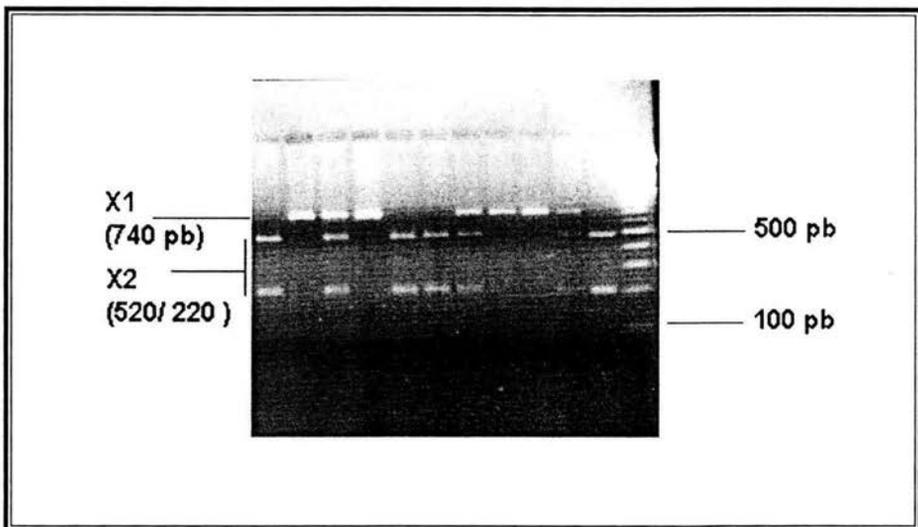


Fig.12 Muestra de gel de agarosa donde se observa que X₁ tiene un fragmento de 740 pb y X₂ tiene dos fragmentos con pesos de 520 y 220 pb.

DISCUSIÓN

Los estudios moleculares que han permitido el conocimiento de los genes y sus productos abrieron un camino importante para el tratamiento de los padecimientos genéticos. Para padecimientos hereditarios, como lo es el presente trabajo, donde la Distrofia Muscular de Duchenne y Becker (DMD/DMB) tienen ese comportamiento, con un patrón de herencia recesivo ligado al cromosoma X.

Es de gran valor conocer la frecuencia de polimorfismos en una población determinada para definir que estrategia se establecerá para prevenir la enfermedad (9,10). En aquellas poblaciones con alta incidencia de deleciones es recomendable, desde el punto de vista técnico y económico, implantar una estrategia para el diagnóstico prenatal y de portadoras, basada principalmente en la detección de deleciones (10,12,36,37,38). No obstante, la heterogeneidad de las deleciones antes mencionadas es una desventaja para su aplicación rutinaria, pues la detección del 100 % de las deleciones exige realizar un considerable número de reacciones, lo cual aumenta extraordinariamente el costo del análisis, esto resalta la importancia de este trabajo ya que es imprescindible el conocimiento de las portadoras para dar un asesoramiento genético adecuado. El trabajo realizado se basó principalmente en el conocimiento del historial clínico de las familias para incluirlas en el estudio ya que estas se canalizan al departamento de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría para que se les pueda dar un asesoramiento genético adecuado, además de tratamientos y rehabilitación ya que no hay un tratamiento curativo para la enfermedad. 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, la cual sirve para detectar reordenamientos estructurales discretos, ya que es la técnica por excelencia para detectar deleciones (2); debido a su sencillez, bajo costo y sensibilidad, entre otras ventajas.

A todas las familias y a sus integrantes se les hizo análisis de ligamiento por PCR/RFLPs utilizando el marcador intragénico de la región 5' del gen DMD (PERT 87.15/xmnl), para detectar portadoras principalmente, determinar las frecuencias alélicas (polimorfismo PERT87.15/xmnl) y determinar las frecuencias de mutaciones de novo.

El análisis molecular del gen DMD ha revelado que hay un número importante de mutaciones, en nuestro trabajo se observó que la mayoría de los casos ocurrieron por mutación; esto se comprobó al realizar los análisis moleculares ya que 42 madres heterocigotas sin antecedentes heredofamiliares (ver fig.12), no presentaron el mismo alelo de riesgo que su hijo, esto se confirma también por que se incluyen a las hermanas y ninguna de ellas lo presentó, hay que tomar en cuenta que al realizar este tipo de análisis se incluyen en él al marcador, uno o dos testigos con alelos conocidos, a los integrantes de la familia y también un blanco, para que no haya error en la interpretación (24,25).

De las 104 familias analizadas se observa que 71 familias pertenecen a los casos únicos, este número es alto ya que al realizar los estudios moleculares se detectan a las madres heterocigotas (informativas) y también se toman en cuenta a las hermanas si es que el cuadro familiar esta completo, lo cual confirma que solo 42 madres heterocigotas sin antecedentes heredofamiliares, sus hijos presentan la enfermedad pero esto se debe principalmente a las mutaciones de novo (ver fig.11). El número de familias con casos familiares es de 30, lo cual se debe a que se heredó por una madre portadora y solo 3 familias desconocen sus antecedentes heredofamiliares.

De las 104 familias incluidas en este estudio 80 presentaron DMD, debido a que la DMD se presenta a muy temprana edad y es fácil de detectar por los padres, ya que sus hijos no caminan muy rápido, se caen fácilmente, les cuesta trabajo ponerse de pie y suben las escaleras a gatas, lo cual indica un descontrol en su desarrollo, por lo cual acuden a la consulta médica, 21 familias presentaron DMB, esto se debe a que la enfermedad se manifiesta a una edad más larga, por lo cual es más difícil de detectar y quedan a veces incluidos en otras enfermedades, ya que ambas manifestaciones presentan un patrón de herencia recesivo ligado al cromosoma X las familias también acuden por antecedentes heredofamiliares. Solo 2 familias presentan cuadro intermedio DMD/DMB (ver fig.8).

Dentro de las frecuencias alélicas nos encontramos con un problema ya que no podemos determinar con exactitud cual de los dos alelos se presenta con mayor frecuencia, aquí se incluyen todos los alelos de las madres y los padres, pero como no siempre se cuenta con el cuadro familiar adecuado, es decir, mamá, papá, hermanas, hermanos; las frecuencias alélicas no presentan ninguna diferencia ya que el comportamiento de X_1 no es diferente de X_2 con un 5% de significancia, esto se comprobó aplicando una prueba estadística de probabilidad (valor Z).

El análisis molecular del gen DMD ha revelado que hay un número importante de mutaciones, en nuestro trabajo se observó que la mayoría de los casos ocurrieron por mutación; esto se comprobó al realizar los análisis moleculares ya que 42 madres heterocigotas sin antecedentes heredofamiliares (ver fig.12), no presentaron el mismo alelo de riesgo que su hijo, esto se confirma también por que se incluyen a las hermanas y ninguna de ellas lo presentó, hay que tomar en cuenta que al realizar este tipo de análisis se incluyen en él al marcador, uno o dos testigos con alelos conocidos, a los integrantes de la familia y también un blanco, para que no haya error en la interpretación (24,25).

De las 104 familias analizadas se observa que 71 familias pertenecen a los casos únicos, este número es alto ya que al realizar los estudios moleculares se detectan a las madres heterocigotas (informativas) y también se toman en cuenta a las hermanas si es que el cuadro familiar esta completo, lo cual confirma que solo 42 madres heterocigotas sin antecedentes heredofamiliares, sus hijos presentan la enfermedad pero esto se debe principalmente a las mutaciones de novo (ver fig.11). El número de familias con casos familiares es de 30, lo cual se debe a que se heredó por una madre portadora y solo 3 familias desconocen sus antecedentes heredofamiliares.

De las 104 familias incluidas en este estudio 80 presentaron DMD, debido a que la DMD se presenta a muy temprana edad y es fácil de detectar por los padres, ya que sus hijos no caminan muy rápido, se caen fácilmente, les cuesta trabajo ponerse de pie y suben las escaleras a gatas, lo cual indica un descontrol en su desarrollo, por lo cual acuden a la consulta médica, 21 familias presentaron DMB, esto se debe a que la enfermedad se manifiesta a una edad más larga, por lo cual es más difícil de detectar y quedan a veces incluidos en otras enfermedades, ya que ambas manifestaciones presentan un patrón de herencia recesivo ligado al cromosoma X las familias también acuden por antecedentes heredofamiliares. Solo 2 familias presentan cuadro intermedio DMD/DMB (ver fig.8).

Dentro de las frecuencias alélicas nos encontramos con un problema ya que no podemos determinar con exactitud cual de los dos alelos se presenta con mayor frecuencia, aquí se incluyen todos los alelos de las madres y los padres, pero como no siempre se cuenta con el cuadro familiar adecuado, es decir, mamá, papá, hermanas, hermanos; las frecuencias alélicas no presentan ninguna diferencia ya que el comportamiento de X_1 no es diferente de X_2 con un 5% de significancia, esto se comprobó aplicando una prueba estadística de probabilidad (valor Z).

Comparando nuestros resultados con otras poblaciones, observamos que se comportan de manera diferente, debido a que nuestro número de alelos es mayor ($n=222$), esto se ve en el número de alelos de X_1 y X_2 (ver tabla 2). También se debe a que nuestras familias incluidas en el estudio no están completas, esto influye en el total de las frecuencias alélicas ya que se toman en cuenta todos los alelos de madres y padres.

Dentro del índice de heterocigocidad, hay que resaltar que las madres heterocigotas son las más importantes debido a que son informativas, dentro de las 52 madres, 42 de ellas son casos índice sin antecedentes familiares lo cual representa el 80.76%, esto sugiere que se debe principalmente a mutaciones de novo, y 10 madres son casos índice con antecedentes familiares y representan el 19.24%, solo a ellas se les da el asesoramiento genético ya que son portadoras, lo cual no sirve de mucho ya que no se puede asignar el estado de portadoras al otro 50% de las madres por ser homocigotas, por lo cual deberían utilizarse otros marcadores para tener más certeza en esta determinación.

Las deleciones que causan una pérdida total del producto génico presentan una manifestación clínica mucho más grave (Duchenne) que aquellas que respetando la pauta de lectura, dan lugar a la síntesis de una proteína anómala (Becker). La caracterización de las deleciones en el gen DMD es de gran importancia para esclarecer la patogénesis de la enfermedad; no obstante, aunque se han realizado muchos estudios para tratar de correlacionar el tipo de deleción con el cuadro clínico de la DMD, no se ha podido establecer ninguna conclusión, con lo cual se ha demostrado la complejidad de la relación genotipo-fenotipo en esta enfermedad (27).

Las DMD/DMB son entidades que aún no cuentan con tratamiento curativo, por lo que la prevención (diagnóstico de portadoras y prenatal) es un aspecto importante del asesoramiento genético. En México, la mayoría de los centros hospitalarios, persiste el uso de métodos tradicionales de detección de portadoras, que conllevan a un alto índice de error, lo cual resalta la importancia de este trabajo ya que nos ayuda a detectar a las portadoras y determinar el tratamiento genético adecuado, además de rehabilitación.

CONCLUSIONES

1. La utilidad del RFLP para el asesoramiento genético fue limitada debido a la alta frecuencia de mutaciones de novo en los casos únicos en nuestras familias, además de que el 50% de las madres (n=52) son homocigotas y no podemos determinar si son portadoras o no de la enfermedad.
2. Se determinó la frecuencia de polimorfismos mediante el uso del marcador PERT 87.15/Xmnl, donde se obtuvo el total de alelos de madres (n=208) y padres (n=14) no emparentados incluidos en el estudio. Se aplicó la prueba estadística para conocer la distribución de los alelos (X_1 , X_2), encontrándose que no hay evidencia estadística de que X_1 sea diferente de X_2 , con un 5% de significancia. Esto nos indica que los dos alelos se presentan de igual manera debido a que no se cuenta con un cuadro familiar completo.
3. El marcador PERT 87.15/Xmnl se debe utilizar junto con otros marcadores; para obtener mejores resultados y poder dar un asesoramiento genético adecuado, ya que la enzima que se utiliza solo se presencia para el sitio de corte.
4. La mayoría de las familias que acuden al Instituto Nacional de Pediatría y son canalizadas al departamento de Biología Molecular presentan DMD debido a que se detecta a muy temprana edad, a diferencia de DMB.
5. Nuestros resultados muestran un comportamiento diferente comparándolos con otras poblaciones, debido a que nuestro número de alelos es mayor (n=222). También se debe a que nuestras familias incluidas en el estudio no están completas, esto influye en el total de las frecuencias alélicas ya que se toman en cuenta todos los alelos de madres y padres.
6. Las mutaciones de novo son las más representativas debido a que la mayoría de las madres heterocigotas (informativas) no presentan el alelo de riesgo que tiene su hijo.

COMENTARIOS FINALES

- ✓ Al no haber un tratamiento curativo para la enfermedad, se sugiere combinar más marcadores para tener el conocimiento exacto de las deleciones y así asignar con toda exactitud el estado de portadoras ya que es de vital importancia como método preventivo.
- ✓ Cuando no se tiene un cuadro familiar completo, es indispensable darles a conocer la importancia de incluir a todos los miembros de la familia para que su estudio tenga más precisión en el diagnóstico y poder ofrecerles asesoramiento genético, tratamiento médico o rehabilitación.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFÍA

1. Moreno,G.; Gamba, G. Biología molecular en medicina. Estructura molecular del gen. Rev. Invest. Clin. 1996; 48:81-84.
2. Cervantes, P.A. y cols. Aplicación de las técnicas de biología molecular en el estudio del genoma humano y en el diagnóstico de las enfermedades hereditarias. Revista Médica del Hospital General de México. 1997; 60(4):196-205.
3. Merino, A.; Gamba, G. Biología molecular en medicina. Enzimas de restricción. Rev. Invest. Clin. 1996; 48:159-163.
4. Bobadilla, N. y Gamba, G. Biología molecular en medicina. Reacción en cadena de la polimerasa. Rev.Invet.Clin.1996; 48:401-406.
5. Scriver, Ch.; Beaudet, A.; y Sly, W. (editors). The metabolic and molecular basis of inherited disease. In: The X-linked muscular dystrophies. Part. 19, Chap. 140. Vol. III. 7 h. Ed. McGraw Hill Inc. 1995.
6. Bushby, K.M. The muscular dystrophies. Bailliere's Clin. Neurol.1994; 3(2):407-430.
7. Holmgren, J.; Reyes, J.; Colombo, M.; Blanco, M. Duchenne and Becker muscular dystrophy in Chile. Rev. Med. Chil. 1992; 120:88-92.
8. Emery and Rimoin's. 1997. Principles and practice of Medical Genetics. 3° ed. Vol.II. Ed. Churchill Livingstone, E.U. p.p. 2337-2350.
9. Hidalgo PC. Bases moleculares de las distrofias musculares ligadas al cromosoma X: Duchenne y Becker. Inicio de una nueva época en la medicina. Medicentro 1989;4(2):254-7.

10. Worton, R. and Burghes, A. Molecular genetics of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Int. Rev. Neurobiol.* 1988; 22:601-612.
11. Mostaccioulo, M.; Lombardi, A.; Cambisa, V.; Danieli, G.; Angelini, C. Population data on benign and severe forms of X-linked muscular dystrophy. *Hum. Genet.* 1987; 75:217-223.
12. Worton, R. and Thompson, M. Genetics of Duchenne muscular dystrophy. *Annu. Rev. Genet.* 1988; 22:601-622.
13. 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.
14. Davies MD, Pearson PL, Herper PS. Linkage analysis of two cloned DNA sequences flanking the Duchenne muscular dystrophy locus on the short arm of the human x-chromosome, *Nucleic Acids Res* 1983;11:2303-12.
15. Koenig, M.; Hoffman, E.; Bertelson, C. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987; 50:509-517.
16. Francke U. Congenital adrenal hypoplasia, myopathy, and glycerol kinase deficiency: molecular genetic evidence for deletions. *Am J Hum Genet* 1987;40:212-27.
17. Lindolf, M.; Kiuru, A.; Kaariainen, H.; Kalimo, H.; Lang, H.; Pihko, H.; Rapola, J.; Somer, M.; Savontaus, M. de la Chapelle, A. Gene deletions in X-linked muscular dystrophy. *Am. J. Human. Genet.* 1989; 44:496-503.
18. Den Dunnen, J. Reconstruction of the 2.4 Mb human DMD gene by homologous YAC recombination. *Hum. Mol. Genet.* 1992; 12:474-482.

19. Roberts, R.; Coffey, A.; Bobrow, M.; Bentley, D. Exon structure of the human dystrophin gene. *Genomics* 1993; 16:536-538.
20. Den Dunnen, J.; Grooschoten, P.; Bakker, E.; Blondin, L.; Ginjaar, H.; Wapenaar, M.; van Paassen, H.; van Broeckhoven, C.; Pearson, P.; van Ommen, G. 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; 45:835-847.
21. Ahn, A.; Kunkel, L. The structural and functional diversity of dystrophin. *Nature Genet.* 1993; 3:283-291.
22. Hoffman, EP; Brown, RH; Kunkel, LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987; 51:919-928.
23. Miyatake, M; Miike, T; Zhao, JE; Yoshiaka, K; Uchino, M; Usuku, G. Dystrophin: localization and presumed function. *Muscle Nerve* 1991; 14:113-119.
24. Blondin, L.; Grooschoten, P.; Den Dunnen, J.; 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; 10:631-643.
25. Kochling, S.; Den Dunnen, J.; Dwoniczak, B.; Horst, J. Two polymorphic dinucleotide repeats in intron 44 of the dystrophin gene. *Hum. Genet.* 1995; 95:475-477.
26. Den Dunnen, JT. Direct detection of more than 50% of the Duchenne muscular dystrophy mutations by fields inversion gels. *Nature* 1987; 329:640-642.

27. Norman, AM; Thomas, NST; Kingston, HM; Harper, PS. Becker muscular dystrophy: correlation of deletion type with clinical severity. *J Med Genet* 1990; 27:236-239.
28. 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; 92:237-243.
29. Cross, G.; Speer, A.; Rosenthal, A.; Forrest, S.; Edwards, Y.; Flint, T.; Hill, D.; Davies, K. Deletions on fetal and adult muscle cDNA in Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. *EMBO J.* 1987; 6:3277-3283.
30. Prior, T.; Friedman, K.; Highsmith, W.; Perry, T.; Silvermann, L.; Molecular probe protocol for determining carrier status in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Clin. Chem.* 1990; 36:441-445.
31. Roberts, R.; Barby, T.; Manners, E.; Bobrow, M.; Bentley, D. Direct detection of dystrophin gene rearrangements by analysis of dystrophin mRNA in peripheral blood lymphocytes. *Am. J. Hum. Genet.* 1991; 49:298-307.
32. Campbell, K. Three muscular dystrophies: Loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 1995; 80:675-679.
33. Monaco, A.; Bertelson, C.; Liechi-Gallati, S. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 1989; 2:90-95.
34. Alcántara MA, Villarreal MT, Del Castillo V, Gutiérrez G, Saldaña Y, Maulen I, Lee R, Macías M and Orozco L. High frequency of *de novo* deletions in mexican Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. Implications for genetic counseling. *Clin. Genet.* 1999; 55:376-80.

35. Laing, N. Molecular genetics and genetic counseling for Duchenne/becker muscular dystrophy. *Mol. Cell. Biol. Hum. Dis. Ser.* 1993; 3:37-84.
36. Edwards, JH. The population genetics of DMD: natural and artificial selection in Duchenne muscular dystrophy. *J. Med. Genet.* 1986; 23: 521-532.
37. 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; va Broeckhoven,C; Junien, C; Muller, CR; Grimm, T. Estimation of the male and female mutation rates in Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Hum. Genet.* 1992; 89:204-218.
38. Barbujani, G; Russo, A; Danieli, GA; Spiegler, AW; Borkowsks, J; Petruszewicz, IH. Segregation analysis of 1885 DMD families: Significant departure from the expected proportion of sporadic cases. *Hum. Genet.* 1990; 84:522.
39. Caskey, CT; Nussbaum, RL; Cohan, LC; Pollack, L. Sporadic occurrence of Duchenne muscular dystrophy: evidence for new mutation. *Clin. Genet.* 1980; 18:329-341.
40. 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. Human. Genet.* 1992; 8:310- 312.
41. Sinha, S; Mishra, S; Singh, V; Mittal, B. High frequency of new mutations in North Indian Duchenne/Becker muscular dystrophy patients. *Clin. Genet.* 1996; 50:327-31.
42. Muntoni, F.; Mateddu, A.; Cau, M. Diagnosis of DMD carrier status in a family with no know affected males. *Dev. Med. Child. Neurol.* 1993; 35:65-78.
43. Bushby. K.M.; Goodship, J.; Nicholsons, L. Variability in clinical, genetic and protein abnormalities in manifesting carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromusc. Dis.* 1993; 3:57-64.

44. Swery, C.; Samsome, A.; Clerk, A. Manifesting carriers of Xp21 muscular dystrophy: lack of correlation between dystrophin expression and clinical weakness. *Neuromusc. Dis.* 1993; 3:65-70.
45. Perry, T.; Fraser, F. Variability of serum creatine phosphokinase activity in normal women and carriers of the gene for Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 1973; 23:1316-1323.
46. 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.
47. 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; 20:44-47.
48. 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; 320:138-146.
49. Perlín, M.; Burks, M.; Hoop, R.; Hoffman, E. Toward fully automated genotyping: allele assignment, pedigree construction, phase determination, and recombination detection in DMD. *Am. J. Hum. Genet.* 1994; 55:777-787.
50. Shi, Y.; Fischbeck, K.; Ritter, A.; Potential pitfalls in using DNA probes to counsel Duchenne and Becker muscular dystrophy families. *Chin. Med. J.* 1992; 105:469-475.
51. Prior, T. Perspectives and molecular diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Lab. Med.* 1995; 15(4):927-41.