

Universitas

ISSN 0122-7483

Scientiarum

Vol. 7 No. 1

Enero - Junio 2002



PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
Revista de la Facultad de Ciencias



IDENTIFICACIÓN DE DELECCIONES EN AFECTADOS DE DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE Y BECKER (DMD/DMB) Y DIAGNÓSTICO DE PORTADORAS POR METODOLOGÍAS MOLECULARES

Patricia Hernández Rodríguez¹ y Carlos Martín Restrepo²

¹Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana y Universidad de La Salle.
Carrera 7ª N° 40-62. E-mail. Patricia@javeriana.edu.co

²Instituto de Ciencias Básicas. Facultad de Medicina. Universidad del Rosario.

RESUMEN

Se diseñó un ensayo de PCR múltiple (6-plex) que amplifica simultáneamente 6 exones del gen de la distrofina, estos exones son los que presentan mayor frecuencia de mutación. La proporción de deleciones observada en este estudio mediante el sistema 6-plex correspondió al 31,25%, además el 60% del total de las deleciones involucró los exones 44 al 52. Con el fin de identificar mujeres portadoras de DMD y DMB se utilizó el cálculo de dosis génica, a través de esta metodología fueron identificadas 7 mujeres como portadoras y 15 como no portadoras de deleción para los exones analizados, en este estudio no se encontró ninguna mujer como portadora de duplicación. Con la utilización de polimorfismos dinucleotídicos (CA)_n localizados en el interior del gen fue posible establecer información sobre el cromosoma X que posiblemente está afectado en el 63% de las mujeres analizadas.

Palabras clave: Identificación de portadoras, dosis génica, polimorfismos (CA)_n, PCR múltiple, DMD, DMB.

ABSTRACT

A rehearsal of multiplex PCR (Polymerase chain reaction), was designed (6-plex) that amplifies 6 exons (51, 48, 45, 43, 19, 8) of the Dystrophin gene simultaneously, these exons is that present high mutations frequency. The deletions proportion observed in this study by means of the system 6-plex corresponded to 31,25%, almost all the detected deletions 60% involved the exons 44 at 52. With the propose of identifying carriers women of DMD and DMB it was used dosage gene, through this methodology 7 women carriers and 15 were identified as not carries deletions for the analyzed exons, in this study was not any woman carrier duplication. With the use dinucleotide polymorphisms (CA)_n located inside the gene was possible to establish information on X chromosome that possibly this affected in 63% of the analyzed women.

Key words: carriers identification, dosage gene, dinucleotide polymorphisms (CA)_n, Multiplex PCR, deletions, familial diagnosis, DMD, DMB.

INTRODUCCIÓN

La Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad hereditaria común en el hombre, afecta a 1 de cada 3.500 varones nacidos vivos; presenta una herencia recesiva ligada al sexo y se caracteriza por debilidad muscular progresiva, pérdida de la capacidad para caminar y lleva a la muerte al final de la segunda década de vida (Abbs S, Clark S.,

Mathew C.G., Bobrow M., 1991. Álvarez M., Hernández P.M., Perzzuno J.A., 1994. Koenig A., Beggs A.H., Moyer M., Scherpf S., Heindrich K., Bettecken T., Meng G., Muller C.R., Lindloft M., Kaariainen H., Chapelle A., Kiurus A., Savontaus M.L., Gilgenkrantz H., Recan D., Chelly J., Kaplan J.C., Covone A., Archidiscoño N., Romero G., Liecht-Gallati S., Schneider V., Braga S., Moser H., Darras B.T., Murphy P., Francke U., Chen J.D.,

Morgan G., Denton M., Greenberg C.R., Van Ommen G.J.B., Kunkel L.M., 1989.) La Distrofia Muscular de Becker (DMB), presenta características similares pero menos severas, permite una mayor sobrevivencia y su frecuencia es menor, aproximadamente 1 de cada 30.000 niños nacidos vivos (Laing N., Siddique T., Bertlett R., Yamaoka L., Hung W.Y., Pericak-Vance M.A., Roses A.D., 1989., Bakel I., Holt S., Craing I., Boyd Y., 1996. Bannerjee M. and Verma I., 1996. Boyd Y., Munro P., Worton R., Monaco T., Kunkel L., Craig I., 1988. Fichebeck K., 1989. Shomrat R., Driks N., Legum C., Shiloh Y., 1992) La DMD y DMB es causada por una variedad de mutaciones como deleciones, duplicaciones y mutaciones puntuales. Las deleciones de uno o más exones del gen de la Distrofina son las más frecuentes, un 65%, seguidas de duplicaciones (15%) y el resto son mutaciones puntuales. El gen de 2,4 Mb se localiza en el brazo corto del cromosoma X en la región p21, está constituido por 79 exones, produce un RNAm de 14 Kb y codifica una proteína de 427 Kd y 3.685 amoniácidos denominada Distrofina (Abbs, S., 1996. Anderson M. and Kunkel L., 1992. Chamberlain F., Gibbs R.A., Rainer J.E., Caskey T., 1992. Gokgoz N., Cursio C., Bresolin N., Scariato, 1993. Ohledieck K., Matsumura K., Lonasescu V., Towbin J.A., Bosch E.P., Weinstein S.L., Sernett S.W., Campbell K.P., 1993.) Por tratarse de una enfermedad con herencia recesiva ligada al cromosoma X, la mayoría de mujeres de familias con afectados son portadoras y presentan una probabilidad del 50% de tener hijos afectados y 50% de tener hijas portadoras (Chamberlain J., Gibbs RA, Nguyen P, Rainer J, Caskey J, 1998. Clutkow J, Hyser CL, Edwards J.A., Reffner R., Czymy J., 1987. Gutmann D.H., Fischbeck K., 1989. Hejtmancik J.F., Tsao C.C., Harris S.G., Ward P.A., Caskey C.T., 1986). El análisis de portadoras es un aspecto muy importante pues permite establecer si la

mutación es heredada o es una mutación de «novo», en ambos casos el conocimiento del estado portador o no portador genera diversas expectativas frente al asesoramiento genético (Fassati A., Tedeschi S., Bordoni, Amboni P., Curcio C., Bresolin N., Sacariato G., 1994. Fenner C., Boyce F.M., Kunkel L.M., 1991. Loannou P., Cristopoulos G., Panayides K., Kleanthous M., Middleton L., 1992. Shu Y., Roberts R.G., Bobrow M., Mathew C.G. 1993). Las estrategias utilizadas en este estudio para el análisis de mujeres portadoras fueron el cálculo de dosis génica y los polimorfismos ADN. A través de dosis génica fue posible identificar a siete mujeres portadoras y 15 no portadoras de deleción para los exones analizados; además, se contruyeron haplotipos mediante los polimorfismos (CA)_n SK12 y D45 localizados en el intron 44 y 45 respectivamente, obteniéndose una informatividad del 63% en las familias analizadas. El análisis molecular utilizado en este estudio, proporcionó datos confiables para la identificación de mujeres pertenecientes a familias con afectados de DMD/DMB.

METODOLOGÍA

Muestras de DNA

La extracción de DNA se realizó mediante la técnica de desalamiento (Prieto J.C., Keyeux G., Camacho M., 1997. Restrepo C., Correal M.C., González A., Lombo T., Gómez Y., Silvia T., 1997) a partir de 5 ml de sangre periférica de 52 personas (23 afectados y 29 mujeres por línea materna).

Amplificación por PCR múltiplex

Se utilizó un juego de 6 pares de primers, este juego 6-plex fue dividido en dos sistemas: el 5-plex-1 que amplificó los exones 45, 48, 19, 51 y 8, y el 5-plex-2 que amplificó los exones 43, 45, 48, 19 y 51; la amplificación de los exones se realizó de manera simultánea para cada persona en un volumen final de 35 mL,

que contenía 1X de buffer taq 10X, 7,5pM de primer 5-plex, 1,2mM de dNTP's, 3,5mM de MgCl₂, 0,05U/mL de taq DNA polimerasa (Pharmacia) y 7,1ng/mL de DNA. Las muestras fueron denaturadas inicialmente a 94°C durante 7 minutos, posteriormente se amplificaron en un termociclador programable bajo el siguiente programa: denaturación a 94°C por 30", alineamiento a 52°C por 30" y una extensión a 65°C por 4' durante 20 ciclos. La extensión final se realizó a 65°C durante 4'. Obtenidos los productos amplificados se corrieron las muestras mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%.

Identificación de deleciones en afectados a través de electroforetogramas y detección de portadoras por análisis de dosis génica

Se realizó una electroforesis vertical en un secuenciador automático de DNA Alf-expres (Pharmacia), a 1.500 voltios por 110 minutos. Se obtuvieron los electroforetogramas donde se establecieron los pesos moleculares exactos de cada uno de los exones presentes en los afectados. Además se estableció el área específica para cada producto amplificado en por lo menos dos mujeres (madre y hermana) y un control normal. La cuantificación de la dosis génica se calculó teniendo en cuenta lo establecido por Yau S.C y cols. 1996 (Yau S.C., Abbs S.J., 1993).

Detección de polimorfismos (CA)_n en afectados, madres y hermanas de familias con DMLX

Para el análisis con polimorfismos (CA)_n, se utilizaron primers o iniciadores marcados con Cy5 (SK12, D45 y un control (NUR)) y se utilizó la técnica descrita por Kochling S., *et al.*, 1996 (Kochling S., Dundunnden J.T., Dworniczak B., Horst J., 1995.) y modificada según los siguientes parámetros: 1X de buffer taq 10X, 0,6pM de primer, 0,4pM de primer de control

(NUR), 0,6mM de dNTP's, 1,5mM de MgCl₂, 0,1U/mL de taq DNA polimerasa y 5ng/mL de DNA. Las muestras fueron denaturadas inicialmente a 94°C por 4', posteriormente se amplificaron en un termociclador programable bajo el siguiente programa: denaturación a 94°C por 30", alineamiento a 62°C por 30" y una extensión a 70°C por 4' durante 30 ciclos. La extensión final se realizó a 65°C durante 4'. Los productos obtenidos fueron llevados al secuenciador de DNA, utilizando las siguientes condiciones: 1500 V, 38mA, 34W y 110 minutos. Con los datos obtenidos después de la electroforesis vertical se construyeron los haplotipos de cada familia, para esto fueron designados números en orden ascendente de acuerdo al tamaño (pb) de cada fragmento, de esta manera, el fragmento de menor tamaño fue designado como 1 y así sucesivamente.

RESULTADOS

Identificación de mutaciones del tipo deleción mediante amplificación por PCR múltiplex.

De las 23 familias incluidas en este estudio, se analizaron 16 a través del sistema 6-plex (5-plex-1 y 5-plex-2); identificándose deleciones en 5 familias con una proporción total de 31,25 (Figuras 1 a 4).

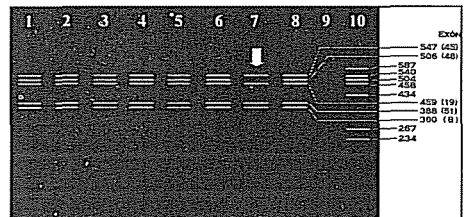


FIGURA 1. Patrón Electroforético Sistema 5-plex-1. L1: Hermana 36; L2: Madre 36; L3: Afectado 36; L4: Madre 6; L5: Afectado 6; L6: madre 3; L7: Afectado 3 (Del 48); L8: Control; L9: Blanco; L10: Marcador pBR322 cortado con Hae III.

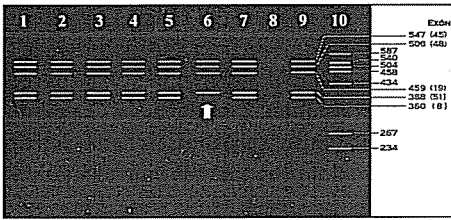


FIGURA 2. Patrón Electroforético Sistema 5-plex-1. L1: Madre 8; L2: Afectado 8; L3: Madre 11; L4: Afectado 11; L5: Hermana 12; L6: Afectado 12 (Del 8); L7: Madre 12; L8: Blanco; L9: Control; L10: Marcador pBR322 cortado con Hae III.

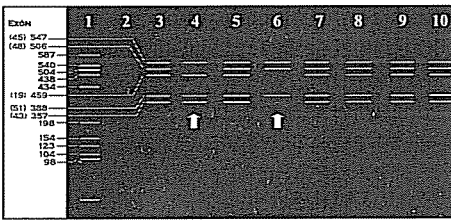


FIGURA 3. Patrón Electroforético Sistema 5-plex-2 . L1: Marcador pBR322 cortado con Hae III; L2: Blanco; L3: Control; L4: Afectado 3 (Del 48); L5: Madre 3; L6: Afectado 7 (Del 19, 43); L7: Hermana 7; L8: Afectado 12; L9: Madre 12; L10: Hermana 12.

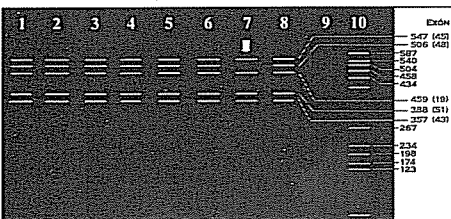


FIGURA 4. Patrón Electroforético Sistema 5-plex-2. L1: Madre 11; L2: Afectado 11; L3: Madre 31; L4: Afectado 31; L5: Tía 24; L6: Madre 24; L7: Afectado 24 (Del 48); L8: Control; L9: Blanco; L10: Marcador pBR322 cortado con Hae III.

Identificación de portadoras por cálculo de dosis génica

Con el fin de realizar el cálculo de dosis génica se tuvieron en cuenta los rangos y parámetros establecidos por Yau S.C. *et al.*, 1996 (Yau S.C., Abbs S.J, 1993). De esta forma se compararon las áreas de cada uno de los exones frente a controles, para determinar si en la madre o mujer por línea materna, existía una mutación del tipo deleción (rango = 0,33-0,61; rango = 1,56-2,88) o duplicación (rango = 1,5; rango = 0,67) o, si por el contrario, el exón presentaba una dosis normal (valor entre 0,77-1,27). Mediante el cálculo de dosis génica se identificó a siete mujeres como portadoras de deleción lo que constituye el 30% y 15 mujeres como no portadoras para los exones analizados, lo que corresponde al 70%. En este estudio no se encontró ninguna portadora de duplicación. La Figura 5 muestra un electroforetograma de tres familias estudiadas y la Tabla 1 muestra los valores obtenidos por cálculo de dosis génica.

Amplificación de polimorfismos (CA)_n de los intrones 44 y 45 del gen de la distrofina

La amplificación del polimorfismo (CA)_n SK12 en el intrón 44 y del polimorfismo (CA)_n D45 en el intrón 45 del gen de la distrofina, generó productos comprendidos entre 177-185 pb y 158-180 pb, respectivamente (Tabla 2 y Figura 6).

A partir de los alelos encontrados con los polimorfismos (CA)_n fueron construidos los haplotipos de las familias con DMLX incluidas en este estudio. (Figura 7). En la Tabla 3 se muestra la detección de portadoras de DMLX mediante cálculo de dosis génica y análisis con polimorfismos (CA)_n SK12 y D45 localizados en los intrones 44 y 45 respectivamente.

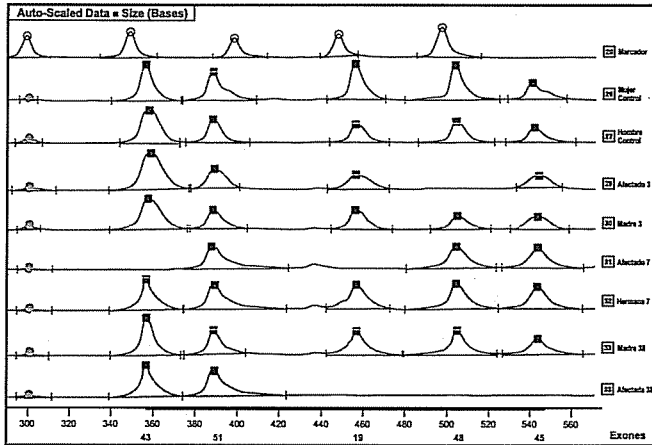


FIGURA 5. Electroforetograma obtenido a partir del sistema 5-plex-2 de las familias 3, 7 y 38. La ausencia de pico determina delección en el exón del afectado (Línea 29, 31 y 34). Por cálculo de dosis génica, las mujeres de estas familias (Líneas 30, 32 y 33) son portadoras obligatorias de la enfermedad.

TABLA 1. Fórmulas y parámetros para detección de portadoras por cálculo de dosis génica.

PICO ÁREA		DMLX3 MADRE					
Exón	Control 900E ₂	DMLX3 Madre	43	19	45	48	51
43	881	338	--	1,1	0,88	1,8	0,87
19	339	124	0,95	--	0,84	1,7	0,83
45	114	52	1,1	1,1	--	2,0	0,99
48	345	73	0,55	0,58	1,48	--	0,48
51	362	159	1,1	1,2	1,0	2,0	--
PICO ÁREA		DMLX7 HERMANA					
Exón	Control 888xx	DMLX7 Hmna	43	19	45	48	51
43	327	129	--	0,33	0,62	0,62	0,48
19	140	191	2,7	--	2,1	2,1	1,6
45	126	80	1,6	0,46	--	0,99	0,78
48	170	108	1,6	0,47	1,0	--	0,78
51	181	147	2,0	0,6	1,27	1,27	--
PICO ÁREA		DMLX38 MADRE					
Exón	Control	DMLX38 Madre	8	19	45	48	51
8	43	27	--	0,59	1,9	3,0	1,1
19	52	55	1,6	--	2,8	2,8	1,9
45	33	11	0,33	0,33	--	1,7	0,63
48	51	10	0,33	0,33	0,59	--	0,36
51	72	39	0,86	0,51	1,6	2,8	--

Rangos		
Exón copia doble	0,77-127	Normal
Exón copia simple	0,33-0,61	Delección
	1,55-2,88	Delección

	No portadoras para los exones analizados.
	Portadoras de DMLX

TABLA 2. Detección de portadoras de delección o duplicación en el gen de la distrofina por cálculo de dosis génica.

Cálculo de dosis génica (DQ)

$$DQ^{E45-48} = \frac{(\text{Área de la muestra E45}/\text{Área de la muestra E48})}{(\text{Área del control E45}/\text{Área del control E48})}$$

$$DQ^{E45-48} = \frac{(1612/4374)}{(2583/3042)}$$

$$DQ^{E45-48} = 0,43$$

$$DQ^{E48-45} = \frac{(\text{Área de la muestra E45}/\text{Área de la muestra E48})}{(\text{Área del control E45}/\text{Área del control E48})}$$

$$DQ^{E48-45} = \frac{(4374/1612)}{(3042/2583)}$$

$$DQ^{E48-45} = 2,303$$

Parámetros

	Exón analizado	Media DQ	Rango
Normal	1.0	1.01	(0.77-1.27)
Delección	0.5	0.47	(0.33-0.61)
	2.0	2.21	(1.56-2.88)
Duplicación	1.5		
	0.67		

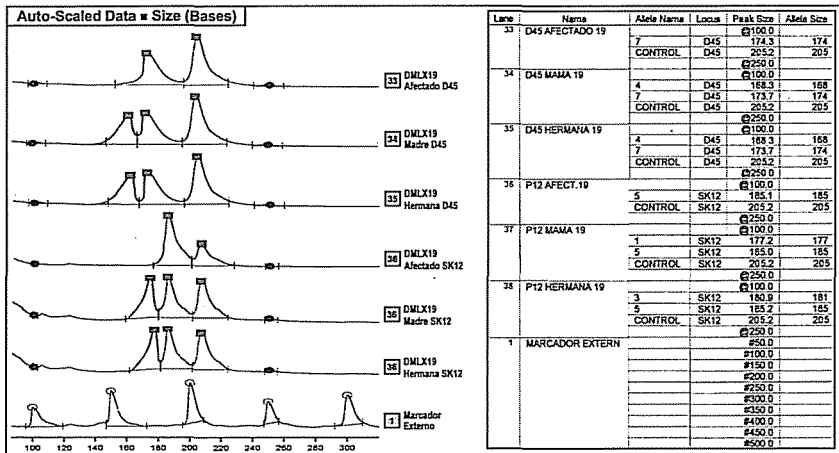


FIGURA 6. Electroforetograma que muestra los alelos de los polimorfismos (CA)_n presentes en el gen de la distrofina de los miembros de esta familia con distrofia muscular. El correspondiente pedigree se muestra en la figura 7d.

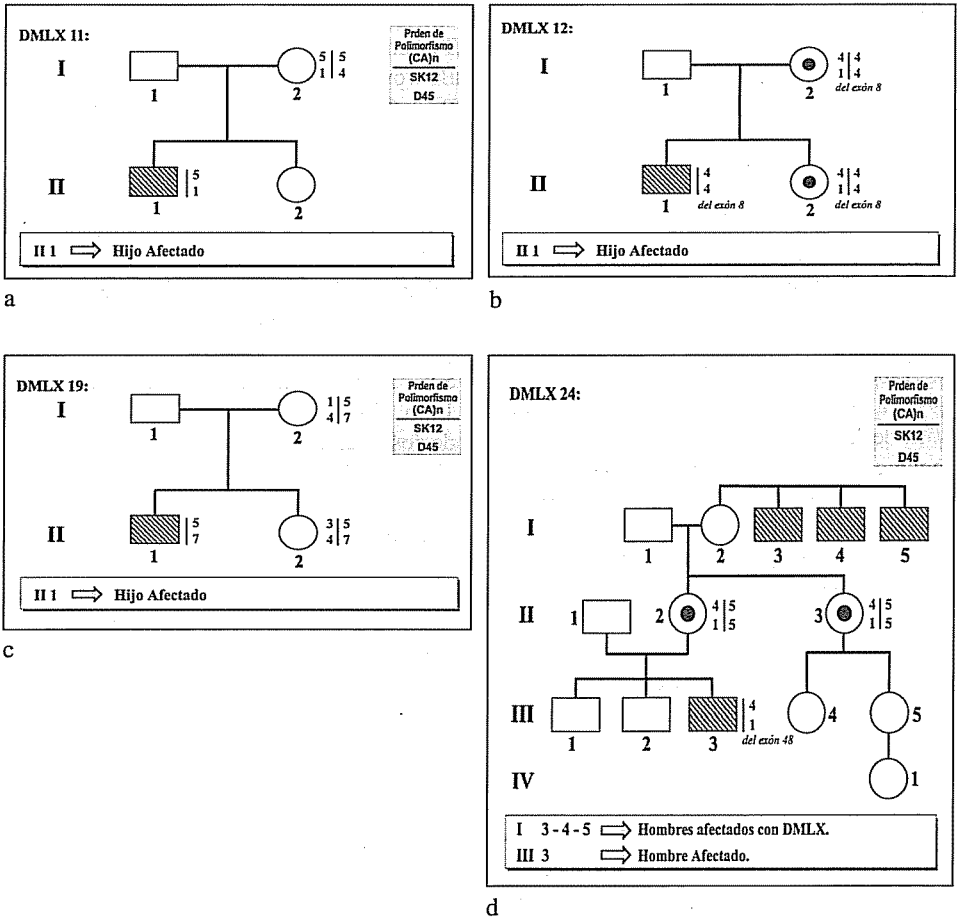


FIGURA 7. Árboles genealógicos de familias con DMLX.

- a. La madre I2 del afectado es homocigota para el polimorfismo SK12 y heterocigota para el polimorfismo D45; por consiguiente el cromosoma X afectado es el que muestra el alelo 5:1.
- b. La madre I2 y la hermana II2 del afectado, son homocigotas para el polimorfismo SK12 y heterocigotas para el polimorfismo D45, además presentan delección del exón 8 por consiguiente el cromosoma X afectado es el que muestra el alelo 4:4.
- c. La madre I2 y la hermana II2 del afectado, son heterocigotas para los dos polimorfismos (SK12, D45), por consiguiente el cromosoma X afectado es el que muestra el alelo 5:7.
- d. La madre II2 y la tía II3 del afectado, son heterocigotas para los dos polimorfismos (SK12, D45) además, presentan delección del exón 48, por consiguiente el cromosoma X afectado es el que muestra el alelo 4:1.

DISCUSIÓN

En este estudio se combinaron 6 juegos de primers o iniciadores (6-plex) en dos sistemas de amplificación (5-plex-1 y 5-plex-2). Con este nuevo sistema fueron detectadas deleciones en 5 de 16 casos lo que constituye el 31,25%; además, el 60% del total de las deleciones observadas involucran los exones 44 al 52. El diseño del sistema 6-plex se debió a que según Hoffman *et al.*, 1989 (Hoffman E., Pengoraro E., Scacheri P., Burns R., Taber J., Weiss L., Spiro A., Battner P., 1996) a nivel de estos exones se concentra el 80% de las deleciones del gen, igualmente según estudio realizado por Restrepo, CM y cols. 1997 (Beggs A. and Kunkel L.M., 1931-1932), en el que fueron empleados los sistemas 7-plex, 5-plex, 4-plex y 2-plex se observó una proporción total de deleciones correspondiente al 39,2% de las cuales el 54,54% correspondió a deleciones ubicadas en los exones 44 al 52 (Prieto J.C., Keyeux G., Camacho M., 1997. Restrepo C., Correal M.C., González A., Lombo T., Gómez Y., Silvia T., 1997. Silvia E., 1998). Por lo tanto, con el diseño de este nuevo sistema se identificó el 92% de las deleciones que son observadas con el uso combinado de los sistemas múltiplex, esto implica que el sistema 6-plex puede ser utilizado con la misma eficacia y genera una reducción en el tiempo y en los costos.

La detección de portadoras descrita en este trabajo se basa en el análisis molecular mediante dosis génica y polimorfismos (CA)_n. La extracción, cuantificación y amplificación del DNA es un factor importante para llevar a cabo la identificación de portadoras por análisis de dosis génica, ya que si la cantidad de ADN de las muestras y los controles difiere o si el número de ciclos de amplificación en la PCR es superior a 24, se pueden generar errores en el cálculo de la dosis génica, obteniéndose valores equívocos en la asignación de portadoras (Abbs S. and Bobrow M., 1992. Chamberlain J., Gibbs R.A., Rainer J.E., Caskey C.T., 1990. Gilliland G., Ambini

P., 1990. Kitoh Y., Matsuo M., Nishio H., Takumi T., Nakamura H., 1992. Yau S.C., Bobrow M., Mathew C.G., Abbs S.J., 1996). Por esta razón, en el presente estudio, fue necesario mantener condiciones similares de extracción y cuantificación de muestras de DNA y además, se utilizaron 20 ciclos con el fin de obtener un producto amplificado controlado. Dentro de los valores obtenidos en el cálculo de dosis génica (Tabla 1) se observan valores de deleción que se ajustan a los rangos establecidos por otros investigadores (Yau S.C., Bobrow M., Mathew C.G., Abbs S.J., 1996. Yau S.C., Abbs S.J., 1993). El análisis de dosis génica es un método altamente preciso en la detección de portadoras, sin embargo, es bastante exigente tanto en la cuantificación de DNA como en el resultado de la amplificación. Por esta razón, si los cálculos no son precisos es necesario repetir los ensayos (Yau S.C., Bobrow M., Mathew C.G., Abbs S.J., 1996. Yau S.C., Abbs S.J., 1993). En este estudio fueron analizadas 23 familias de las cuales solamente 16 mostraron precisión en los cálculos a través de los dos ensayos. Las familias que no pudieron ser incluidas en el cálculo de dosis génica (30%), presentaron productos amplificados débiles y no observables. En estudios de detección de portadoras realizados por Yau y cols. 1996 (Yau S.C., Bobrow M., Mathew C.G., Abbs S.J., 1996), se muestra que en aproximadamente el 25% de los casos es necesario repetir los ensayos debido a que uno o más valores de dosis génica no corresponden a cada uno de los rangos, esto puede deberse a fallas en cuantificación de ADN, amplificaciones débiles, amplificaciones no uniformes, degradación de muestras, número de ciclos de amplificación superiores a 24 y presencia de inhibidores de la PCR.

En el análisis mediante polimorfismos DNA se observó que el polimorfismo (CA)_nD45 presentó 10 alelos y el polimorfismo (CA)_nSK12 presentó 5 alelos; en otras poblaciones estos polimorfismos han presentado 13 y 6 alelos respectivamente, esta diferencia radica en que el

grado y distribución de los alelos difieren de una población a otra (Passos-Bueno M.R., Bakker E., Kneppers L.J., Takata R.I., Rapaport D., Den-Dunnen J.T., Zatt M., Van Ommen G.J.B., Coral, R., Arenas D., Cisneros B., Peñaloza L., Salamanca F., Koffman S., Mercado R., Méndez J., Martínez C., Montañez C., 1997, Kondo E., Kayoko S., Tatsushi T., Osawa M., Yamamoto T., Kobayashi M., Fukayama Y., 1996, Coral R., Arenas D., Cisneros B., Peñaloza L., Salamanca F., Koffman S., Mercado R., Montañez C., 1997, Beggs A. and Kuntel L.M., 1997).

La informatividad generada a partir del uso de los dos polimorfismos correspondió al 63%; siendo el polimorfismo (CA)_n D45 el más informativo (45%) y el SK12 el menos informativo (31%) para las familias analizadas (Tabla 3). Este grado de información se basa en que a partir de estos polimorfismos se

identifica el cromosoma X que está afectado. (Figura 7). En estudios realizados por Arenas *et al.*, 1996 (Arenas D., Coral R., Cisneros B., Peñaloza L., Salamanca F., Koffman S., Mercado R., Méndez J., Martínez C., Montañez C., 1995), se reporta para la población mexicana un 77% de efectividad en la asignación de portadoras utilizando el polimorfismo (CA)_n D45 y cinco marcadores más. Igualmente se han reportado estudios para otras poblaciones utilizando marcadores similares, secuenciación y dosis génica, en donde la efectividad del polimorfismo (CA)_n D45 es mayor (Isakac H., Wenger G.D., Snyder P.J., 1987. Tuffery S., Bareil C., Demaille J., Clausters M., 1996, Schwartz L., Tarleton J., Popovich B., Seltzer W.K., Hoffman E., 1992).

La explicación de esta diferencia se establece en que la informatividad de estos marcadores difiere de un grupo étnico a otro, de esta for-

TABLA 3. Fragmentos observados del polimorfismo (CA)_n SK12 (Intrón 44) y D45 (Intrón 45) y números asignados a cada fragmento.

Polimorfismos (CA) _n SK12 del intrón 44		Polimorfismo (CA) _n D45 del intrón 45	
Alelo	Tamaño (pb)	Alelo	Tamaño
1	177	1	158
2	179	2	164
3	181	3	166
4	183	4	168
5	185	5	170
		6	172
		7	174
		8	176
		9	178
		10	180

TABLA 4. Detección de portadoras de DMLX a través de cálculo de dosis génica y polimorfismos (CA)_n

Estrategia molecular	Número de casos (29)				
	Portadoras	No portadoras	Informativas	No informativas	No analizadas
Cálculo dosis génica	7	15			7
Polimorfismo (CA) _n			1 8	11	
SK12			9	20	
D45			13	16	

ma por ejemplo, un marcador 3' terminal del gen de la distrofina presentó para la población caucásica un 46% de heterocigosidad y en familias mexicanas no presentó ninguna informatividad, concluyendo que esta diferencia se presenta por el alto mestizaje en la población mexicana (Coral R., Arenas D., Cisneros B., Peñaloza L., Salamanca F., Koffman S., Mercado R., Montañez C., 1997, Niemann S., Slomski R., Rininsland F., Ellemeyer U., Kiatkowska J., 1992).

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo hace una contribución en el estudio de portadoras, ya que este es el primer trabajo realizado en Colombia aplicando estrategias moleculares como la dosis génica y el análisis de polimorfismos (CA)_n, además se amplían las perspectivas del estudio de portadoras en familias con DMD/DMB e igualmente se generan herramientas para un mejor y más preciso asesoramiento genético frente a la inexistencia de tratamientos que permitan curar o evitar la progresión de la enfermedad.

LITERATURA CITADA

- ABBS S., YAU S., CLARK S., MATHEW C.G., BOBROW M. *A convenient multiplex PCR system for the detection of Dystrophin gene deletions: a comparative analysis with cDNA hybridisation shows mistypings by both methods.* J Med Genet 1991; 28: 304-311.
- ÁLVAREZ M., HERNÁNDEZ PM., PERZZUNO J.A. *Diagnóstico diferencial entre distrofia muscular de Duchenne y Becker.* Gac Med Mex 1994; 130: 454-45.
- KOENIG A., BEGGS A.H., MOYER M., SCHERPF S., HEINDRICH K., BETTECKEN T., MENG G., MULLER C.R., LINDLOF M., KAARIAINEN H., CHAPPELLE A., KIURUS A., SAVONTAUS M.L., GILGENKRANTZ H., RECAN D., CHELLY J., KAPLAN J.C., COVONE A., ARCHIDISCONO N., ROMERO G., LIECHT-GALLATI S., SCHNEIDER V., BRAGA S., MOSER H., DARRAS B.T., MURPHY P., FRANCKE U., CHEN J.D., MORGAN G., DENTON M., GREENBERG C.R., VAN OMMEN G.J.B., KUNKEL L.M. *The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy.* Am J Hum Genet 1989; 45: 498-506.
- KUNKEL L. *Analysis of determination in DNA patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy.* Nature 1986; 322: 73-77.
- LAING N., SIDDIQUE T., BARTLETT R., YAMAOKA L., HUNG W.Y., PERICAK-VANCE M.A., ROSES A.D. *Duchenne muscular dystrophy detection of deletion carriers by spectrophotometric densitometry.* Clin Genet 1989; 35: 393-398.
- BAKEL I., HOLT S., CRAIG I., BOYD Y. *Sequence analysis of breakpoint regions of and X;5 translocation in female with Duchenne muscular dystrophy.* Am J Hum Genet 1996; 57: 329-336.
- BANERJEE M. and VERMA I. *Are there ethnic difference in deletions in the Dystrophin gene.* Am J Med Genet 1996; 68: 152-157.
- BOYD Y., MUNRO P., WORTON R., MONACO T., KUNKEL L., CRAIG I. *Molecular heterogeneity of translocations associated with muscular dystrophy.* Clin Genet 1988; 31: 265-272.
- FICHEBECK K. *The difference between Duchenne and Becker dystrophies.* Neurology 1989; 39: 584-585.
- SHOMRAT R., DRIKS N., LEGUM C., SHILOH Y. *Use of dystrophin genomic cDNA probes for solving difficulties in carrier detection and prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy.* Am J Hum Genet 1992; 42: 281-287.
- ABBS S., *Prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy.* Prenat Diagn 1996; 16: 1187-1198.
- ANDERSON M. and KUNKEL L. *The molecular and biochemical basis of Duchenne muscular dystrophy.* TIBS 1992; 17: 289-292.

- CHAMBERLAIN F., GIBBS R.A., RAINER J.E., CASKEY T. *Diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy by polymerase chain reaction*. JAMA 1992; 267: 2609-2615.
- GOKGOZ N., CURCIO C., BRESOLIN N., SCARIATO. *Screening of deletion and RFLPs analysis in DMD/DMB families by PCR*. Clin Genet 1993; 43: 261-266.
- OHLEDIECK K., MATSUMURA K. IONASESCU V., TOWBIN J.A., BOSCH E.P., WEINSTEIN S.L., SERNETT S.W., CAMPBELL K.P. *Duchenne muscular dystrophy: deficiency of Dystrophin-associated proteins in the sarcolemma*. Neurology 1993; 43: 795-799.
- CHAMBERLAIN J., GIBBS R.A., NGUYEN P., RAINER J., CASKEY J. *Deletions screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification*. Nucleic Acids Res 1988; 16: 11141-11157.
- CLUTKOW J., HYSER C.L., EDWARDS J.A., REFFNER R., CZYMY J. *Monozygotic female twin carriers discordant for the clinical manifestations of duchenne muscular dystrophy*. Am J Neurol 1987; 37: 1147-1151.
- GUTMANN D.H., FISCHBECK K. *Molecular biology of Duchenne and Becker muscular dystrophy*. Neurology 1989; 26: 189-194.
- HEJTMANCIK J.F., TSAO C.C., HARRIS S.G., WARD P.A., CASKEY C.T. *Carrier diagnosis of Duchenne muscular dystrophy using RFLPs*. Neurology 1986; 36: 1553-1562.
- FASSATI A., TEDESCHI S., BORDONI, AMBONI P., CURCIO C., BRESOLIN N., SCARIATO G. *Rapid direct diagnosis of deletions carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophies*. Lancet 1994; 344: 301-303.
- FENNER C., BOYCE F.M., KUNKEL L.M. *Rapid detection of CA polymorphisms in cloned DNA. Application to the 5' region of the Dystrophin gene*. Am J Hum Genet 1991; 48: 621-627.
- LOANNOU P., CHRISTOPOULOS G., PANAYIDES K., KLEANTHOUS M., MIDDLETON L. *Detection the Duchenne and Becker muscular dystrophy carriers by quantitative multiplex polimerasa chain reaction analysis*. Neurology 1992; 42: 1783-1790.
- SHU Y., ROBERTS R.G., BOBROW M., MATHEW C.G. *Direct diagnosis of carriers of point mutations in Duchenne muscular dystrophy*. Lancet 1993; 341: 273-275.
- PRIETO J.C., KEYEUX G., CAMACHO M., *Caracterización de mutaciones en pacientes con distrofia muscular de Duchenne y Becker*. Tesis Pontificia Universidad Javeriana 1997: 24-39.
- RESTREPO C., CORREAL M.C., GONZÁLEZ A., LOMBO T., GÓMEZ Y., SILVA T. *Mutaciones en el gen de la Distrofina en la distrofia muscular ligada al sexo en una población colombiana*. Correlación clínico-molecular. Crónica Científica 1997; 1: 19-56.
- YAU S.C., ABBS S.J., *Direct diagnosis of carriers of point mutations in Duchenne muscular dystrophy*. Lancet 1993; 341: 273-275.
- KOCHLING S., DEN-DUNNEN J.T., DWORNICZAK B., HORST J. *Two polymorphic dinucleotide repeats in intron 44 of the Dystrophin gene*. Hum Genet 1995; 95: 475-477.
- HOFFMAN E., PENGORARO E., SCACHERI P., BURNS R., TABER J., WEISS L., SPIRO A., BATTNER P., *Genetic counseling of isolated carriers of Duchenne muscular dystrophy*. Am J Med Genet 1996; 63: 573-580.
- SILVA E., *Informe de casos de distrofia muscular de Duchenne y Becker*. En: Informe Epidemiológico Nacional 1998; 3: 69-72.
- ABBS S. and BOBROW M., *Analysis of quantitative PCR for the diagnosis of deletion and duplication carriers in the Dystrophin gene*. J Med Genet 1992; 29: 191-196.
- CHAMBERLAIN J., GIBBS R.A., RAINER J.E., CASKEY C.T., *Multiplex PCR for the*

- diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. In: PCR protocols: A Guide to Methods and Applications.* Philadelphia; Copyright by Academic Press 1990: 272-281.
- GILLILAND G., AMBONI P., *Detection and quantitation by comparative polymerase chain reaction.* Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 2725-2729.
- KITOH Y., MATSUO M., NISHIO H., TAKUMI T., NAKAMURA H., *Amplification of deletion rich exons of the Dystrophin gene by polimerasa chain reaction.* Am J Med Genet 1992; 42: 453-457.
- YAU S.C., BOBROW M., MATHEW C.G., ABBS S.J., *Acurate diagnosis of carriers of deletions and duplications in Duchenne/Becker muscular dystrophy by fluorescent dosage analysis.* J Med Genet 1996; 33: 550-558.
- PASSOS-BUENO M.R., BAKKER E., KNEPPERS L.J., TAKATA R.L., RAPAPORT D., DEN-DUNNEN J.T., ZATZ M., VAN OMMEN G.J.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; 51: 1150-1155.
- CLEMENS P., FENWICK G., CHAMBERLAIN J., GIBBS R.A., ANDRADE M., CHAKRABORTY R., CASKEY C.T. *Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy families, using dinucleotide repeat polymorphisms.* Am J Hum Genet 1991; 49: 951-960.
- KONDO E., KAYOKO S., TATSUSHI T., OSAWA M., YAMAMOTO T., KOBAYASHI M., FUKUYAMA Y., *Prenatal diagnosis of type congenital muscular dystrophy by polymorphisms analysis.* Am J Med Genet 1996; 66: 169-174.
- CORAL R., ARENAS D., CISNEROS B., PEÑALOZA L., SALAMANCA F., KOFFMAN S., MERCADO R., MONTAÑEZ C., *Pattern of deletions of the Dystrophin gene mexican Duchenne/Becker muscular dystrophy patients.* Am J Med Genet 1997; 70: 240-246.
- BEGGS A, AND KUNKEL L.M., *A polimorphin CACA repeat in the 3' untranslated region of dystrophin.* Nucleic Acids Res 1997; 8: 1931-1932.
- 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 1995; 27: 151-156.
- ISAKAC H., WENGER G.D., SNYDER P.J., *Female carriers of Duchenne muscular dystrophy.* Clin Genet 1987; 31: 1553-1562.
- TUFFERY S., BAREIL C., DEMAILE J., CLAUSTRES M., *Four novel Dystrophin point mutations: detection by protein truncation test and transcript analysis in lymphocytes from Duchenne muscular dystrophy patients.* Eur J Hum Genet 1996; 4: 143-152.
- SCHWARTZ L., TARLETON J., POPOVICH B., SELTZER W.K., HOFFMAN E. *Fluorescent multiplex linkage analysis and carrier detection for Duchenne/Becker muscular dystrophy.* Am J Hum Genet 1992; 51: 721-729.
- YAMAGISHI H., KATO S., HIRAISHI Y., ISHIHARA T., HATA J., MATSUO N., TAKANO T., *Identification of carriers of Duchenne/Becker muscular dystrophy by novel method based on detection of junction fragments in the Dystrophin gene.* J Med Genet 1996; 33: 1027-1031.
- NIEMANN S., SLOMSKI R., RININSLAND F., ELLERMAYER U., KWIATKOWSKA J. *Molecular genetics analysis of 67 patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy.* Hum Genet 1992; 90: 65-70.