

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGIA**

**TAMIZAJE DE DELECCIONES EN PACIENTES  
CLÍNICAMENTE DISTROFINOPÁTICOS Y ESTIMACIÓN DE  
DOSIS GÉNICA EN POSIBLES PORTADORAS.  
COSTA RICA, 1998-2000**

Trabajo Final de Graduación para optar por el grado de  
Licenciada en Biología con énfasis en Genética Humana

**Vanessa M. Sancho Fernández**

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio  
2001

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGIA**

**TAMIZAJE DE DELECCIONES EN PACIENTES  
CLÍNICAMENTE DISTROFINOPÁTICOS Y ESTIMACIÓN DE  
DOSIS GÉNICA EN POSIBLES PORTADORAS.  
COSTA RICA, 1998-2000**

Trabajo Final de Graduación para optar por el grado de  
Licenciada en Biología con énfasis en Genética Humana

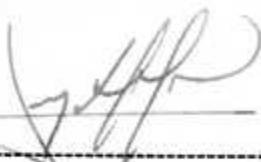
**Vanessa M. Sancho Fernández**

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio  
2001

Trabajo final de Graduación, presentado a la Facultad de Ciencias en la Escuela de Biología

Universidad de Costa Rica

APROBADO



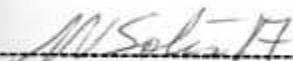
Dr. Jorge Azofeifa Navas

Director de Tesis



Msc. Daniel Briceño

Miembro del Tribunal  
Director de la Escuela



Dra. Virginia Solis Alvarado

Miembro del Tribunal



Dr. Gustavo Gutiérrez Espeleta

Miembro del Tribunal



Vanessa M. Sancho Fernández

Sustentante

# AGRADECIMIENTOS

A mi abuelo Arnaldo y a mi abuela María, por su amor y apoyo incondicional que me brindan cada día.

A mi mamá y papá, por su amor y apoyo incondicional que me brindan cada día.

A mi hermana, por su amor y apoyo incondicional que me brindan cada día.

A mi familia, por su amor y apoyo incondicional que me brindan cada día.

**A mis padres, quienes han sido mi apoyo y fortaleza.**

A mi abuelo Arnaldo y a mi abuela María, por su amor y apoyo incondicional que me brindan cada día.

A mi mamá y papá, por su amor y apoyo incondicional que me brindan cada día.

A mi hermana, por su amor y apoyo incondicional que me brindan cada día.

**A mi esposo Arnoud y a mis hijos, Alessandro y Erik, con todo mi amor.**

A mi familia, por su amor y apoyo incondicional que me brindan cada día.

A mi familia, por su amor y apoyo incondicional que me brindan cada día.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Azofeifa, por la dedicación y el apoyo incondicional que me brindó como tutor de esta tesis.

Al Dr. Manuel Saborío, por su valiosa ayuda en reevaluación clínica de los pacientes y posterior toma de muestras.

A la Dra. Virginia Solís, por sus oportunas correcciones.

Al señor Victor Castillo del Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), por contribuir en gran medida a la realización de este estudio.

A los señores Omar Achi y Jorge Monge, por su ayuda técnica.

A la Msc. María Santos, quien nos asesoró en la utilización del analizador genético.

Al Dr. Ramiro Barrantes y al Msc. Hernán Camacho, por su colaboración con el uso del analizador genético.

A los doctores José Pablo Alvarado, Kay Sanders y Mario Barrantes, quienes de alguna manera nos brindaron su ayuda durante la realización de este estudio.

Este trabajo se financió gracias a los aportes de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, proyecto n° 742-97-253, y de FUCODOCSA (Hospital Nacional de Niños).

## CONTENIDO

Tribunal examinador.....	i
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Contenido.....	iv
Abreviaturas.....	vii
Resumen.....	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Justificación del Tema.....	1
1.2 Planteamiento del problema.....	3
1.3 Revisión de literatura.....	5
1.3.1 El tejido muscular.....	5
1.3.2 Origen del concepto distrofia muscular.....	8
1.3.3 Las distrofinopatías. Diagnóstico clínico.....	10
-Distrofia muscular de Duchenne (DMD).....	10
-Distrofias musculares de Becker-Kiener (BMD) e intermedia (IMD).....	12
-Otras pruebas diagnósticas.....	14
-Diagnóstico diferencial.....	17
-Mujeres afectadas con distrofinopatías.....	20
1.3.4 Terapia.....	21
1.3.4.1 Terapia basada en la biotecnología.....	23

A. Técnicas <i>ex vivo</i> .....	23
-Transplante de mioblastos.....	23
-Transplante de células precursoras.....	24
B. Técnicas <i>in vivo</i> .....	24
1.3.5 El gen de la distrofina.....	26
-Localización en el genoma.....	26
-Estructura molecular y productos .....	27
-Estructura molecular y función de la distrofina.....	30
-Naturaleza de las mutaciones.....	34
1.3.6 Tecnologías utilizadas en el diagnóstico de distrofinopatías y detección de portadoras.....	37
OBJETIVOS.....	40
2. MATERIALES Y METODOS.....	41
2.1 Tamizaje de deleciones.....	41
2.1.1 Recolección de muestras (los pacientes) .....	41
2.1.2 Extracción del ADN.....	41
2.1.3 Reacciones de amplificación (PCR).....	44
2.1.4 Electroforesis.....	45
2.1.5 Tinción.....	46
2.2 Detección de portadoras.....	46
2.2.1 Reacciones de amplificación.....	47
2.2.2 Electroforesis capilar.....	48

2.2.3 Preparación de la muestra para análisis.....	48
2.2.4 Condiciones de la electroforesis capilar.....	48
2.2.5 Determinación de la dosis génica en candidatas a ser portadoras de deleciones.....	49
3. RESULTADOS.....	51
3.1 Tamizaje de deleciones.....	51
3.2 Detección de portadoras.....	56
3.2.1 Validación del método.....	57
A. Los pacientes.....	57
B. Estimación de la dosis génica de una portadora obligada y dos controles normales.....	57
3.2.2 Posibles portadoras.....	61
4. DISCUSION.....	69
APENDICE.....	75
REFERENCIAS.....	100

## ABREVIATURAS

- 6-FAM: 6-carboxifluoresceína
- AAV: virus adenoasociado
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario
- ARNm: ácido ribonucleico mensajero
- BMD: distrofia muscular de Becker-Kiener
- DAGC: complejo de glicoproteínas asociadas a la distrofina
- DMD: distrofia muscular de Duchenne
- dNTP: dinucleótido trifostato
- Dp 116: distrofina de 116 kD
- Dp 140: distrofina de 140 kD
- EDTA: ácido etilendinitrotetracético
- FCMD: distrofia muscular congénita tipo Fukuyama
- FISH: hibridación *in situ* fluorescente
- IMD: distrofia muscular intermedia
- kb: kilobase
- kD: kilodalton
- LGMD2C: distrofia muscular de cinturas tipo 2C
- Mb: megabases

MIM: Mendelian Inheritance in Man

MM: master mix ó combinación de imprimadores

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

POP4: poli (N, N-dimetilacrilamida)

RFLP's: polimorfismos de longitud en fragmentos de restricción

ROX: 6-carboxirrodamina X

SCK: creatina quinasa en suero

SDS: duodecil sulfato de sodio

SMA III: atrofia muscular espinal tipo III

TBE: buffer tris /EDTA/borato

TE: buffer tris/EDTA (10/1)

VLCAY: adenovirus de gran capacidad

## RESUMEN

Las distrofias musculares de Duchenne (DMD) y Becker-Kiener (BMD) son desórdenes alélicos de carácter recesivo y ligados al cromosoma X, causados por mutaciones en el gen de la distrofina, por lo cual se denominan distrofinopatías. El tipo más frecuente de mutación (65%) es la pérdida de material genético o delección. Mediante la técnica del PCR-múltiplex es posible detectar más del 98% de este tipo de mutaciones en pacientes distrofinopáticos. Utilizando este método, se estudiaron 26 pacientes así diagnosticados clínicamente. Diez de ellos presentaron delecciones (38.5%).

Este hallazgo permitió identificar a aquellas mujeres de la familia que podrían ser portadoras de la misma delección que afecta al paciente. Para determinar su condición, se estimó la dosis génica mediante electroforesis capilar fluorescente a 15 mujeres familiares de 6 de los pacientes con delecciones. Los análisis indicaron que ninguna de ellas parece ser portadora de la delección que afecta a los respectivos probandos, por lo cual no tendrían un riesgo mucho mayor de tener hijos afectados que el de la población en general. No obstante, se han encontrado casos de mujeres con hijos enfermos que no son portadoras a nivel de las células somáticas, pero sí a nivel de la línea germinal, lo cual tiene grandes implicaciones en el consejo genético para las madres de hijos afectados.

Según se ha descrito en la literatura, un tercio de los casos de DMD/BMD no tienen antecedentes familiares y se deben a mutaciones *de novo*. En el estudio, se observó una proporción diferente de acuerdo a lo esperado para un desorden hereditario de carácter recesivo, como es el caso de las distrofinopatías. Únicamente un tercio de los pacientes tienen historia

familiar y de los 6 pacientes analizados, todos parecen ser producto de nuevas mutaciones, sin embargo, esperaríamos que al menos cuatro de ellos tuvieran antecedentes familiares. Dado que este estudio no tuvo carácter epidemiológico, no se puede determinar si la proporción de mutaciones *de novo* difiere de lo observado en otros países.

Por otra parte, el porcentaje de pacientes con deleciones (38.5%) si es inferior al observado en el resto del mundo (65%), no obstante el tamaño de la muestra nos impide inferir la situación real en Costa Rica.

Con la implementación de estas tecnologías, se podrían iniciar los estudios epidemiológicos y de esta manera tener un panorama más claro de la realidad nacional. Así mismo, será posible refinar el diagnóstico clínico de las distrofinopatías, que actualmente resulta complejo, debido al traslape de sintomatologías observado entre los distintos tipos de distrofia muscular. Además, el conocimiento de las mujeres con riesgo de tener hijos afectados permitirá brindar un apropiado consejo genético a las parejas que desean tener descendencia.

# 1 INTRODUCCION

## 1.1 JUSTIFICACIÓN DEL TEMA

Las distrofias musculares, caracterizadas por el debilitamiento y la degeneración progresiva del músculo esquelético, son un grupo de trastornos hereditarios que tienen poco en común en cuanto a su origen molecular (Emery 1993). El conocimiento de la estructura y función del genoma humano ha permitido identificar diversos genes involucrados en este tipo de padecimientos, de manera que la clasificación más reciente se basa no sólo en las manifestaciones clínicas sino también en el origen genético-molecular (Cuadro 1).

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) constituye la forma más severa y frecuente con una incidencia de 1:3500 recién nacidos varones (Emery 1991). Esta enfermedad letal que provoca la muerte del paciente alrededor de la segunda década de la vida es de herencia recesiva y está ligada al cromosoma X, por lo que afecta fundamentalmente a varones. La distrofia muscular de Becker-Kiener (BMD) es una variante alélica, mucho más benigna, cuya incidencia se ha estimado en 1:18500 recién nacidos varones (Emery 1991).

El defecto primario en estas dos enfermedades lo constituyen mutaciones en el gen de la distrofina, una proteína de membrana indispensable para el funcionamiento normal de las miofibras, por lo cual los padecimientos relacionados con este gen se denominan distrofinopatías. El gen se localiza en la banda 21 del brazo corto del cromosoma X, Xp21 (Verellen *et al.* 1978, Lindenbaum *et al.* 1979).

**Cuadro 1. Clasificación de algunas distrofias musculares de acuerdo al modo de herencia y su localización en el genoma.**

Enfermedad	modo de herencia	locus génico	producto génico
<b>Distrofias musculares ligadas al X:</b>			
DMD/BMD	XR <sup>1</sup>	Xp21	distrofina
tipo Emery-Dreifuss	XR	Xq28	emerina
Distrofia de Emery-Dreifuss	AD <sup>2</sup>	1q11	laminina A/C
<b>Distrofia muscular de cinturas</b>			
<b>Tipo:</b>			
1A	AD	5q22-q34	
1B	AD	1q11-21	laminina A/C
1C	AD	3p25	caveolina-3
1D	AD	6q22	
1E	AD	7	
2A	AR <sup>3</sup>	15q15	calpaina-3
2B	AR	2p13	disferlina
2C	AR	13q12	$\gamma$ -sarcoglicano
2D	AR	17q12-q21	$\alpha$ -sarcoglicano
2E	AR	4q12	$\beta$ -sarcoglicano
2F	AR	5q33-q34	$\delta$ -sarcoglicano
2G	AR	17q11-q12	teletonina
2H	AR	9q3-q34	
<b>Distrofia muscular distal:</b>			
Miopatía de Miyoshi	AR	2p13	disferlina
Distrofia muscular tibial	AD	2q31	titina?
<b>Distrofia muscular congénita (DMC):</b>			
Clásica o pura	AR	6q22	laminina $\alpha$ 2
Tipo Fukuyama	AR	9q31-q33	fukutina
Miopatía congénita $\alpha$ 7 integrina	AR	12q13	$\alpha$ 7 integrina
De espina rígida	AR	1p35-36	
Enfermedad mús.-ojo-cerebro	AR	1p32-p34	
<b>Otras formas de distrofia muscular:</b>			
Miopatía de Bethlem	AD	21q22	colágeno VI $\alpha$ 1
	AD	21q22	colágeno VI $\alpha$ 2
	AD	2q37	colágeno VI $\alpha$ 3
Epidermolisis bulosa y DM <sup>4</sup>	AR	8q24-qter	pectina
DM oculofaríngea	AD	14q11.2-q13	proteína 2-poliA
DM facioescapulohumeral	AD	4q35	
Distrofia miotónica	AD	19q13	miotonina-proteína quinasa?

<sup>1</sup>recesivo ligado al X; <sup>2</sup>autosómico dominante; <sup>3</sup>autosómico recesivo; <sup>4</sup>distrofia muscular.

Fuente: Cohn y Campbell (2000).

Los pacientes con BMD presentan alteraciones en cuanto a tamaño y cantidad de distrofina, mientras que los pacientes con DMD tienen niveles virtualmente indetectables de la proteína (Hoffman *et al.* 1987).

Se ha documentado que en 2/3 de los casos las mutaciones son deleciones o pérdidas de material genético (Darras *et al.* 1988, Gillard *et al.* 1989), en el tercio restante se presentan mutaciones de otros tipos tales como duplicaciones (Hu *et al.* 1990), mutaciones de punto (Tuffery *et al.* 1996, Roest *et al.* 1996) e inversiones (Baxter *et al.* 1997)

Utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa múltiple (PCR-múltiple) se detecta un 98% de las deleciones observadas en los pacientes con DMD ó BMD (Chamberlain *et al.* 1988, Beggs *et al.* 1990). Esto permite no solo refinar el diagnóstico clínico sino también, con el uso de otras tecnologías, detectar portadoras dentro de la misma familia con el fin de brindarles consejo genético y diagnóstico prenatal en aquellos casos que se solicite.

## 1. 2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dentro del ámbito de las enfermedades humanas, la DMD ocupa el segundo lugar entre los desórdenes de tipo hereditario (Emery 1993). En Costa Rica, sin embargo, no se ha realizado ningún tipo de estudio sobre las distrofinopatías, por lo que la incidencia de la enfermedad y su impacto en el sistema de salud del país son desconocidos. Se espera, no obstante, que la incidencia sea similar a lo observado en otros países alrededor del mundo (Emery 1991, Peterlin *et al.* 1997).

Desde hace algunas décadas, las enfermedades crónicas han cobrado una mayor importancia relativa en Costa Rica (Mohs 1982, Gomez y Sáenz 1998). Sin duda el componente genético en la morbilidad de estos padecimientos es alto, por lo tanto resulta evidente la necesidad de implementar métodos diagnósticos con base molecular. Por ejemplo, en el caso concreto de las distrofias musculares, el diagnóstico primario en Costa Rica es muy general y rara vez especifica el tipo de distrofia. Esta deficiencia se debe probablemente al traslape de sintomatologías observado entre algunas de ellas, a la falta de apoyo al clínico con pruebas de laboratorio que faciliten el diagnóstico diferencial y a la deficiencia curricular y la falta de experiencia en enfermedades genéticas de muchos médicos generales, neurólogos y pediatras.

Actualmente, en varios países del mundo se ha implementado la técnica del PCR- multiplex como valiosa herramienta para la detección de deleciones en pacientes distrofinopáticos. Al igual que otras tecnologías para el análisis de portadoras, siendo las más exitosas hasta el momento actual la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) (Ried *et al.* 1990, Tocharoentanaphol *et al.* 1994, Voskova-Goldman *et al.* 1997) y la determinación de dosis génica fluorescente a partir del PCR cuantitativo (Schwartz *et al.* 1992, Mansfield *et al.* 1993, Yau *et al.* 1996, Fortina *et al.* 1997).

Como se mencionó anteriormente, este tipo de estudios brindan beneficios no solo para la familia sino también para la sociedad. Cuando se identifica una mujer portadora, el genetista puede explicar a la paciente o la pareja el significado de su condición así como la probabilidad de tener un hijo afectado. El consejo genético le permite a la mujer portadora, luego del conocimiento de su condición, decidir su futura vida reproductiva. Así mismo, es posible realizar diagnóstico prenatal en los casos en que la madre así lo solicite.

Además, existe un beneficio adicional para los niños afectados. Aunque lamentablemente la DMD no tiene cura hasta el momento, algunos síntomas e impedimentos son manejables y pueden ser tratados a tiempo para evitar deformaciones anatómicas, ejercer un control adecuado del peso y la nutrición, así como preservar la función respiratoria, de tal modo que mejoraría considerablemente la calidad de vida del niño enfermo (Emery 1993).

Los beneficios son incuestionables y apoyan con gran fuerza la necesidad de iniciar los estudios de las distrofinopatías en Costa Rica.

## **1.3 REVISION DE LITERATURA**

### **1.3.1 EL TEJIDO MUSCULAR <sup>1</sup>**

El músculo está constituido por tejido contráctil que permite el movimiento. En el cuerpo humano existen de 434 (Emery 1993) a 600 (Carola et al. 1990) músculos diferentes, dependiendo de si se consideran algunos músculos como pares o unidades individuales. En el ser humano el sistema muscular se clasifica en tres tipos de músculo de acuerdo a su apariencia y localización: músculo estriado, músculo liso y músculo cardíaco.

El músculo estriado se ve principalmente afectado en las distrofias musculares, por lo cual, es importante conocer su anatomía. A este tipo de tejido muscular se le conoce también como músculo esquelético, ya que se encuentra unido al esqueleto y permite su movimiento, y como músculo voluntario, dado que la contracción o relajación se ejerce de manera consciente.

---

<sup>1</sup> Basado fundamentalmente en Carola *et al.* 1990

La unidad fundamental del músculo esquelético es la fibra muscular, una célula multinucleada de forma alargada y cilíndrica. Esta célula fundamental se origina a partir de la fusión de varios mioblastos mononucleados derivados, a su vez, de los miotomos. Después de la fusión, el núcleo de la fibra no se divide de nuevo y permanece en el sarcoplasma junto con los elementos contráctiles. Las fibras musculares se agrupan entre sí formando fascículos (Figura 1).

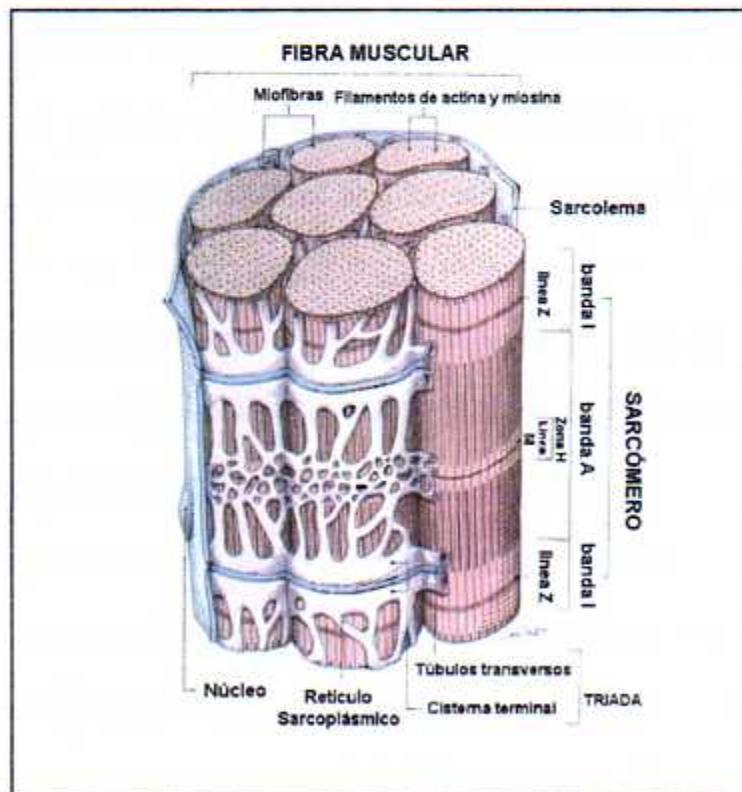


Figura 1. Estructura tridimensional de la fibra muscular. (Fuente: Carola *et al.* 1990)

Los núcleos son numerosos, alcanzando varias centenas, por lo que las fibras musculares se pueden considerar como sincitios. Cada fibra muscular varía en longitud dependiendo del músculo al que pertenezca. Algunas pueden alcanzar una longitud de hasta 15 cm, aunque su grosor no suele exceder los 0.08 mm. La fibra contiene un tipo especializado de citoplasma denominado sarcoplasma. Cada fibra está cubierta por una delgada membrana celular, anhistá, elástica y resistente denominada sarcolema. Dentro del sarcoplasma se encuentran las mitocondrias y un gran número de fibrillas individuales conocidas como miofibrillas, las cuales se extienden paralelas unas a otras. Alrededor de cada miofibrilla y paralelo a ellas se encuentra el retículo endoplasmático. Esta red de tubos y vesículas contiene iones de calcio y una estructura similar al retículo endoplasmático liso encontrado en otros tipos celulares. Atravesando el retículo endoplasmático en ángulo recto se encuentran los tubos transversos o túbulos T.

Las miofibrillas están constituidas por filamentos gruesos y delgados. El filamento grueso está compuesto en gran medida por miosina y el delgado por actina, también están presentes en menor proporción otras proteínas como la troponina y tropomiosina.

Entre el plasma y la membrana basal de la fibra muscular se encuentran células sateliticas. Estas células contienen muchos ribosomas y son particularmente frecuentes en el músculo enfermo, aunque se desconoce la razón. Se cree que podría ser una población persistente de células mioblásticas precursoras que retiene la habilidad de dividirse para la formación de tejido muscular adicional en el proceso de reparación.

### 1. 3. 2 ORIGEN DEL CONCEPTO Distrofia Muscular<sup>2</sup>

En 1830 se realizó la primera descripción clínica compatible con el concepto actual de distrofia muscular. Se atribuye al médico inglés Charles Bell, en su publicación *The Nervous System of the Human Body*. Allí describió a un varón de 18 años que presentaba debilitamiento y degeneración muscular así como dificultad para levantarse, aunque su sistema nervioso parecía normal. Sin embargo, la ausencia de otras pruebas diagnósticas en aquella época imposibilitan inferir el tipo de distrofia que pudo haberlo afectado.

No fue sino hasta 1852 cuando se realizó la primera descripción completa de debilidad progresiva y atrofia muscular en niños de corta edad. Edward Meryon, descubrió como el tejido adiposo invadía los músculos afectados, causando lo que se conoce como pseudohipertrofia. Las autopsias practicadas revelaban una médula espinal y nervios sanos. Además, Meryon señaló el carácter familiar de la enfermedad y su manifestación principalmente en varones, lo cual podría sugerir que se trataba de alguna de las distrofias recesivas ligadas al cromosoma X. Lamentablemente, su trabajo no recibió el crédito que merecía.

Guillaume Benjamin Amand Duchenne, nació en Boulogne, Francia, en 1806. Durante años se dedicó al análisis clínico de la función muscular y describió en 1855 la distrofia muscular progresiva de la infancia que lleva su nombre, distrofia muscular de Duchenne (DMD).

No obstante, fue hasta la segunda edición de su monografía *De l'Electrisation Localisée et son*

---

<sup>2</sup> Basado principalmente en Emery 1993.

*Application à la Pathologie et à la Thérapeutique*, publicada en 1861, cuando se reconoció como un síndrome distinto de patología desconocida. Sus posteriores observaciones le permitieron definir un panorama más claro de la sintomatología: debilidad muscular progresiva que afecta en primera instancia las extremidades inferiores y luego las superiores, un incremento gradual de los músculos afectados así como una proliferación de tejido fibroso y adiposo en las etapas terminales. Así mismo, reconoció que se manifestaba en la infancia o adolescencia temprana, era más prevalente en varones que en mujeres y podía afectar a varios miembros de una misma familia.

A Duchenne se debe el diseño de unas agujas especiales para obtener muestras de tejido vivo lo que permitió estudiar los cambios tisulares durante los distintos estadios de la enfermedad. Esto le permitió concluir que la lesión anatómica fundamental era la hiperplasia del tejido conectivo intersticial. La enfermedad se denominó en ese entonces parálisis mioesclerótica.

Es necesario mencionar también los aportes de William Gowers, quien con sus minuciosas descripciones clínicas pudo identificar la manera peculiar y característica con la que los niños afectados se levantaban del suelo, luego de estar sentados. Hoy en día se conoce como la "maniobra de Gower" y su determinación es parte fundamental de la rutina diagnóstica.

A finales del siglo XIX se sabía que la enfermedad afectaba principalmente al músculo esquelético y que era de origen hereditario, pero también estaba claro que no todos los casos presentaban las mismas manifestaciones clínicas, sugiriendo la posibilidad de que existiera más de una enfermedad.

Wilhelm Heinrich Erb fue el primero en visualizar el concepto clínico e histológico de un grupo de enfermedades debidas a la degeneración primaria del músculo, a las que denominó distrofias musculares.

Clásicamente se ha utilizado el modo de herencia, la edad de aparición de los primeros síntomas y los músculos involucrados en el padecimiento para establecer una clasificación. No obstante la marcada heterogenidad fenotípica, observada por Erb desde 1891, ha hecho difícil establecer un diagnóstico preciso.

Durante la última década, el avance de la genética molecular ha permitido la identificación de diversos genes involucrados en este tipo de enfermedades, de tal manera que se ha producido un cambio importante en la clasificación de las distrofias musculares (Cuadro 1).

### 1.3.3 LAS DISTROFINOPATÍAS. DIAGNÓSTICO CLÍNICO

#### **Distrofia Muscular de Duchenne (DMD)**

Esta enfermedad es la forma más común y severa dentro del grupo de las distrofias musculares, su incidencia se ha estimado en 1:3500 varones recién nacidos (Emery 1991). Es una enfermedad letal de herencia recesiva, que se encuentra ligada al cromosoma X, por lo que los afectados son fundamentalmente varones ( Emery 1991). No obstante, alrededor del 8% de las mujeres portadoras presentan manifestaciones clínicas de la enfermedad (Moser y Emery 1974).

En un tercio de los casos no existen antecedentes familiares, lo cual sugiere que podrían haber ocurrido mutaciones *de novo* (Moser 1984, Emery 1993).

En el estado preclínico de la enfermedad, la histología del músculo se presenta ya anormal; más aún, se ha determinado que la patología está presente en el feto, tanto a nivel histológico como histoquímico (Emery 1977).

Los síntomas se manifiestan entre los 3 a 5 años de edad. En general se presenta retardo en el desarrollo motor, frecuentemente se observa dificultad para correr, saltar y subir escaleras, así como un andar de puntillas y marcha vacilante. El 50% de los niños aprenden a caminar hasta los 18 meses (Emery 1993).

Durante las etapas tempranas de la enfermedad la característica más obvia es la pseudohipertrofia muscular, fundamentalmente de los músculos gastronemios (Emery 1993). Este aumento aparente en la masa muscular se debe en parte al exceso de tejido conectivo y adiposo producido, sin embargo, esta característica no es exclusiva de la DMD y se observa también en otras formas de distrofia muscular, como la distrofia muscular de cinturas y algunas miopatías congénitas (pág. 17).

El deterioro y debilitamiento a nivel muscular son progresivos y simétricos, y como lo había observado Duchenne, se afectan en primera instancia las extremidades inferiores antes que las superiores y los músculos proximales antes que los distales (Emery 1993). A medida que progresa la enfermedad, la debilidad muscular aumenta, se manifiesta lordosis lumbar y los músculos de las rodillas y la cadera ya no le permiten al paciente levantarse del suelo sin el apoyo de sus manos (maniobra de Gower). Entre los 7 u 8 años se manifiestan contracturas en los talones de Aquiles y las bandas iliotibiales. (Emery 1993).

Usualmente los niños pierden la capacidad ambulatoria alrededor de los 12 años de edad. Las contracturas alcanzan su punto máximo y se desarrolla una escoliosis que puede causar molestias

considerables. La deformidad torácica afectada por la escoliosis altera todavía más la función pulmonar, ya comprometida por la debilidad muscular y en muchos casos se desarrollan infecciones como la neumonía. La muerte ocurre alrededor de los 20 años, fundamentalmente por infecciones respiratorias o insuficiencia respiratoria crónica. Aunque todos los pacientes padecen de miocardiopatía, es poco frecuente la muerte por falla cardíaca (Emery 1993).

### **Distrofias musculares de Becker-Kiener (BMD) e intermedia (IMD)**

En 1955, el psicólogo Franz Kiener estudió conjuntamente con Peter Emil Becker una variante de la DMD, más benigna y de progresión más lenta, que afectaba a varios miembros de su familia (Becker y Kiener 1955). Se le denominó distrofia muscular de Becker-Kiener (BMD).

La prevalencia se ha estimado en 1/18500 varones recién nacidos (Emery 1991), sin embargo, en ocasiones el diagnóstico se torna difícil debido al traslape de síntomas con otras distrofias musculares, de modo que podrían haberse subestimado las cifras epidemiológicas para la BMD, como se determinó en estudios realizados en Eslovenia (Peterlin *et al.* 1997).

Generalmente, los pacientes son capaces de caminar por sí mismos hasta los 16 años de edad y sobreviven incluso hasta la cuarta o quinta década de vida, por lo que algunos llegan a reproducirse (Emery 1993).

Existe un subgrupo de pacientes que manifiestan una entidad clínica bien definida con una sintomatología intermedia entre DMD y BMD, a la cual se le ha denominado distrofia muscular intermedia (IMD) (Brooke *et al.* 1983, citada por Prior 1995). Clínicamente la diferencia radica en que los IMD conservan la acción normal de los músculos flexores del cuello, mientras que los pacientes con DMD pierden esta habilidad durante toda su vida. Por otra parte, son capaces de

caminar y subir escaleras hasta antes de los 12 años, pero no más allá de los 15; esto los diferencia de los pacientes con BMD, ya que los últimos no suelen perder la capacidad ambulatoria antes de los 16 años (Emery 1993).

Se ha observado que un 20% de los pacientes distrofinopáticos se encuentran afectados mentalmente, por ejemplo, el 25% de los pacientes con DMD tienen un IQ de 75 ó menos (Bresolin *et al.* 1994); sin embargo la causa neuropatológica para este retardo aún no ha sido establecida. Fundamentalmente se ve afectada la habilidad verbal (Leibowitz *et al.* 1981; citado por Prior 1995). Zellweger y Niedermeyer (1965) propusieron que el retardo mental en algunos pacientes, es un efecto pleiotrópico del gen de la DMD, aunque esto aún no ha sido demostrado. Posteriormente, el descubrimiento de una isoforma de la distrofina de expresión cerebral ha sugerido que la deficiencia en la expresión de la misma podría tener relación con el retardo mental observado en algunos pacientes distrofinopáticos (Emery *et al.* 1979).

En un estudio realizado por Zatz y colaboradores (1993), se identificaron algunos pacientes con DMD que presentaban además esquizofrenia u otros desórdenes de esta clase que podrían estar relacionados con loci en Xp21 o con la expresión anormal del gen de la distrofina en el cerebro, sin embargo, aún no hay conclusiones al respecto.

Estudios recientes indicaron que la delección de la región reguladora de la Dp140 podría determinar el retardo mental en los pacientes distrofinopáticos (Moizard *et al.* 1998, Bardoni *et al.* 2000). La Dp 140 es una isoforma de la distrofina con expresión predominante durante el desarrollo fetal del cerebro. Su promotor y su primer exón se localizan en el intrón que separa al exón 44 del exón 45 del gen completo, que codifica a la isoforma muscular, una región frecuentemente deletada en pacientes distrofinopáticos. Los estudios citados mostraron que

existe una fuerte correlación entre la pérdida de la unidad transcripcional Dp 140 y el retardo mental en pacientes con BMD, aunque en menor grado en los afectados con DMD, pues los pacientes con inteligencia normal en ambas distrofinopatías no muestran deleciones en tal región. No obstante, la ausencia de transcritos de longitud completa de la distrofina en la BMD dificultan comprender el rol funcional de cada isoforma (Moizard *et al.* 1998).

### **Otras pruebas diagnósticas**

En muchas ocasiones, las manifestaciones clínicas no bastan para establecer el diagnóstico y se debe recurrir a otras pruebas confirmatorias, a saber: los niveles de enzimas séricas, la electromiografía, la patología del músculo y los estudios genético-moleculares (Emery 1993).

#### **A.- Enzimas séricas**

El indicador más utilizado es el nivel de creatina fosfotransferasa o creatina quinasa sérica (SCK). Esta enzima, que se produce en el músculo esquelético, cataliza la transferencia reversible de un grupo fosfato de la creatina fosfato al ADP, formando creatina y ATP (Murray *et al.* 1993). Los niveles séricos normales oscilan entre 22 y 198 U/L (Emery 1993).

En los pacientes con DMD estos niveles se encuentran considerablemente elevados, de 50 a 100 veces o más, incluso antes del nacimiento (Emery 1977) y se ha observado que ocurre también en otras distrofias musculares, como son la BMD, la necrosis muscular isquémica aguda y ocasionalmente en la fase aguda de la polimiositis (Emery 1993). Esto sucede porque

durante el proceso de degeneración muscular, la célula se rompe, liberando sus contenidos al flujo sanguíneo, lo que explica la elevación de los niveles de la SCK (Emery 1993).

Existen otras enzimas en suero que también se encuentran elevadas en los niños con DMD, sin embargo en menor grado que la SCK (Emery 1993). Algunas de ellas son la aldolasa, la piruvato quinasa, la anhidrasa carbónica III y la  $\beta$ -enolasa (Emery 1993). Desde el punto de vista clínico ha resultado imposible distinguir un fenotipo Duchenne de un Becker con base en los niveles séricos de varias de estas enzimas estudiadas.

### **B.- Electromiografía (EMG)**

La electromiografía es una técnica que permite evaluar la actividad eléctrica de las fibras musculares al contraerse, ofreciendo así, un indicio sobre la estructura y funcionamiento del tejido (Adams y Victor 1981). Las alteraciones detectadas no son específicas de ningún padecimiento en particular, pero permiten al especialista evaluar la severidad del daño que presenta el músculo involucrado en el padecimiento.

Concretamente, en las distrofinopatías, se reconocen dos tipos de alteraciones en la electromiografía: potenciales de acción reducidos y potenciales polifásicos más frecuentes de lo normal (Emery 1993). Posteriormente, en etapas avanzadas de la enfermedad donde el tejido adiposo y conectivo han sustituido al muscular, disminuye el número de unidades motoras y se detectan áreas de muy baja actividad o nula.

Como sucede con algunas pruebas confirmatorias, otras formas de distrofia muscular de la infancia y varias miopatías congénitas muestran una EMG usualmente indistinguible de aquella de la DMD (Emery 1993).

### C.- Citología muscular

Por medio de biopsias musculares se pueden obtener muestras de tejido muscular de pacientes con diversas miopatías (Edwards *et al.* 1980). En etapas tempranas de la DMD, la biopsia muestra fibras musculares de diferente tamaño, así como pequeños grupos de fibras necróticas en regeneración, sin embargo en fases más avanzadas, se observa que las fibras musculares necróticas han sido sustituidas por tejido conectivo y tejido adiposo (Emery 1993).

### D.- Transferencia de Western

Esta es la técnica más discriminante para el diagnóstico de las distrofinopatías. La prueba consiste en separar las proteínas presentes en la biopsia muscular mediante electroforesis, para luego transferirlas a una membrana de nitrocelulosa donde son incubadas con anticuerpos contra dominios específicos de la distrofina.

Los individuos no afectados presentan una banda de 427 kD correspondiente a la distrofina normal. Los pacientes con BMD por lo general tienen bandas que varían en tamaño o cantidad de acuerdo al tipo de mutación, mientras que la ausencia completa o casi completa de la proteína es característica de los pacientes con DMD (Hoffman *et al.* 1988, Emery 1993). Otra manera de estudiar la distrofina, ha sido por detección de rearrreglos estructurales en el gen de la proteína, mediante análisis del ARNm presente en linfocitos de sangre periférica (Roberts *et al.* 1991).

### Diagnóstico diferencial

Ciertas formas de distrofia muscular podrían confundirse con la DMD, entre ellas, algunas miopatías congénitas, la distrofia muscular espinal y varias distrofias de la infancia. (Emery 1993).

En general, las formas congénitas no causan confusión porque el daño es evidente desde el nacimiento o etapa perinatal, la hipotonía y debilitamiento muscular son severos y generalizados, lo mismo sucede con las miopatías congénitas (Emery 1993). Sin embargo, ocasionalmente, podrían surgir complicaciones en el momento de establecer el diagnóstico cuando los niveles de SCK en estas enfermedades son comparables al rango observado en la DMD. Un ejemplo de este tipo de enfermedades congénitas es la distrofia muscular congénita tipo Fukuyama (Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD) (MIM 253800, OMIM 2001), relativamente frecuente en Japón. Es una enfermedad de herencia autosómica recesiva, en la que además se presenta retardo mental profundo y difícilmente puede confundirse con una DMD ó BMD.

El gen responsable de la distrofia muscular de cinturas, autosómica recesiva, de la infancia (autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy of childhood (LGMD2C)) ha sido mapeado en la banda 13q12 (MIM 253700, OMIM 2001). Las manifestaciones clínicas son muy similares a la DMD, por lo que incluso se le conoce como "Duchenne-like" muscular dystrophy. Algunas veces, el diagnóstico puede llevar a confusión cuando solo un niño se ve afectado dentro de la familia; sin embargo, a nivel molecular se detecta que el problema es una mutación en el gen del gama-sarcoglicano (Noguchi *et al.* 1995), una proteína relacionada con la distrofina que es parte del complejo de las glicoproteínas asociadas a la distrofina, el cual se considerará con mas detalle en la sección 1.3.5.

Una variante de este tipo de distrofia, pero con manifestación adulta (LGMD2A), también ocasiona problemas de diagnóstico en algunos casos porque clínicamente es indistinguible de un Becker (Emery 1993). No obstante, el diagnóstico molecular revela que la LGMD2A es causada, a diferencia de la BMD, por una mutación en el gen de la enzima proteolítica calpaína-3 ubicada en el citoplasma de la fibra muscular (MIM 253600, OMIM 2001).

La polimiositis es un trastorno de etiología desconocida, en el cual, un proceso inflamatorio no supurativo causa daño muscular, manifestándose una debilidad intensa (Adams y Victor 1991). Los cambios inflamatorios observados en las biopsias, propios de la polimiositis, podrían ser similares a los hallados en algunos casos de distrofinopatías y si el diagnóstico se establece exclusivamente con base en estos hallazgos podría llevar a confusión.

Otra enfermedad que en ocasiones es difícil de distinguir de un Duchenne es la atrofia espinal tipo III (spinal muscular atrophy III (SMA III)) o enfermedad de Wohlfart-Kugelberg-Welander (MIM 253400, OMIM 2001). Aunque por lo general se observa asimetría en los músculos involucrados y ausencia de pseudohipertrofia, en ocasiones, no es tan claro el panorama por lo que se recomiendan estudios a nivel molecular para establecer el diagnóstico correcto.

En el caso del locus de la distrofina, diferentes tipos de mutación podrían interactuar con otros genes y factores ambientales dando lugar a un amplio espectro de discapacidades. Entre ellas, las propias de la DMD, pasando por formas más o menos severas como la BMD, hasta la condición de normalidad. Incluso se ha descrito una cardiomiopatía dilatada ligada al X, en la cual no se observa ningún problema a nivel de músculo esquelético, sin embargo, los niveles de distrofina a nivel de músculo cardíaco son casi indetectables. Esta enfermedad es provocada por

mutaciones en la región 5' del gen de la distrofina y podrían alterar de alguna manera el promotor para la síntesis de distrofina cardíaca (Towbin *et al.* 1993) (sección 1.3.5).

En cuanto a la BMD, se ha observado que en contraste con la DMD, tiene un amplio rango de expresión clínica, incluso dentro de la misma familia; la causa se desconoce. Una explicación podría ser una asociación ocasional con el Síndrome de Klinefelter (47, XXY), donde el paciente resulta heterocigota para la mutación y por tanto las manifestaciones clínicas son más leves (Suthers *et al.* 1989). La distribución del deterioro y debilitamiento a nivel muscular es muy similar al de la DMD. Se afectan de igual modo, inicialmente, los músculos flexores y los cuádriceps en las extremidades inferiores, y el serrato, los pectorales, los bíceps, los braquioradiales y los tríceps en las extremidades superiores. Los niveles de SCK alcanzan su pico máximo entre los 10 a 15 años, mientras que en la DMD se observan entre el primer y sexto año de vida. Sin embargo, los niveles por edad en ambas enfermedades muestran un traslape que impide una diferenciación clara entre ambas entidades, por lo que se sugiere para distinguirlos, tomar en cuenta la edad de pérdida de la capacidad ambulatoria y el análisis por electromiografía. Todo esto concuerda con que la detección de distrofina en tejido muscular es sin lugar a dudas el método indicado para distinguir ciertos casos, aunque nunca debe realizarse exclusivamente con base en estas determinaciones, ya que en algunos pacientes se han observado niveles sumamente reducidos de distrofina con un fenotipo BMD o IMD.

La importancia de tener un diagnóstico claro es válida también para poder brindar un adecuado consejo genético. Como se mencionaba, puede resultar complicado distinguir entre un BMD y un LGMDII. Por ejemplo, la hija de un padre afectado de LGMDII no tiene mayor riesgo de tener un hijo varón afectado, en cambio, la hija de un padre con BMD, podría tener un

50% de posibilidades de tener un hijo varón afectado si es portadora de la enfermedad (Emery 1993).

### **Mujeres afectadas con distrofinopatías**

Por lo general, las enfermedades recesivas ligadas al X no se manifiestan en mujeres; sin embargo, ocasionalmente aparecen portadoras con manifestaciones clínicas debido a aberraciones cromosómicas que involucran el cromosoma X o cuando el proceso normal de inactivación del cromosoma X es asimétrico en mujeres con cariotipo normal.

Se ha estimado que el 8% de las mujeres portadoras de distrofinopatías presentan síntomas, en grado variable, de la enfermedad (Moser y Emery, 1974). Como se mencionó antes, esto se debe probablemente al proceso aleatorio de inactivación que sufre normalmente uno de los cromosomas X, aunque en algunos casos se ha observado que no siempre es así, por ejemplo el porcentaje de células expresando el cromosoma X anormal parece ser concordante entre madres e hijas, en estos casos el proceso podría no ser totalmente aleatorio y estar bajo control genético (Moser y Emery 1974, Azofeifa *et al.* 1995, Yoshioka *et al.* 1998).

Se ha observado que en las mujeres portadoras con síntomas clínicos existen mosaicos en la expresión de distrofina a nivel celular, mientras que en los casos de portadoras asintomáticas no se han encontrado (Emery 1993).

Otro caso descrito en la literatura es el de gemelas monocigóticas discordantes (Richards *et al.* 1990, Abbadi *et al.* 1994). Según se sabe, el proceso de lionización ocurre en etapas tempranas del desarrollo embrionario y probablemente durante el proceso de fisión gemelar, uno

de los embriones recibe mayor proporción de células en las que el X mutado se encuentra activo y por tanto resulta afectada.

Otras mujeres podrían presentar la enfermedad debido a aberraciones cromosómicas, tales como:

- translocaciones entre un autosoma y el cromosoma X, donde el punto de ruptura ocurre en el gen de la distrofina (Verellent *et al.* 1978). Hecho que arrojó luz en la identificación del locus de las distrofinopatías, como se explicará posteriormente en el siguiente apartado. Aquellas células donde se inactiva el X mutado son seleccionadas negativamente, ya que el proceso de inactivación involucra el segmento autosómico translocado dando lugar a una monosomía parcial funcional, por tanto, se da una selección de líneas celulares (Cockburn *et al.* 1992).
- Monosomía X (45, X) ó síndrome de Turner, en los casos en que el único cromosoma X es portador de un alelo mutado en el locus de la distrofina (Chelly *et al.* 1986).
- Mosaico X0 (Bortolini *et al.* 1986), cuando el X es portador de una mutación en el gen de la distrofina.
- Mujeres con cariotipo XY, donde el X se encuentra mutado.
- Disomía uniparental, fenómeno en el que la hija hereda los dos cromosomas X de la madre. Si la madre es portadora y se transmite el cromosoma mutado, la condición de homocigosis provoca que se manifieste la enfermedad (Quan *et al.* 1997).

#### 1.3.4 TERAPIA

Durante los últimos veinte años se ha logrado un gran avance en el conocimiento de las bases moleculares de la distrofia muscular. A pesar de esto, en el momento actual no existe

de los embriones recibe mayor proporción de células en las que el X mutado se encuentra activo y por tanto resulta afectada.

Otras mujeres podrían presentar la enfermedad debido a aberraciones cromosómicas, tales como:

- translocaciones entre un autosoma y el cromosoma X, donde el punto de ruptura ocurre en el gen de la distrofina (Verellent *et al.* 1978). Hecho que arrojó luz en la identificación del locus de las distrofinopatías, como se explicará posteriormente en el siguiente apartado. Aquellas células donde se inactiva el X mutado son seleccionadas negativamente, ya que el proceso de inactivación involucra el segmento autosómico translocado dando lugar a una monosomía parcial funcional, por tanto, se da una selección de líneas celulares (Cockburn *et al.* 1992).
- Monosomía X (45, X) ó síndrome de Turner, en los casos en que el único cromosoma X es portador de un alelo mutado en el locus de la distrofina (Chelly *et al.* 1986).
- Mosaico X0 (Bortolini *et al.* 1986), cuando el X es portador de una mutación en el gen de la distrofina.
- Mujeres con cariotipo XY, donde el X se encuentra mutado.
- Disomía uniparental, fenómeno en el que la hija hereda los dos cromosomas X de la madre. Si la madre es portadora y se transmite el cromosoma mutado, la condición de homocigosis provoca que se manifieste la enfermedad (Quan *et al.* 1997).

#### 1.3.4 TERAPIA

Durante los últimos veinte años se ha logrado un gran avance en el conocimiento de las bases moleculares de la distrofia muscular. A pesar de esto, en el momento actual no existe

lamentablemente ningún tratamiento definitivo para las DMD/BMD. Sin embargo, existen algunos fármacos como la prednisona (Pandya *et al.* 1996) y el oxandrolone (Fenichel *et al.* 1997), que brindan ciertos beneficios de carácter paliativo al paciente, entre ellos, aumento en la fuerza muscular y en algunos casos, retardo en la progresión de la enfermedad. No obstante, la terapia farmacológica más promisoriosa en el momento actual es el uso de antibióticos glicosilados. Esto se descubrió a partir del tratamiento de la fibrosis quística, cuando los investigadores trataban de suprimir mutaciones sin sentido en el gen regulador de la conductancia transmembranal (Allamand y Campbell 2000). En ratones mdx, mutantes naturales para el gen de la distrofina (Karpati *et al.* 1999, Allamand y Campbell 2000), se observó la restauración de los niveles de distrofina a un 10-20% de lo normal, luego de inyecciones subcutáneas de gentamicina. Este nivel fue suficiente para mejorar la funcionalidad de los músculos así tratados (Barton-Davis *et al.* 1999).

Esta terapia es posible para el 5-15% de los pacientes con DMD que presentan mutaciones sin sentido, es decir, aquellas que introducen codones de terminación prematura en el proceso de síntesis protéica. Debido a la prolongada vida media de la distrofina, se espera que los beneficios del tratamiento sean de larga duración y no requieran inyecciones frecuentes. Sin embargo, resta continuar estudiando los efectos secundarios de los antibióticos, como son la nefrotoxicidad y la ototoxicidad.

También se está experimentando con sustancias que estimulen la sobreexpresión de utrofina, una proteína homóloga a la distrofina asociada igualmente a moléculas del sarcolema, cuyo gen se ha mapeado en la región 6q24 (Tinsley *et al.* 1993). La utrofina se expresa en todo tipo de tejidos, incluyendo músculo esquelético y sorprendentemente alcanza su nivel de expresión más

alto durante el período fetal, razón por la que se le ha considerado una forma embrionaria de la distrofina (Ahn & Kunkel 1993).

En ratones se ha demostrado que la sobreexpresión de utrofina ejerce un efecto compensatorio a la falta de distrofina. (Gilbert *et al.* 1998, citado por Allamand y Campbell 2000). La herregulina es una de las sustancias que tiene la capacidad potencial de estimular la sobreexpresión de utrofina, sin embargo, su utilización aún continúa en estudio.

#### 1.3.4.1 TERAPIA BASADA EN LA BIOTECNOLOGÍA

La terapia basada en la biotecnología se encuentra aún en fase experimental, sin embargo, debido a la etiología de las distrofinopatías es probablemente la más esperanzadora para estos pacientes. Las técnicas en estudio se pueden dividir en dos grupos : técnicas *ex vivo*, que involucran el trasplante celular para sustituir el tejido afectado y las técnicas *in vivo*, donde se reemplaza o modifica el gen dañado en las células somáticas del paciente, de manera que pueda cumplir su función normal.

##### A.- Técnicas *ex vivo*

##### Transferencia de mioblastos

Los mioblastos actúan como una fuente de tejido muscular nuevo para reparar aquel que se encuentra dañado. En base a esto se diseñó un procedimiento que consiste en extraer tejido muscular de un donador y dejarlo crecer en un medio de cultivo de manera que las células sateliticas proliferen para generar mioblastos. Estas células son inyectadas directamente en el músculo del paciente para que se fusionen con sus fibras musculares. En algunos estudios con

ratones mdx se observó que la sobrevivencia de las células transplantadas, es sumamente baja, alrededor de un 1%, sin embargo fueron capaces de sintetizar distrofina (Gussoni *et al.* 1992). Los problemas asociados con esta técnica se basan fundamentalmente en que el efecto de la inyección es muy localizado, la eficiencia es baja y probablemente actúan barreras inmunológicas. Incluso se ha descrito que la distrofina por sí misma parece inducir rechazo a los mioblastos transplantados en el ratón mdx, ya que es un antígeno desconocido para el organismo (Allamand y Campbell 2000).

### **Transplante de células precursoras**

En estudios recientes se ha observado que el trasplante de médula ósea en ratones mdx, favorece la presencia de células precursoras en músculo esquelético (Gussoni *et al.* 1999), expresándose incluso distrofina aunque en niveles sin ningún beneficio desde el punto de vista clínico. No obstante, el estudio y optimización de estas técnicas prodría ser importante si se dirige a grupos musculares específicos.

### **B.- Técnicas *in vivo***

La manipulación o reemplazo del gen mutado resulta la técnica más atractiva para los pacientes con DMD, no obstante, el tamaño del ADNc de la distrofina (14 kb) ha imposibilitado su inserción en vectores convencionales (Karpati *et al.* 1999). Por esta razón, se ha experimentado con minigenes basados en proteínas semifuncionales observadas en pacientes con BMD, como el descrito por England *et al.* (1990), cuyo tamaño los hace mucho más fáciles de manejar. Los experimentos transgénicos realizados con modelos animales como el ratón mdx

muestran que la introducción de transcritos parciales o completos de distrofina restaura parcialmente la expresión de distrofina, de modo que con un 20% de los niveles de expresión normal es suficiente para prevenir la patología muscular (Phelps *et al.* 1995).

Actualmente se utilizan tres tipos de genes transferibles (Karpati *et al.* 1999):

- ADNc de longitud completa (13.9 kb).
- Gen truncado (ADNc) de 6.3 kb.
- Minigen (ADNc) al cual se le ha eliminado la región tipo bastón a excepción de una secuencia que codifica una repetición simple tipo espectrina.

Los únicos vectores capaces de abarcar el gen completo son dos adenovirus modificados (AV y VLCAV) a los que se les han removido sus genes virales reteniendo únicamente las secuencias necesarias para la expresión del gen. Este tipo de vectores tiene la ventaja de que aún cuando se torne patogénico, la enfermedad se manifiesta de manera leve.

Otros vectores utilizados son los virus adenoasociados (AAV). Entre sus ventajas se puede mencionar que no son patogénicos, tienen la capacidad de infectar fibras musculares tanto maduras como inmaduras, su inserción puede ser controlada y además permiten la expresión del transgen por períodos prolongados. No obstante, la poca capacidad de clonación (5kb) restringe su uso únicamente a los minigenes mencionados previamente.

Otra alternativa que se está considerando en el momento actual, es el uso de oligonucleótidos quiméricos o quimeroplastos, los cuales han sido empleados con el fin de corregir mutaciones de punto directamente en el gen, valiéndose del mecanismo endógeno de reparación del ADN (Kaufman 1999). Dos estudios demostraron que la inyección intramuscular de quimeroplastos,

tanto en el ratón mdx como en el modelo distrofinopático golden retriever (Karpati *et al.* 1999, Allamand & Campbell 2000), efectivamente restablecían la expresión de la distrofina (Allamand y Campbell 2000). A pesar de ello, el efecto de la inyección se reduce al sitio de la misma, por lo cual es necesario mejorar el sistema de liberación de los oligonucleótidos para que el resultado no sea tan localizado.

### 1.3.5 EL GEN DE LA DISTROFINA

#### Localización en el genoma

La descripción de diversos casos de niñas con un fenotipo similar a la DMD durante los años 70 (Verellent *et al.* 1978, Lindenbaum *et al.* 1979) constituyó el primer indicio sobre la localización del gen de la distrofina. Mediante análisis citogenéticos se demostró que estas pacientes eran portadoras de una translocación recíproca entre un autosoma y el cromosoma X y aunque los autosomas involucrados eran diferentes, siempre el punto de ruptura en el cromosoma X se situaba en la banda 21 del brazo corto (Xp21). Esto hizo sospechar a los investigadores que probablemente el gen normal se veía afectado de algún modo por esta ruptura, dando lugar a la enfermedad. Posteriormente, se confirmó mediante análisis de ligamiento con RFLP's la localización en la banda p21 (Murray *et al.* 1982).

De esta manera a través de estudios citogenéticos y de ligamiento, en 1987 Koenig y colaboradores clonaron y secuenciaron por completo el ADNc del gen de la distrofina (Figura 2).

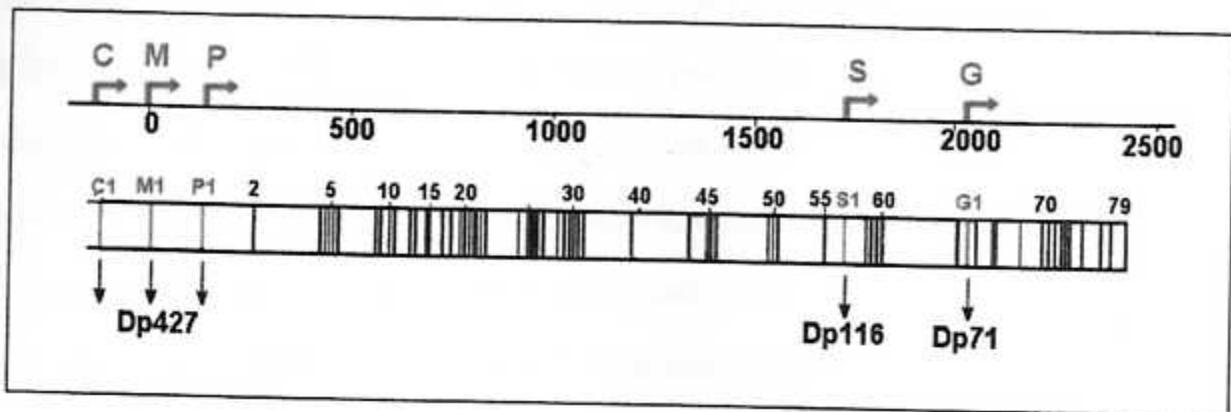


Figura 2. Diagrama de la estructura del gen de la distrofina. En la línea superior se representa la ubicación de los cinco promotores principales que dan lugar a isoformas tejido-específicas de la proteína. Tres distrofinas de longitud completa, la cortical (C), la muscular (M), la de las células de Purkinje (P) y otras dos de menor tamaño, la de las células de Schwan (S) y la general o glial (G). La siguiente línea es una representación esquemática de los 79 exones que conforman el gen de la distrofina, las barras verticales corresponden a la posición relativa de los exones. Cada isoforma utiliza su primer exón propio, según se indica con las barras de color azul (modificado de Strachan y Ried 1999).

### Estructura molecular y productos

El gen de la DMD con un tamaño de 23 Mb, constituye el gen humano más grande que se haya identificado hasta la fecha. Consta al menos de 79 exones (Koenig *et al.* 1987) y codifica un transcrito editado de ARNm de 14 kb. Fue el primero en ser aislado mediante clonaje posicional o genética reversa (Koenig *et al.* 1987), permitiendo así la síntesis de su producto que se denominó distrofina (Hoffman *et al.* 1987).

La distrofina tiene un peso de 427 kD y consiste de 3865 aminoácidos. Existen isoformas que se originan ya sea por editaje alternativo del ARNm o por la acción de distintos promotores con especificidad tisular (Chelly *et al.* 1990) (Figura 3). Se han identificado tres promotores que controlan la síntesis de proteínas de longitud completa, según lo esperado de acuerdo a la región codificante total del gen, y dos promotores que mediante su acción generan isoformas de menor tamaño abarcando la región carboxilo terminal. Cada uno de estos promotores incluye su primer exón propio (Tinsley *et al.* 1993).

El promotor cortical o del cerebro se encuentra activo en las células neuronales (Chelly *et al.* 1990). El primer exón propio de este promotor contiene el sitio de inicio de la transcripción y se encuentra 90 kb corriente arriba del promotor del músculo, su corto marco de lectura empalma con el segundo exón común a todas las formas de longitud completa (Ahn y Kunkel 1993). Este promotor no posee elementos comunes de transcripción en su sitio de inicio, tales como las cajas TATA.

El promotor del músculo se encuentra activo en las células miogénicas y gliales primarias y es típico de un gen muscular (Ahn y Kunkel 1993).

El promotor de las células de Purkinje junto con su primer exón se localiza entre el promotor del músculo y el segundo exón de la distrofina, se expresa en las neuronas cerebelares de Purkinje. Igual que en los promotores anteriores el marco de lectura abierto empalma con el segundo exón (Tinsley *et al.* 1993).

Un cuarto promotor se encuentra entre los exones 55 y 56, en su primer exón propio se encuentra un pequeño marco de lectura abierto que empalma "en marco" con el exón 56. Codifica un transcrito de 5.2 kb que da lugar a una distrofina de 116 kD (Dp 116). Esta pequeña

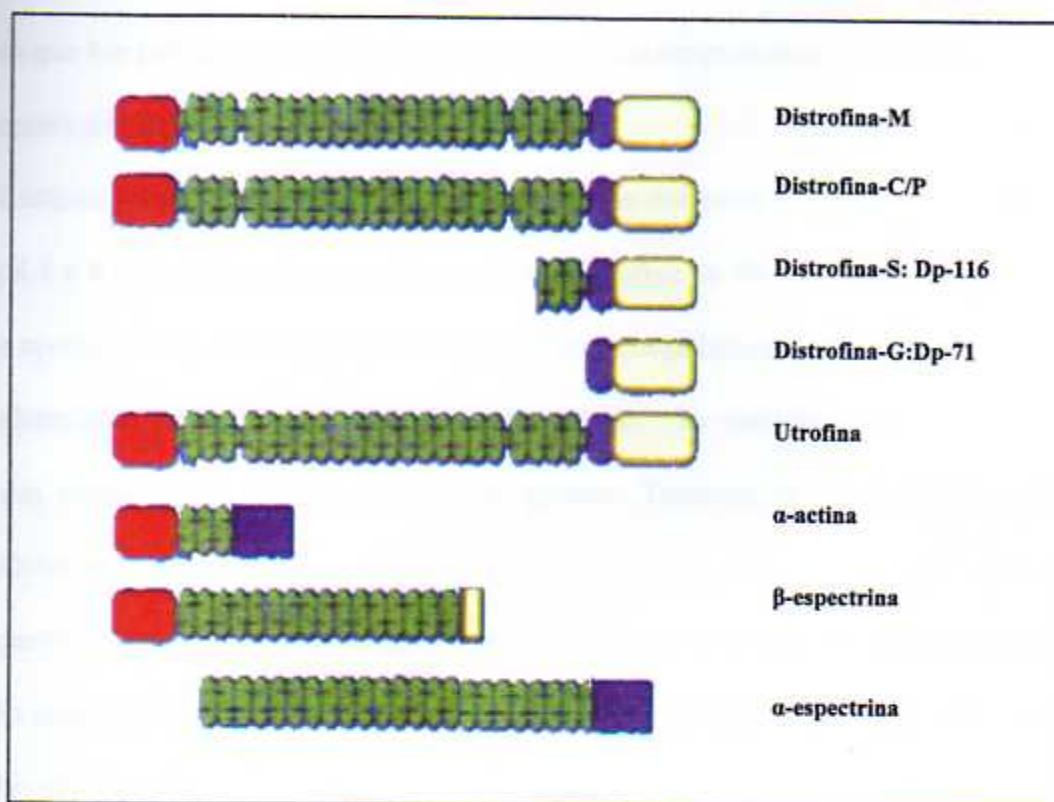


Figura 3. La distrofina y su homología con otras proteínas. Se representan las cinco isoformas principales de la distrofina, la muscular (M), la cortical (C), la de las células de Purkinje (P), la de las células de Schwann (S) ó Dp-116 y la glial (G) ó Dp 71. Los cuatro dominios estructurales que la conforman: el dominio de unión a la actina (rojo), la región interna "tipo bastón" (verde), la región rica en cisteína (morado) y el extremo C-terminal (amarillo) son compartido con diversas proteínas citoesqueléticas. (Modificado de Ahn y Kunkel 1993).

distrofina se localizó en la submembrana de la capa externa de cada célula de Schwann, en el nervio ciático, y predomina fundamentalmente en el nódulo de Ranvier (Imamura *et al.* 2000). Las células de Schwann están involucradas en la conducción de los nervios periféricos, así que la

Dp 116 podría intervenir en el mantenimiento de esta conducción, aunque no se ha demostrado puesto que los pacientes con deleciones en esta región no presentan problemas de conducción o neuropatía periférica (Ahn y Kunkel 1993).

El último promotor se ubica 8 kb corriente arriba del exón 63 y da lugar a un transcrito de entre 4.8 a 6.5 kb. El producto protéico es una distrofina de 70.8 kD (DP 71) conocida también como apodistrofina-1 (Tinsley *et al.* 1993), que se expresa básicamente en todo tipo tisular, pero es indetectable en músculo totalmente diferenciado. Se encuentra en mayor proporción en cultivos celulares de astrocitos y células glioma. También se ha descrito su localización subcelular en el cerebro.

Aparte de estos cinco promotores, existen al menos tres tipos de editaje alternativo en la región carboxilo terminal que dan lugar a otras isoformas de la distrofina (Ahn y Kunkel 1993, Tinsley *et al.* 1993).

### **Estructura molecular y función de la distrofina**

El análisis de la secuencia de aminoácidos de la distrofina revela una proteína del citoesqueleto tipo "bastón", de 150 nm de longitud, constituida por cuatro dominios principales (Koenig y Kunkel 1990). Estos dominios comparten similitudes con la  $\alpha$ -actina y la  $\beta$ -espectrina, las cuales cumplen funciones estructurales en procesos estáticos y dinámicos en todos los tipos celulares (Hammonds 1987).

Las cuatro dominios son: la región amino-terminal ( $\text{NH}^{3+}$ ), que se asocia con la actina o una proteína tipo actina. El dominio tipo "bastón", altamente conservado, que consta de largas hileras flexibles constituidas por 24 repeticiones tipo alfa-hélice de 109 aminoácidos cada una. Una

región de 150 aminoácidos, rica en cisteína, similar a ciertas moléculas con actividad de unión de  $\text{Ca}^{+2}$ , sin embargo en la distrofina aún no se ha demostrado esta capacidad. Por último, el extremo carboxilo terminal ( $\text{COO}^-$ ), codificado por una región del gen altamente conservada y con editaje alternativo que podría interactuar con proteínas integrales de membrana.

Zubrzycka-Gaarn y colaboradores (1988) emplearon anticuerpos monoclonales contra regiones específicas de la distrofina, para observar *in situ* su ubicación en músculo esquelético y descubrieron que esta proteína se encuentra fuertemente asociada al sarcolema; sin embargo, no pudieron detectar la proteína en aquellas fibras musculares provenientes de pacientes con ciertas miopatías. Además, propusieron que la distrofina podría mantener la estructura del sarcolema mediante el anclaje de elementos del citoesqueleto a la superficie de la membrana.

Posteriormente, por medio de análisis inmunohistoquímicos se determinó que la distrofina se localiza específicamente en la cara citoplasmática de la membrana de las células musculares y en la membrana de las especializaciones postsinápticas de las neuronas (Ahn y Kunkel 1993).

En 1989 se estableció que la distrofina está ligada, a lo que en ese momento se pensó, era una glicoproteína integral de membrana y que efectivamente participa en el mantenimiento de su estabilidad (Campbell y Kahl 1989).

Actualmente se sabe que la distrofina está asociada a un complejo oligomérico compuesto por proteínas de membrana periféricas e integrales que constituyen una unión estructural entre la F-actina del citoesqueleto y la matriz extracelular. Este complejo se denomina complejo de glicoproteínas asociadas a la distrofina (DAGC) (Campbell y Kahl 1989) (Figura 4). Las proteínas que conforman este complejo están estructuralmente organizadas en tres distintos sub-complejos (Cohn y Campbell 2000) :

- a) Proteínas citoesqueléticas: distrofina y sintrofinas.
- b) Distroglicanos (subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ ): localizados en el sarcolema.
- c) Sarcoglicanos (subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$ ) y el sarcospano.

Además, otras proteínas extracelulares e intracelulares se encuentran asociadas también al DAGC, aunque de manera más débil, entre ellas la sintasa de óxido nítrico, la distrobrevina, la caveolina 3 y la laminina-2.

Las interacciones entre los subcomplejos son muy importantes para las funciones normales del sarcolema, así como para la estabilidad de las membranas durante el proceso de contracción de las miofibras (Cohn y Campbell 2000). Como se verá en el siguiente apartado, diversas formas de distrofias musculares tienen como defecto primario mutaciones en los genes que codifican para los componentes de este complejo, lo cual explica en gran medida los traslapes de sintomatología observados en algunas distrofias musculares.

Se ha demostrado que el extremo amino-terminal de la distrofina interactúa directamente con la F-actina en una forma lateral y extendida similar a muchas proteínas de unión lateral tipo actina. Esta interacción ocurre a través de un grupo de repeticiones básicas en el dominio bastón, mediante una interacción electrostática. La utrofina, una proteína homóloga a la distrofina, carece de este dominio bastón con actividad de unión (Tinsley *et al.* 1993, Amann *et al.* 1998).

El extremo carboxilo-terminal por su parte, se une directamente al extremo  $\text{COO}^-$  de la subunidad  $\beta$  del distroglicano, una proteína integral de membrana de hélice simple (Cohn y Campbell 2000). La subunidad  $\beta$  mantiene unida la subunidad  $\alpha$  a la membrana, y ésta a su vez sirve como receptor de laminina-2. De esta manera se completa la conexión estructural entre el citoesqueleto de actina y la matriz extracelular (Ervasti y Campbell 1991).

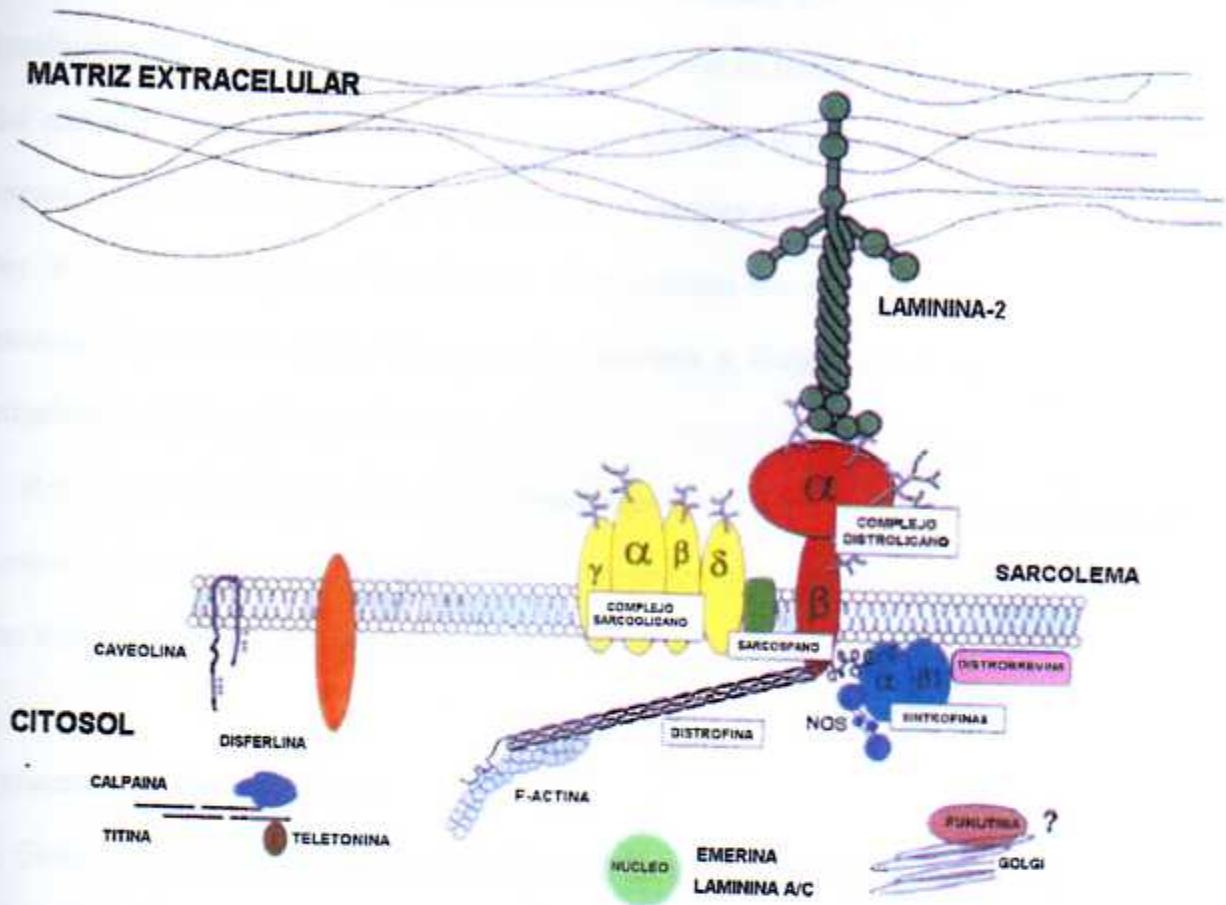


Figura 4. Organización molecular de los componentes integrales y periféricos del complejo de glicoproteínas asociadas a la distrofina (DAGC) (modificado de Cohn y Campbell 2000).

La ausencia de distrofina en los pacientes con distrofia muscular de Duchenne, afecta también al complejo DAG, de forma que las proteínas que lo componen se encuentran igualmente reducidas. En el caso de la distrofia muscular de Becker, la expresión de las proteínas del complejo DAG se encuentra sólo levemente afectada, lo cual refuerza la idea de que una expresión normal es necesaria para proteger a la membrana de la miofibra del daño producido por la contracción muscular. No obstante, el mecanismo por el cual la ausencia de distrofina provoca degeneración de la fibra muscular, necrosis y fibrosis no se conoce por completo actualmente (Cohn y Campbell 2000).

Recientemente se ha descubierto que el complejo DAG podría también estar involucrado en la comunicación celular, según se ha observado existe una fuerte interacción por parte del mismo con algunas moléculas de señal conocidas (Cohn y Campbell 2000).

### **Naturaleza de las mutaciones**

Como se citó anteriormente, las mutaciones en los genes que codifican las proteínas asociadas al complejo DAG son responsables de diversas distrofias musculares, incluyendo la distrofina, responsable de las DMD/BMD. Por ejemplo, las formas clásicas de distrofia muscular de cinturas autosómica recesiva se relacionan con las mutaciones en los sarcoglicanos. Las mutaciones en la cadena de laminina- $\alpha$  2 son reponsables de la distrofia muscular congénita y las alteraciones en el gen de la subunidad  $\alpha$ -7 de integrina, un receptor transmembrana de laminina, son responsables a su vez de la miopatía congénita (Cohn y Campbell 2000). No obstante, hasta la fecha, no se han relacionado mutaciones en los genes del distroglicano, del sarcospano y de las sintrofinas con ninguna distrofia muscular (Cohn y Campbell 2000).

De igual modo, las demás proteínas relacionadas con el DAGC a nivel del sarcolema se encuentran involucradas con el resto de las distrofias musculares.

En cuanto a las distrofinopatías, se han encontrado varios tipos de mutaciones en el gen de la distrofina. Utilizando sondas de ADNc derivadas del transcrito de 14 kb y por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (sección 1.3.6), se ha observado que aproximadamente el 65% de los casos de DMD y BMD se deben a deleciones (Darras *et al.* 1988, Gillard *et al.* 1989). Los demás casos se generan por otro tipo de alteraciones tales como duplicaciones (5%) (Hu *et al.* 1990, Hiraishi *et al.* 1992), mutaciones de punto (Tuffery *et al.* 1996, Roest *et al.* 1996) e inversiones (Baxter *et al.* 1997).

Las deleciones pueden ocurrir en cualquier región a lo largo del gen, sin embargo, no se encuentran aleatoriamente distribuidas sino que se agrupan en dos puntos principales de alta frecuencia de deleciones. En el 80% de los casos las deleciones se encuentran aproximadamente a 1200 kb del extremo 5', entre los exones 45-55 y en el 20% restante se localizan en la región proximal, a 500 kb del extremo 5', abarcando los primeros 20 exones (Emery 1993, ). La región central que comprende el intrón 44, el exón 45 y el intrón 45, una secuencia de aproximadamente 200 kb, representa el principal punto de ruptura en el gen de la distrofina (Baumbach *et al.* 1989).

Estos puntos de ruptura corresponden a regiones donde ocurre con alta frecuencia recombinación intragénica. La tasa de recombinación estimada para este gen es relativamente alta (11%), cinco veces más de lo esperado en relación con otros genes humanos (Oudet *et al.* 1991, 1992). El patrón de agrupación que presentan los puntos de fractura se debe probablemente, tanto a la recombinación homóloga como no homóloga, dada la alta frecuencia

de deleciones y la considerable heterogeneidad de las zonas de ruptura (Gillard *et al.* 1989). La alta tasa de deleciones se encuentra también relacionada con la enorme magnitud del gen, que influye en el mantenimiento adecuado de la duplicación, la transcripción y el editaje. Así mismo, su gran tamaño lo hace más susceptible al daño por agentes mutagénicos. (Emery 1993).

Se ha observado que no existe correlación entre el tamaño de las deleciones y la severidad del diagnóstico; incluso se ha descrito una gran deleción de 5106 pb en la región central del gen de un paciente y éste presentaba una distrofia del tipo Becker (England *et al.* 1990). Además de esto, las secuencias deletadas en pacientes con DMD a menudo se traslapan con las deleciones observadas en los pacientes con BMD (Emery 1993).

En vista de lo anterior, se ha sugerido que posiblemente las deleciones que alteran el marco de lectura traduccional, generan una distrofina ya sea alterada, muy pequeña o inexistente y por tanto el fenotipo es más severo. Esto explicaría la diferencia de severidades en los síntomas entre la DMD y la BMD. En las deleciones en que el marco de lectura resulta inalterado, se produce una proteína reducida en tamaño aunque funcional, de este modo las manifestaciones clínicas serían menos severas, como ocurre en la BMD (Malhotra *et al.* 1988).

Sin embargo, se ha descubierto que las deleciones con alteración del marco de lectura ocurren también en pacientes con el fenotipo Becker, indicando que posiblemente existe un mecanismo alternativo que da lugar a un distrofina semifuncional. Este mecanismo podría ser entre otros, un editaje alternativo, un nuevo codón de inicio para la traducción (Malhotra *et al.* 1988) o incluso el salto de un exón debido a una mutación que rompe una secuencia de consenso para el editaje (Shiga *et al.* 1997). A pesar de esto, la hipótesis de la conservación del marco de lectura se mantiene para el 90% de los casos de distrofia muscular de Becker (Koenig *et al.* 1989).

En algunos de los pacientes que comparten deleciones idénticas, se ha observado variabilidad fenotípica. Esta heterogeneidad puede deberse a la composición genética del paciente que influiría por ejemplo en la capacidad de regeneración muscular, la destrucción de fibras musculares dañadas, o en la respuesta celular a otras hormonas (Emery 1993).

### 1. 3. 6 TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL DIAGNOSTICO DE DISTROFINOPATÍAS Y DETECCIÓN DE PORTADORAS

Las pruebas directas a nivel de ADN revelan, en la mayoría de los casos, el defecto primario involucrado en el padecimiento y permiten por lo tanto, confirmar con un alto grado de certeza el diagnóstico. Inicialmente, se utilizaron polimorfismos de longitud en fragmentos de restricción (RFLP's) identificados mediante clones genómicos aleatorios, ligados al sitio Xp21 (Bakker *et al.* 1985). Mediante los RFLP's se evalúa la probabilidad de que el alelo observado esté en fase cis con la deleción (Ward *et al.* 1989), sin embargo, este método tiene el inconveniente de que la recombinación meiótica altera los haplotipos estudiados, de manera que sólo son informativas aquellas meiosis en las que no ha ocurrido el proceso de recombinación.

Años después, con la identificación y clonaje del gen (Koenig *et al.* 1987), fue posible la elaboración de sondas de ADNc para la totalidad de los exones, las cuales permitieron detectar directamente las deleciones en los pacientes mediante transferencias de Southern. Las sondas revelan con precisión el sitio de la mutación, de manera que el problema de la recombinación meiótica del que sufre el análisis con RFLP's desaparece, a pesar de ello, esta técnica requiere de mucho tiempo, es tediosa y se necesita de la disponibilidad de algún isótopo para llevarla a cabo.

Por esta razón, hoy en día se utiliza con más frecuencia la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una técnica basada en la amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos (Saiki *et al.* 1985). La PCR es un método sencillo, rápido, requiere cantidades mínimas de ADN y usualmente no conlleva el riesgo de trabajar con materiales radioactivos. Su aplicación en el diagnóstico de la DMD se inició en 1988 por Chamberlain y colaboradores, quienes resolvieron el problema de que cuando se analizan genes o transcritos muy grandes se requieren múltiples PCRs para identificar el cambio de bases o la delección específica, desarrollando una variante de la técnica denominada PCR-múltiplex, en la cual, varias regiones del gen de la distrofina coamplifican en una única reacción (Chamberlain *et al.* 1988, Chamberlain *et al.* 1990).

Chamberlain diseñó un grupo de 9 pares de imprimadores con el cual se logra amplificar simultáneamente segmentos de 9 exones. Cuando alguna de las secuencias codificantes está deletada, los imprimadores correspondientes no tienen un sitio complementario en el gen, y no se puede generar ningún amplificado a partir de la muestra del paciente, razón por la cual no se observa producto de amplificación en el gel. De esta manera se consigue detectar más del 80% de las delecciones, porcentaje que se ha logrado incrementar al 98% agregando otros 9 pares de imprimadores adicionales diseñados por Beggs y colaboradores en 1990 (Beggs *et al.* 1990).

Luego de identificar la delección en el paciente, el paso lógico a seguir es la determinación del estado en aquellas mujeres de la familia que podrían ser portadoras según su relación con el paciente. Esta tarea no es fácil y la dificultad para determinar esta condición se refleja en el gran número de técnicas que se han utilizado, con mayor o menor éxito para este propósito. Algunas de ellas se basan en el efecto de dosis génica, como por ejemplo la transferencia de Southern (Darras *et al.* 1988, Yamagishi *et al.* 1996) y el PCR cuantitativo (Prior *et al.* 1990, Ishii *et al.*

1992, Ioannou *et al.* 1992, Pastore *et al.* 1996). Otro método conocido es el FISH (hibridación fluorescente *in situ*), en el cual se emplean diversos tipos de sondas para la detección de deleciones, por ejemplo, cósmidos (Ried *et al.* 1990, Tocharoentanaphol *et al.* 1994, Voskova-Goldman *et al.* 1997) y fragmentos de amplificación correspondientes a la región deletada (Calvano *et al.* 1997).

La técnica del PCR cuantitativo con análisis de dosis fluorescente ha sido una de la más exitosas (Schwartz *et al.* 1992, Yau *et al.* 1996, Mansfield *et al.* 1993). El principio fundamental de esta técnica reside en ajustar la reacción de PCR a la fase de amplificación logarítmica, para obtener un producto proporcional al número de moléculas iniciales de la región de ADN de interés.

Para detectar las diferencias en los productos de amplificación se requiere un método preciso y sensible que permita detectar la cantidad de amplificado. Anteriormente se utilizaba la incorporación de radioisótopos durante el proceso de amplificación y la tinción con bromuro de etidio. Actualmente, es más aceptado el marcaje fluorescente, dada la posibilidad de detectar la señal mediante el uso de un secuenciador automático. Esta técnica ofrece ventajas tales como rápido análisis, automatización, alta resolución, resultados cuantitativos y cualitativos, además de consumo mínimo de muestra y reactivos.

## OBJETIVOS

### A.- General:

- Iniciar el estudio molecular de las distrofinopatías en Costa Rica.

### B.- Específicos:

- Detectar deleciones en el gen de la distrofina en pacientes clínicamente distrofinopáticos mediante la implementación de la técnica del PCR-multiplex; contribuyendo así al refinamiento del diagnóstico clínico.
- Determinar la dosis génica en posibles portadoras de deleciones, por medio de electroforesis capilar fluorescente y poder así ofrecer consejo genético.

## 2 MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 TAMIZAJE DE DELECCIONES

#### 2.1.1 Recolección de muestras (los pacientes)

Para iniciar el estudio, se analizó la historia clínica de pacientes diagnosticados con distrofia muscular en el Hospital Nacional de Niños (HNN). Veinticinco de ellos presentaron una clínica compatible con el fenotipo distrofinopático, así que fueron reevaluados por un médico genetista en la Unidad de Genética y Bioquímica del HNN, además de cuatro pacientes adicionales localizados mediante el registro de distrofias del Centro Nacional de Rehabilitación (CENARE) y otros dos referidos por particulares.

Finalmente, veintisiete familias fueron incluidas en el estudio. Se les informó de las condiciones del mismo y accedieron a participar, firmando previamente una fórmula de consentimiento. A cada uno de los probandos, así como a las madres, hermanas y en algunos casos otros parientes que asistieron a la cita, se les extrajo una muestra de sangre (10ml en vacutainer con EDTA ) para los estudios de ADN, sumando un total de 95 muestras.

Los análisis moleculares se efectuaron en el Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) de la Universidad de Costa Rica.

#### 2.1.2 Extracción del ADN

Los ADNs se extrajeron con el método de sales (Miller *et al.* 1988), el cual consiste de los siguientes pasos:

## I.

a. Colocar en un tubo cónico de 50 ml (ej. Falcon):

- 10 ml de sangre
- 30 ml de buffer de lisis

b. Mezclar cuidadosamente.

c. Incubar en hielo por 30'.

d. Centrifugar 10'/1200 rpm/4°C (RCF 296xg).

## II.

a. Verificar si en el fondo se distingue el botón de leucocitos.

b. Descartar el sobrenadante en un recipiente para desechos de sangre.

c. Añadir 10 ml de buffer de lisis.

d. Resuspender el botón de leucocitos.

e. Centrifugar 10'/1200 rpm/4°C (RCF 296xg).

## III.

a. Descartar el sobrenadante en el recipiente de desechos de sangre.

b. Añadir 5 ml de buffer SE

c. Resuspender el botón de leucocitos.

d. Centrifugar 10'/1200 rpm/4°C (RCF 296xg)..

## IV.

- a. Descartar el sobrenadante en el recipiente de desechos de sangre (el botón resultante se puede almacenar a  $-70^{\circ}\text{C}$  para continuar otro día, o se puede seguir con el proceso inmediatamente).
- b. Añadir 5 ml de buffer SE.
- c. Resuspender el botón de leucocitos.
- d. Añadir 40  $\mu\text{l}$  de proteinasa K (concentración: 10mg/ml).
- e. Mezclar cuidadosamente.
- f. Agregar 250  $\mu\text{l}$  de SDS (20%).
- g. Mezclar cuidadosamente.
- h. Incubar en baño maría a  $37^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche, hasta que se complete la proteólisis.

## V.

- a. Al día siguiente agregar 1.4 ml de NaCl 6M a los 5 ml de solución de proteólisis.
- b. Agitar 15'' en el vortex.
- c. Centrifugar durante 1 hora/3400 rpm/ $25^{\circ}\text{C}$  (RCF 2378xg).

## VI.

- a. Trasegar el sobrenadante a un tubo de 50ml nuevo.
- b. Agregar 2 volúmenes de etanol 95% y mezclar suavemente hasta que precipite el ADN.
- c. El ADN se extrae con una pipeta Pasteur a la que se le ha doblado previamente la punta en forma de asa.
- d. El ADN se lava en alcohol de  $70^{\circ}$  y luego se disuelve en TE, en un volumen dependiendo de la cantidad extraída.

**Buffer de lisis (1L, pH 7.4)**

NH <sub>4</sub> Cl (155 mM)	8.29g	(PM: 5349)
KHCO <sub>3</sub> (10 mM)	1.00g	(PM: 100.12)
EDTA (0.1mM)	200 µl	(PM: 292)

**Buffer SE (1L, pH 8)**

NaCl (75 mM)	4.39g	(PM: 58.44)
Na <sub>2</sub> EDTA H <sub>2</sub> O (25mM)	8.41g	(PM: 373.24)

**2. 1. 3 Reacciones de amplificación (PCR)**

La cantidad (260nm) y calidad de los ADNs (280nm) se determinó con un espectrofotómetro. Posteriormente, las muestras de ADN obtenidas se diluyeron a una concentración final de 25ng/µl (volumen final 200 µl), para proceder con las reacciones de amplificación.

Mediante PCR-multiplex se amplificaron fragmentos de 28 exones y de 2 promotores en 4 reacciones independientes ó “master mix” (MM) para cada una de las muestras. Las secuencias de los 30 pares de imprimadores - F (forward) y R (reverse) - se presentan en el Apéndice (Cuadros 1A-4A). Los imprimadores utilizados fueron manufacturados por Research Genetics Inc. (USA).

En microtubos Ependorf se preparó cada reacción de amplificación de la siguiente manera:

	Concentración inicial	Volumen agregar	Concentración final
ADN	25ng/µl	3.5 µl	7 mg/l
Buffer 10x	10X	2.5 µl	1X
dNTP's	25 M c/u	1.5 µl	1.5 mM c/u
Oligonucleótidos	25 µM c/u	0.5 µl	0.5 µM c/u
MgCl <sub>2</sub>	25mM	6.5 µl	6.5 mM
Taq polimerasa	5 u/µl	0.5 µl	0.1 u/µl

Volumen final (ajustar con H<sub>2</sub>O bidestilada estéril): 25 µl

Una variante introducida para la PCR fue el uso del buffer que acompaña a la Taq-polimerasa (buffer 10X) en lugar del que utilizaron Chamberlain y colaboradores (1988).

El perfil de amplificación utilizado para las combinaciones de imprimadores 2, 3 y 4 es el de Chamberlain et al. (1988, 1990) y se presenta a continuación:

1. 94°/6'
2. 94°/30'' (desnaturalización)
3. 53°/30'' (hibridación)
4. 65°/4' (extensión)
5. 24 ciclos de 2. a 4.
6. 65°/7'
7. 4°/ indefinido

Para el grupo de imprimadores nº1 (MM1), las condiciones fueron ligeramente modificadas, de manera que la temperatura de hibridación fue incrementada para evitar la aparición de bandas inespecíficas según se presenta a continuación:

1. 94°/2'
2. 94°/30'' (desnaturalización)
3. 60°/30'' (hibridación)
4. 65°/30'' (extensión)
5. 24 ciclos de 2. a 4.
6. 65°/2'
7. 4°/ indefinido

#### 2.1.4 Electroforesis

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida de 16 cm de longitud y 1.5 cm de espesor (3% gel empacador de 2 cm y 10% gel separador de 12

cm). El voltaje aplicado fue de 120V/cm constante durante 4-5 horas. Como amortiguador se empleó TBE 1X (Sambook *et al.* 1989).

### 2. 1. 5 Tinción

Los geles fueron teñidos con nitrato de plata de acuerdo al siguiente procedimiento:

- 15 minutos en solución fijadora con agitación moderada.
- 30 minutos en solución de plata con agitación moderada, protegiendo de la luz.
- 15 minutos en solución reveladora con agitación moderada.

#### Solución fijadora

10% etanol  
0.5% CH<sub>3</sub>COOH

#### Solución de plata

125 mg AgNO<sub>3</sub> (99.8%)  
300 ml H<sub>2</sub>O destilada

#### Solución reveladora

15 g NaOH (99%)  
3 ml formaldeido (37%)  
1 L H<sub>2</sub>O destilada

## 2. 2 DETECCIÓN DE PORTADORAS

Los pacientes que presentaron deleciones permiten identificar dentro del núcleo familiar, aquellas mujeres que podrían ser portadoras del alelo mutado. Una vez seleccionadas, se les determinó la dosis génica mediante electroforesis capilar fluorescente. En total se analizaron quince posibles portadoras, una portadora obligada, un varón y una mujer normales y doce mujeres normales como control.

### 2. 2. 1 Reacciones de amplificación

Inicialmente se esperaba realizar dos PCR-múltiplex con marcaje fluorescente cuyas reacciones de amplificación corresponderían a las mismas de la sección 2.1.3 para los MM1 y 2. No obstante, los primers marcados del MM 2 presentaron algunos problemas técnicos por lo cual se decidió continuar únicamente con el MM1. Para esta reacción, en algunos casos se excluyeron los imprimadores correspondientes a los exones 45 y 48, es decir, la reacción se llevó a cabo con siete pares de imprimadores, con el fin de ahorrar reactivos, dado que los exones 45 y 48 requieren el uso del marcador de peso molecular ROX 1000 porque al amplificar generan una banda de más de 500 pares de bases –las bandas menores de 500 pares de bases se analizan con el marcador ROX 500-. En aquellos casos en que existía una delección donde era relevante el análisis de esos dos exones si se llevó a cabo la reacción con los nueve pares de imprimadores.

La variante de esta reacción de PCR multiplex fue que para el grupo de imprimadores de Chamberlain *et al.* 1988 se marcó el imprimador F en el extremo 5' con fluoróforos de fosforamidita, para lo cual se utilizó 6-FAM (color azul). Solamente se marcó el imprimador F con el fin de obtener una única señal por molécula amplificada. Los imprimadores marcados con el fluoróforo se compraron a la casa Research Genetics Inc. (USA).

Se utilizó el mismo perfil de PCR que para el tamizaje normal, excepto por el número de ciclos, ajustándose a 18 ciclos en lugar de 25, ya que es en este punto en que la cantidad de moléculas producidas se encuentra en la fase logarítmica (Yau *et al.* 1996) y por lo tanto está en proporción directa con el número de moléculas iniciales. De manera que es posible estimar la dosis génica y detectar así quiénes tendrían delecciones, es decir, dosis génica simple.

### 2. 2. 2 Electroforesis capilar

El análisis mediante electroforesis capilar se llevó a cabo con el Analizador Genético ABI 310, utilizando el programa ABI PRISM 310 Genetic Analyzer Data Collection versión 1.0.4 para la obtención de datos y el programa ABI PRISM 310 Gene Scan versión 3.1 para el procesamiento de la información, ambos de la Corporación Perkin Elmer (1997). El proceso fue controlado desde un computador Power PC Macintosh equipado con un procesador G3.

### 2. 2. 3 Preparación de la muestra para análisis

La dilución para la electroforesis capilar se preparó del siguiente modo:

- 3  $\mu$ l de amplificado
- 0.5  $\mu$ l de marcador de tamaño molecular (ROX 500 ó 1000)
- 10.5  $\mu$ l de formamida desionizada.

Posteriormente se desnaturalizó durante 5 minutos a 95°C, pasando de inmediato a hielo.

### 2. 2. 4. Condiciones de la electroforesis capilar

La separación de fragmentos se realizó en capilares de 47 cm x 50 $\mu$ m (N° 402839) utilizando el polímero "Performance Optimized Polymer 4 (POP4)" (N° 402838). Como solución amortiguadora se usó "310 Genetic Analyzer Buffer with EDTA" (N° 402824) diluida a 1X. El módulo utilizado fue GS STR POP (1ml) con 5 segundos de inyección a 15 kV. Las corridas fueron a 15kV por tiempos de entre 25 y 45 minutos. La temperatura durante la corrida fue de

60°C. La matriz empleada fue la "Matrix Filter D" que se incluye en el programa como parte de su grupo básico.

### 2. 2. 5. Determinación de la dosis génica en candidatas a ser portadoras de deleciones

Para determinar la dosis génica se puede utilizar la altura o el área del pico de señal emitido por cada producto de amplificación. En este caso se decidió utilizar el área ya que mostró ser un mejor indicador. El procedimiento consistió en obtener razones dividiendo el valor del área de cada exón entre los valores de las áreas de los demás exones, de este modo se reduce cualquier error de variación y el análisis adquiere mayor confiabilidad.

Para tener razones de referencia normales, se amplificaron todos los exones del MM1 en muestras de 9 de mujeres normales, de igual forma, excluyendo los exones 45 y 48, se amplificaron muestras de otras 12 mujeres normales. Posteriormente, se calcularon los promedios de cada razón. Los valores de cada una de las razones obtenidas en las posibles portadoras de deleciones se dividieron entre las razones correspondientes del promedio considerado normal. Por ejemplo, para obtener la razón del exón 19 entre el 51 sería de la siguiente manera:

$$\text{exón19/ exón51} = \frac{\text{área del pico exón 19 (muestra)}/\text{área del pico exón 51(muestra)}}{\text{valor promedio de las razones 19/51 de las 12 mujeres control}}$$

Estos valores fueron calculados con el programa Excel 2000 (Microsoft, 1999). Si la mujer no es portadora de deleciones, sus razones han de ser equivalentes a las del promedio de las mujeres control, obteniéndose por lo tanto valores cercanos a 1. Si por el contrario, la mujer es

portadora de una delección, los valores de sus exones deletados con respecto al promedio de las mujeres normales serán de 0.5 cuando el exón deletado sea el numerador, de 1.0 cuando la delección involucra a varios exones, por lo que ambos estarían en dosis simples y sus razones son equivalentes a las dosis dobles en las mujeres normales, o de 2.0 cuando el exón deletado sea el denominador.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 TAMIZAJE DE DELECCIONES

Al concluir el estudio molecular y luego de una revisión más amplia y detallada de la historia clínica, se decidió excluir cinco pacientes, en vista de que las manifestaciones clínicas no estaban claramente relacionadas con una distrofinopatía, no había historia familiar ni se detectó delección alguna. De manera que de los 31 pacientes iniciales, continuaron 26 en el estudio.

La figura 5 muestra un gel donde se separaron mediante electroforesis, amplificados de un control normal y del paciente n° 5, afectado con una delección de los exones 45 al 50. El carril 1 muestra el patrón de bandas del paciente para la combinación de imprimadores 1 (MM1). Como se puede notar, están ausentes las bandas correspondientes al exón 45 y 48, a diferencia del control normal en el carril 2, donde aparecen las bandas de los 9 exones que amplifican en este MM. En los carriles 3 y 4 aparecen las bandas correspondientes a la amplificación con el MM2. En el carril 3, que corresponde a la muestra del paciente, se detecta la ausencia de las bandas correspondientes a los exones 47 y 50, por el contrario en el carril 4 del control normal están todas las bandas esperadas para este MM. Los carriles 5, 6, y 7 corresponden al MM3, el 5 y el 7 son la misma muestra y pertenecen al paciente. Según se observa, no amplificaron las bandas correspondientes a los exones 46 y 49. En el carril 6 aparece el control normal para este grupo de imprimadores.

En el Cuadro 2 se muestra el resultado del tamizaje de delecciones, así como los principales criterios diagnósticos aplicados para cada uno de estos pacientes cuyo cuadro clínico sugiere que

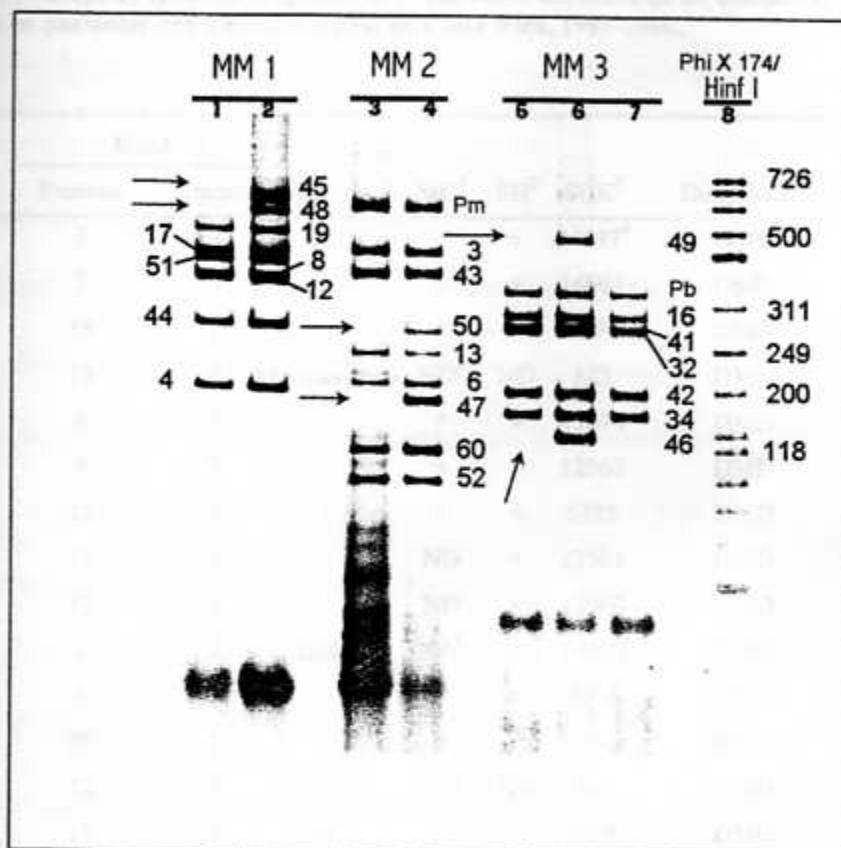


Figura 5. Gel de poliacrilamida (10%) mostrando los productos de amplificación de los MM 1, 2 y 3 del paciente n°5, quien presenta una deleción que abarca al menos de los exones 45 al 50, y de un control normal. Los números al lado de las bandas indican el número del exón correspondiente; las flechas señalan ausencias de bandas de amplificación debidas a deleciones. El carril 1 muestra la amplificación del paciente para el MM1 y el carril 2, al control normal para ese mismo MM. El carril 3 corresponde a la muestra del paciente para el MM2 y el carril 4 es el control normal. Los carriles 5 y 7 presentan la amplificación del paciente para el MM3 y el carril 6 muestra al control normal. El carril 8 corresponde al marcador de tamaño de las bandas  $\Phi$ x 174/Hinf I. El tamaño de algunas de ellas se indica en pb a su derecha. La tinción se realizó con nitrato de plata.

**Cuadro 2. Principales criterios diagnósticos y resultados del tamizaje de deleciones en el gen de la distrofina en pacientes con distrofinopatías en Costa Rica, 1998-2000.**

Paciente	Edad		Historia	MG <sup>1</sup>	SH <sup>2</sup>	SCK <sup>3</sup>	Diagnóstico	Deleciones
	Examen	Inicio						
1	7	5	-	+	+	24537 <sup>4</sup>	DMD	no
2	7	3	-	+	+	16961	DMD	52
3	14	2	-	+	+	4674	DMD	44
4	15	6	Miastenia gravis	ND <sup>5</sup>	ND	ND	DMD	no
5	9	9	-	+	+	15874	DMD	45-50
6	9	7	-	+	+	12562	DMD	no
7	12	8	-	+	+	6385	DMD	19
8	10	2	-	ND	+	13505	DMD	45-52
9	12	3	-	ND	+	12000	DMD	no
10	3	2	DMD	NA <sup>6</sup>	+	14680	DMD	60-66
11	5	3	-	+	+	4054	DMD	no
12	20	2	-	+	+	504	DMD	3-25
13	12	3	-	ND	ND	ND	DMD	no
14	13	3	-	+	+	1208	DMD	no
15	5	1	-	+	+	23000	DMD	no
16	12	3	-	+	+	2318	BMD?	no
17	ND	ND	DMD	ND	ND	ND	DMD	no
18	14	2	DMD	+	+	25860	DMD	no
19	15	ND	DMD	ND	ND	ND	DMD	52
20	47	ND	BMD	ND	ND	ND	BMD	no
21	43	ND	BMD	ND	ND	ND	BMD	no
22	12	2	DMD	+	-	36060	DMD	no
23	10	3	DMD	+	+	18120	DMD	no
24	13	2	DMD	+	+	5445	DMD	no
25	16	2	-	+	-	916	DMD	45-50
26	20	ND	ND	ND	ND	ND	DMD	12-19

<sup>1</sup> maniobra de Gower, <sup>2</sup> pseudohipertrofia, <sup>3</sup> creatina quinasa sérica, <sup>4</sup> U/l: unidades por litro, <sup>5</sup> no hay datos, <sup>6</sup> no aplica.

se trata de una distrofinopatía. De los veintiseis pacientes que continuaron en el estudio, diez presentaron deleciones. En los pacientes 1, 4, 6, 9, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23 y 24 no se detectó deleción alguna.

El paciente n° 2 presentó deleción del exón 52. A pesar de que no existe historia familiar, los criterios clínicos tales como edad de inicio a los 3 años de edad, la presencia de la maniobra de Gower, la pseudohipertrofia de gemelos así como un valor de 16961 U/L para la creatina quinasa en suero indican que probablemente se encuentra afectado con DMD.

El paciente n°3 presenta una deleción del exón 44. Es un cuadro claro de DMD, incluso ya ha sido sometido a traqueostomía como resultado de los problemas respiratorios asociados a esta enfermedad. No hay historia familiar.

En el paciente n°5 se detectó una deleción que abarca al menos de los exones 45 al 50. Se encuentra en silla de ruedas desde temprana edad y su cuadro clínico coincide con el de la DMD.

El paciente n°7 tiene deleción del exón 19. En los criterios clínicos se menciona pseudohipertrofia y dificultad para levantarse, así como una SCK de 6385. No se conoce historia familiar.

En el paciente n°8 se encontró una deleción del exón 45 al 52. Se presentan manifestaciones clínicas compatibles con un cuadro de DMD, niveles elevados de SCK así como pseudohipertrofia de gemelos. No existe historia familiar.

En el paciente n° 10 se encontró una deleción que abarca al menos los exones 60 al 66. Las manifestaciones clínicas concuerdan con aquellas descritas para la DMD. En el caso de este paciente se debe mencionar que si existe historia familiar.

El paciente n°12 es un joven que cuenta actualmente con 20 años de edad y ha perdido su capacidad ambulatoria desde hace tiempo. En él se detectó una gran deleción que comprende los exones 3 al 25. Como puede observarse en el cuadro, las manifestaciones clínicas son compatibles con la DMD. El nivel disminuído de SCK (504 u/ml), se debe a que la enfermedad se encuentra en estado avanzado, el músculo se ha atrofiado y la liberación de creatina quinasa es por lo tanto mucho menor. No se conoce historia familiar.

El paciente n°19 se encuentra afectado con una deleción del exón 52. Aunque no fue posible obtener datos de su historia clínica si pudo corroborarse que en su familia hay una historia de DMD.

En el paciente n°25 se encontró una deleción que abarca al menos de los exones 45 al 50. La historia clínica así como el diagnóstico molecular indican que se trata probablemente de una distrofinopatía. En este caso el nivel de SCK se encuentra también disminuído por las mismas razones que se explicaron en el paciente n°10. No existe historia familiar.

Por último, en el paciente n°26 se detectó una deleción de los exones 12 al 19. No se pudo localizar su expediente para obtener la historia clínica.

Todas las deleciones detectadas se localizan en zonas de alto porcentaje de deleción en pacientes distrofinopáticos, siete de ellas en la región central del gen y tres en la región 5'. De las 10 deleciones detectadas, seis son multiexónicas, es decir, abarcan varios exones y el resto involucran únicamente un exón.

Curiosamente pocos de los pacientes tienen una historia familiar con antecedentes de distrofinopatía, únicamente 5 familias. El paciente n°19, dos hermanos afectados con DMD, los

pacientes n°17 y 18 y otros tres hermanos igualmente con DMD, los pacientes n° 22, 23 y 24. El paciente n° 10 quien tiene un hermano con DMD y un tío materno fallecido por la enfermedad. Además de los dos hermanos afectados con BMD, los pacientes n°20 y 21.

En el transcurso del estudio acudió a nosotros una señora residente en Nicaragua, cuyo hijo con DMD cuenta con 14 años de edad y se encuentra según referencia médica de ese país, muy afectado. Su condición no le permite viajar. La señora, una portadora obligada, dado que dos hermanos suyos han fallecido de DMD, se encontraba embarazada y el producto en gestación era un varón, por lo cual vino a Costa Rica al conocer de nuestro trabajo para ver si era posible un diagnóstico prenatal. Para esto, trajo consigo una muestra de sangre de su hijo afectado y en Costa Rica se le extrajo una muestra de sangre de cordón umbilical. El resultado mostró en el hijo de 14 años una enorme deleción que abarca al menos 36 exones, del 6 al 42, mientras que en el producto en gestación no se detectó deleción alguna. Se le informó de los resultados a la madre quien decidió continuar con su embarazo y posteriormente dio a luz un varón aparentemente normal.

### 3.2 DETECCIÓN DE PORTADORAS

Los pacientes que presentan una deleción abren la posibilidad de continuar con el estudio en una segunda fase para determinar si las mujeres a riesgo como son, por ejemplo, la madre, las hermanas o las tías del paciente, podrían ser portadoras de la(s) deleción(es). Para esto, se les determinó la dosis génica mediante electroforesis capilar fluorescente.

### 3. 2. 1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

#### A.- Los pacientes

El método de electroforesis capilar fluorescente para detectar los productos de amplificación de la PCR-múltiplex fue probado inicialmente con aquellos pacientes que presentaron deleciones y con controles normales. Según se observa en la Figura 6, la amplificación de una mujer normal muestra en el panel 6A los siete picos correspondientes a cada uno de los exones amplificados, claramente distinguibles. En el panel 6B, correspondiente al paciente n°7 quien tiene deleción del exón 19, se encuentra ausente el pico propio de este exón. El panel 6C pertenece a un paciente con deleción de los exones 6-42, y por lo tanto no aparecen los picos correspondientes a los exones 8, 12, 17 y 19. Por último, el panel 6D es del paciente el n°12 que se encuentra afectado con una deleción de los exones 3-25. En este caso no aparecen los picos de los exones 4, 8, 12, 17 y 19.

Con este mismo método se confirmó la deleción detectada mediante el PCR-múltiplex en los pacientes 2, 3, 5, 10, 16, 19, 25 y 26.

#### B.- Estimación de la dosis génica de una portadora obligada y dos controles normales

Con el fin de probar la sensibilidad del método para detectar diferencias de dosis génica, se evaluaron las muestras de una portadora obligada -la señora que solicitó el diagnóstico prenatal (sección 3.1) y madre del paciente con la deleción de los exones 6 al 42- así como dos controles normales, una mujer y un varón (Cuadro 3).

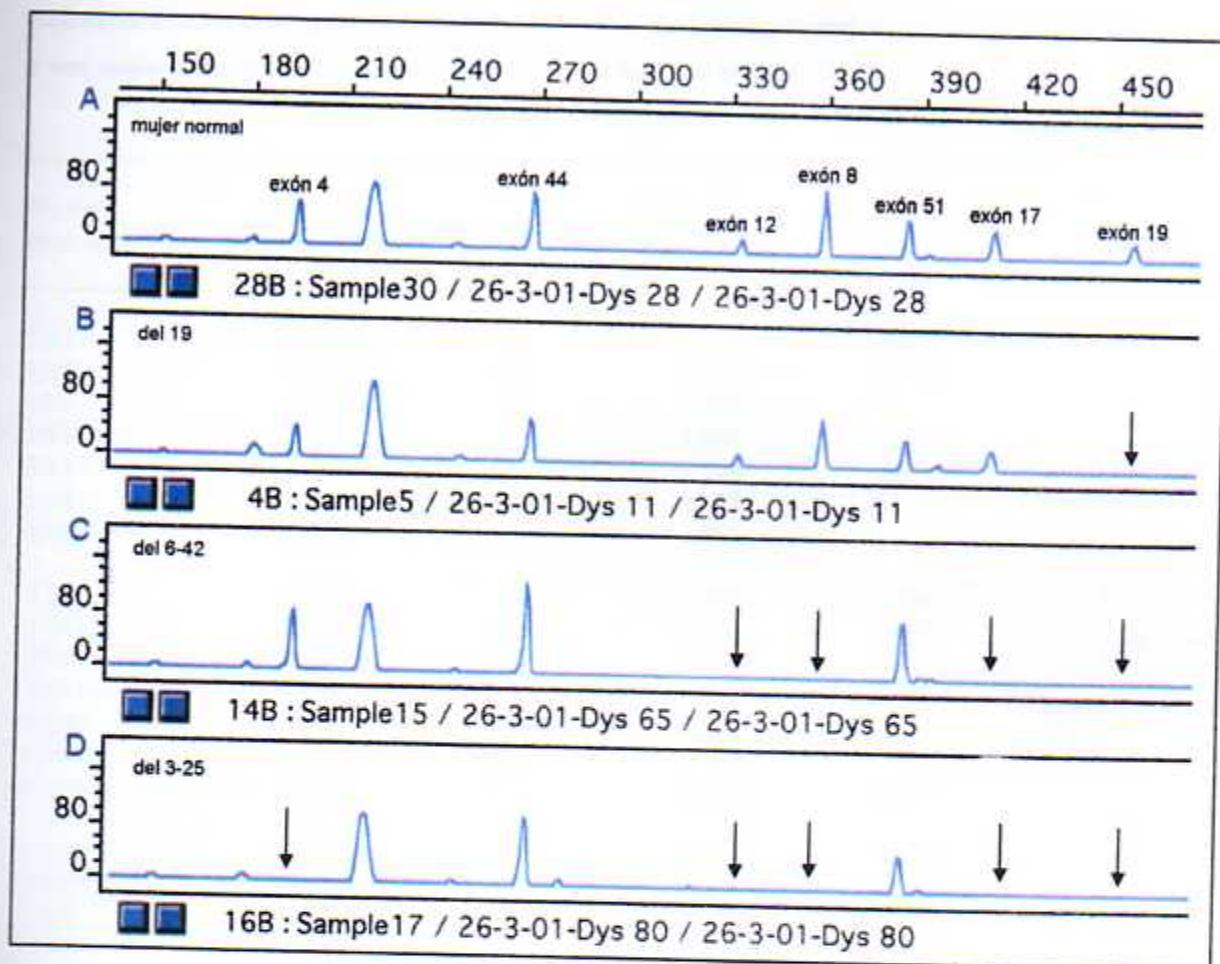


Figura 6. Electroferogramas de los productos de amplificación del MM1 usando 7 pares de imprimadores de una mujer control y tres pacientes afectados con una delección. Las flechas indican aquellos exones que no amplificaron y por lo tanto se encuentran deletados. El panel 6A corresponde a una mujer normal donde aparecen los picos de los siete exones que amplifican para este grupo de imprimadores. El panel 6B pertenece a un paciente que presenta delección del exón 19, según se indica, está ausente el pico correspondiente a este exón. El panel 6C es de un paciente con delección de al menos los exones 6-42, en el cual no aparecen los picos de los exones 8, 12, 17 y 19. El panel 6D pertenece a un paciente afectado con la delección de los exones 3-25, según se muestra, están ausentes los exones 4, 12, 8, 17 y 19.

**Cuadro 3. Validación del método de cuantificación de dosis génica mediante electroforesis capilar fluorescente de los productos de amplificación (7 pares de imprimadores) de una portadora obligada y una mujer y un varón normales. Análisis de la razón entre exones.**

Razón* (exones)	Portadora obligada (65A)	E	Mujer control (GL-CR-06)	Varón control (32-03-70)	E
19/17	1,271	1	1,201	1,281	1
19/51	0,622	0,5	1,155	1,163	1
19/8	1,325	1	1,269	1,240	1
19/12	1,325	1	1,059	1,190	1
19/44	0,555	0,5	1,224	1,170	1
19/4	0,616	0,5	1,293	1,290	1
19/total	0,775		1,205	1,212	
17/19	0,714	1	0,756	0,708	1
17/51	0,480	0,5	0,943	0,890	1
17/8	0,814	1	1,057	0,985	1
17/12	0,996	1	0,843	0,888	1
17/44	0,430	0,5	1,005	0,900	1
17/4	0,466	0,5	1,036	0,969	1
17/total	0,598		0,984	0,928	
51/19	1,503	2	0,809	0,804	1
51/17	2,042	2	1,039	1,101	1
51/8	1,672	2	1,105	1,092	1
51/12	2,089	2	0,899	1,004	1
51/44	0,885	1	1,052	0,998	1
51/4	0,983	1	1,113	1,103	1
51/total	1,239		1,038	1,050	
8/19	0,875	1	0,713	0,718	1
8/17	1,218	1	0,938	1,006	1
8/51	0,590	0,5	0,894	0,905	1
8/12	1,219	1	0,794	0,898	1
8/44	0,528	0,5	0,950	0,913	1
8/4	0,575	0,5	0,984	0,988	1
8/total	0,745		0,929	0,941	

**Cuadro 3 (continuación). Validación del método de cuantificación de dosis génica mediante electroforesis capilar fluorescente de los productos de amplificación (7 pares de imprimadores) de una portadora obligada y una mujer y un varón normales. Análisis de la razón entre exones.**

Razón* (exones)	Portadora obligada (65A)	E	Mujer control (GL-CR-06)	Varón control (32-03-70)	E
12/19	0,718	1	0,899	0,800	1
12/17	0,891	1	1,124	1,067	1
12/51	0,463	0,5	1,076	0,964	1
12/8	0,776	1	1,191	1,054	1
12/44	0,417	0,5	1,151	0,978	1
12/4	0,457	0,5	1,201	1,066	1
12/total	0,578		1,126	1,008	
44/19	1,675	2	0,759	0,794	1
44/17	2,294	2	0,982	1,096	1
44/51	1,114	1	0,938	0,988	1
44/8	1,880	2	1,045	1,088	1
44/12	2,334	2	0,845	0,994	1
44/4	1,089	1	1,037	1,082	1
44/total	1,386		0,976	1,029	
4/19	1,555	2	0,740	0,742	1
4/17	2,078	2	0,934	0,999	1
4/51	1,017	1	0,899	0,907	1
4/8	1,707	2	0,997	0,993	1
4/12	2,129	2	0,810	0,912	1
4/44	0,908	1	0,953	0,913	1
4/total	1,263		0,935	0,943	

\* Los valores corresponden a los cocientes de las razones de cada probando con respecto al promedio de los cocientes correspondientes en los controles normales.

E: razones esperadas, en el caso de la portadora según la delección y los controles normales como tales.

Se presentan las razones de las áreas de los distintos picos de señales fluorescente para estas muestras. De igual forma, se comparan los valores esperados (E) con los valores obtenidos. En el caso de la portadora obligada los valores coinciden con los esperados de acuerdo a la delección presente en su hijo. Por otro lado, los controles normales muestran valores equivalentes a los de los promedios de las mujeres normales, prácticamente de 1. Cabe anotar el caso del exón 19, cuyos valores son algo más elevados de lo esperado, debido a causas cuyo posible origen se discutirá posteriormente. Los resultados indican por lo tanto, que el método es lo suficientemente confiable para la cuantificación de dosis génica, y por lo tanto es válido para ser aplicado en muestras de mujeres con riesgo de ser portadoras de delecciones.

### 3. 2. 2 POSIBLES PORTADORAS

En el cuadro 4 se muestran las razones obtenidas para aquellas posibles portadoras cuya delección a probar puede realizarse con el subgrupo de 7 pares de imprimadores de la MM1.

Para la familia del paciente n°7, cuya delección incluye el exón 19, se analizaron las razones obtenidas para su madre (7a) y sus tres hermanas (7b, 7c, 7d). Los valores para cada exón tienden a 1 con excepción del exón 19 y aquellas razones en las cuales se ve involucrado. Para este exón los valores son algo superiores a 1, cuando se encuentra como numerador e inferiores cuando esta como denominador, esta variación ha sido constante para ese exón, según se mencionó en la sección anterior. Sin embargo, al considerarse en conjunto todas las razones obtenidas, se puede concluir que ni la madre ni las hermanas son portadoras de esta delección, ya que a pesar de que el exón 19 es el que muestra valores más amplios en su rango de variación, las razones que con él se obtienen no se aproximan a los valores esperados en caso de que

**Cuadro 4. Razones obtenidas con respecto al promedio para mujeres a riesgo de ser portadoras de deleciones mediante la cuantificación de dosis fluorescente (siete pares de imprimadores).**

Razón* (exones)	familia del paciente											
	n° 7 (del. 19)				E	n°3 (del. 44)				E	n°12 (del. 3-25)	
	7a	7b	7c	7d		3a	3b	3c	3d		12a	E
19/17	0,932	1,112	1,122	1,261	0,5	0,866	1,161	0,981	0,919	1	1,204	1
19/51	0,989	1,142	1,146	1,367	0,5	0,937	1,087	0,960	0,978	1	1,068	0,5
19/8	0,989	1,156	1,099	1,294	0,5	0,812	1,088	1,063	0,852	1	1,130	1
19/12	0,944	1,217	1,276	1,559	0,5	0,954	0,846	0,983	1,029	1	1,170	1
19/44	0,996	1,136	1,157	1,360	0,5	0,852	1,106	0,966	0,886	1	1,068	0,5
19/4	0,876	1,126	1,099	1,204	0,5	0,962	1,075	1,131	0,933	1	1,452	1
19/total	0,959	1,139	1,133	1,294		0,899	1,123	1,025	0,929		1,155	
17/19	1,008	0,816	0,808	0,719	2	1,047	0,758	0,897	0,987	1	0,754	1
17/51	1,015	1,006	1,001	1,063	1	1,061	0,912	0,953	1,043	1	0,870	0,5
17/8	1,098	1,039	0,979	1,026	1	0,937	0,935	1,082	0,926	1	0,939	1
17/12	1,002	1,045	1,086	1,182	1	1,052	0,683	0,940	0,950	1	0,929	1
17/44	1,092	1,007	1,017	1,063	1	0,970	0,934	0,966	0,950	2	0,875	0,5
17/4	0,924	0,974	0,942	0,918	1	1,068	0,878	1,094	0,976	1	1,160	1
17/total	1,044	1,004	0,990	1,006		1,015	0,943	1,019	0,991		0,941	
51/19	1,003	0,819	0,816	0,684	2	0,998	0,844	0,955	0,955	1	0,876	2
51/17	0,966	0,974	0,979	0,922	1	0,924	1,070	1,070	0,939	1	1,127	2
51/8	1,067	1,018	0,965	0,953	1	0,871	1,008	1,008	0,876	1	1,065	2
51/12	0,993	1,045	1,092	1,119	1	0,998	0,763	0,763	1,032	1	1,075	2
51/44	1,061	0,988	1,002	0,98	1	0,902	1,009	1,009	0,898	2	0,993	1
51/4	0,934	0,981	0,953	0,875	1	1,021	0,981	0,981	0,948	1	1,351	2
51/total	1,024	0,993	0,984	0,942		0,954	1,028	1,028	0,945		1,070	
8/19	0,915	0,783	0,823	0,699	2	1,115	0,809	0,827	1,062	1	0,800	1
8/17	0,903	0,954	1,012	0,966	1	1,058	1,059	0,916	1,070	1	1,056	1
8/51	0,925	0,970	1,023	1,037	1	1,133	0,976	0,882	1,128	1	0,927	0,5
8/12	0,908	1,002	1,105	1,147	1	1,119	0,733	0,872	1,151	1	0,985	1
8/44	0,993	0,969	1,037	1,035	1	1,034	1,000	0,894	1,025	2	0,931	0,5
8/4	0,856	0,942	0,966	0,898	1	1,145	0,945	1,017	1,059	1	1,240	1
8/total	0,949	0,966	1,009	0,978		1,084	1,008	0,942	1,068		1,000	

**Cuadro 4 (continuación). Razones obtenidas con respecto al promedio para mujeres a riesgo de ser portadoras de deleciones mediante la cuantificación de dosis fluorescente (siete pares de imprimadores).**

Razón* (exones)	familia del paciente											
	n° 7 (del. 19)					n°3 (del. 44)					n°12 (del. 3-25)	
	7a	7b	7c	7d	E	3a	3b	3c	3d	E	12a	E
12/19	1,009	0,783	0,746	0,611	2	0,998	1,136	0,978	0,925	1	0,814	1
12/17	0,946	0,906	0,872	0,802	1	0,900	1,388	1,009	0,885	1	1,020	1
12/51	0,974	0,926	0,886	0,864	1	0,969	0,915	0,983	0,937	1	0,900	0,5
12/8	1,041	0,944	0,856	0,825	1	0,846	1,309	1,100	0,822	1	0,960	1
12/44	1,051	0,930	0,903	0,868	1	0,889	1,325	0,996	0,857	2	0,908	0,5
12/4	0,913	0,910	0,847	0,759	1	0,992	1,272	1,151	0,892	1	1,220	1
12/total	1,005	0,927	0,879	0,821		0,932	1,338	1,050	0,893		0,970	
44/19	0,932	0,818	0,803	0,683	2	1,091	0,823	0,942	1,049	0,5	0,870	2
44/17	0,904	0,980	0,971	0,928	1	1,018	1,053	1,018	1,039	0,5	1,128	2
44/51	0,929	0,998	0,984	0,999	1	1,093	0,976	0,987	1,097	0,5	0,993	1
44/8	1,000	1,025	0,956	0,960	1	0,961	0,995	1,113	0,969	0,5	1,067	2
44/12	0,925	1,046	1,078	1,120	1	1,094	0,739	0,983	1,135	0,5	1,070	2
44/4	0,862	0,973	0,932	0,868	1	1,108	0,949	1,142	1,034	0,5	1,334	2
44/total	0,955	0,995	0,972	0,944		1,047	1,007	1,053	1,041		1,073	
4/19	1,092	0,850	0,871	0,795	2	0,995	0,881	0,837	1,025	1	0,659	1
4/17	1,034	0,993	1,028	1,054	1	0,906	1,091	0,876	0,991	1	0,834	1
4/51	1,070	1,020	1,049	1,143	1	0,980	1,019	0,856	1,055	1	0,740	0,5
4/8	1,146	1,042	1,016	1,092	1	0,857	1,032	0,959	0,926	1	0,791	1
4/12	1,065	1,068	1,149	1,281	1	0,980	0,778	0,860	1,090	1	0,797	1
4/44	1,146	1,016	1,061	1,138	1	0,892	1,041	0,864	0,956	2	0,741	0,5
4/total	1,098	1,015	1,034	1,078		0,937	1,052	0,912	1,006		0,798	

\* Los valores corresponden a los cocientes de las razones de cada probando con respecto al promedio de los cocientes correspondientes en los controles normales.

E: valores esperados para una mujer portadora según la deleción indicada en cada familia.  
del: deleción

estuviera deletado; todo lo contrario, tienden a ser más próximos a los esperados en una mujer normal, sean de 1.

Seguidamente se presentan las razones de la madre (3a) y hermanas (3b, 3c, 3d) del paciente nº3, afectado con la delección del exón 44. En este caso se observan razones muy cercanas a 1 en todas las muestras y se concluye que ninguna de las mujeres de esta familia son portadoras de la delección. Finalmente aparecen las razones obtenidas para la madre (12a) del paciente nº12 quien presenta una delección de al menos los exones 3-25, los valores se aproximan a 1 por lo que se puede decir que la madre no es portadora de la delección que afecta a su hijo.

En el cuadro 5 se presentan aquellas razones obtenidas para las posibles portadoras cuya detección requiere la amplificación con los 9 pares de imprimadores del MM1. En primer lugar se analizó la familia del paciente nº5, al cual se le detectó una delección de los exones 45-50. Según se observa en el cuadro, todas las razones tienden a 1, por lo cual se concluye que ni la madre (5a) ni la hermana (5b) son portadoras de la delección. Luego aparecen las razones de la madre (8a), la tía (8b) y abuela (8c) maternas del paciente nº8, a quien se le detectó delección de los exones 45-52. En el caso de esta familia no pudieron amplificarse los exones 47, 50 y 52, ya que están incluidos en el MM 2. Es interesante mencionar que las razones obtenidas para el exón 45 en las muestras 8a y 8c, presentan variaciones con respecto a la muestra 8b, lo cual se discutirá posteriormente. Sin tomar en cuenta el problema anterior, el análisis conjunto de las razones para cada uno de los demás exones muestra que todas ellas tienden a 1, por lo cual es posible concluir con base en ello, que ninguna de las señoras es portadora de la delección. Por último, se calcularon las razones para la madre (25a) del paciente nº25 que presenta una delección de los exones 45-50. Los valores se aproximan a 1 y nos

**Cuadro 5. Razones obtenidas con respecto al promedio para mujeres a riesgo de ser portadoras de deleciones mediante la cuantificación de dosis fluorescente (nueve pares de imprimadores).**

Razón* (exones)	familia del paciente								
	n°5 (del. 45-50)			n°8 (del. 45-52)			n° 25 (del. 45-50)		
	5a	5b	E	8a	8b	8c	E	25a	E
45/48	1,072	1,001	1	0,543	0,802	1,681	1	1,134	1
45/19	0,859	0,808	0,5	0,517	0,859	1,509	0,5	1,112	0,5
45/17	0,960	0,956	0,5	0,564	0,877	1,661	0,5	1,425	0,5
45/51	0,937	0,932	0,5	0,498	0,888	1,670	1	1,553	0,5
45/8	1,047	1,008	0,5	0,545	0,914	1,538	0,5	1,152	0,5
45/12	0,753	0,804	0,5	0,531	0,933	1,389	0,5	1,215	0,5
45/44	1,038	1,008	0,5	0,508	0,918	1,557	0,5	1,173	0,5
45/4	0,926	0,943	0,5	0,504	0,862	1,454	0,5	1,256	0,5
45/Total	0,982	0,966		0,555	0,901	1,500		1,220	
48/45	0,931	0,997	1	1,840	1,245	0,594	1	0,880	1
48/19	0,799	0,805	0,5	0,950	1,069	0,895	0,5	0,978	0,5
48/17	0,897	0,956	0,5	1,041	1,095	0,990	0,5	1,259	0,5
48/51	0,872	0,929	0,5	0,916	1,105	0,991	1	1,368	0,5
48/8	0,976	1,006	0,5	1,004	1,140	0,914	0,5	1,016	0,5
48/12	0,701	0,802	0,5	0,976	1,162	0,825	0,5	1,070	0,5
48/44	0,966	1,005	0,5	0,935	1,143	0,925	0,5	1,033	0,5
48/4	0,454	0,938	0,5	0,927	1,072	0,862	0,5	1,105	0,5
48/Total	0,915	0,964		1,022	1,123	0,891		1,075	
19/45	1,062	1,129	2	1,766	1,062	0,605	2	0,821	2
19/48	1,140	1,131	2	0,959	0,852	1,018	2	0,931	2
19/17	1,015	1,074	1	0,991	0,927	1,000	1	1,164	1
19/51	0,999	1,056	1	0,882	0,946	1,014	2	1,280	1
19/8	1,099	1,124	1	0,951	0,959	0,919	1	0,934	1
19/12	0,829	0,941	1	0,971	1,027	0,871	1	1,033	1
19/44	1,102	1,138	1	0,897	0,975	0,942	1	0,963	1
19/4	1,006	1,089	1	0,911	0,937	0,900	1	1,055	1
19/Total	1,050	1,097		0,986	0,964	0,913		1,007	
17/45	1,026	1,030	2	1,746	1,124	0,593	2	0,691	2
17/48	1,104	1,036	2	0,951	0,904	1,001	2	0,787	2
17/19	0,867	0,820	1	0,888	0,950	0,880	1	0,756	1
17/51	0,958	0,957	1	0,866	0,994	0,987	2	1,070	1
17/8	1,080	1,045	1	0,958	1,033	0,917	1	0,801	1
17/12	0,766	0,822	1	0,919	1,040	0,817	1	0,833	1
17/44	1,065	1,040	1	0,888	1,032	0,924	1	0,811	1
17/4	0,940	0,961	1	0,872	0,959	0,853	1	0,860	1
17/Total	1,008	0,996		0,970	1,014	0,890		0,844	

**Cuadro 5 (continuación). Razones obtenidas con respecto al promedio para mujeres a riesgo de ser portadoras de deleciones mediante la cuantificación de dosis fluorescente (nueve pares de imprimadores).**

Razón* (exones)	familia del paciente								
	n°5 (del. 45-50)		E	n°8 (del. 45-52)			E	n° 25 (del. 45-50)	
	5a	5b		8a	8b	8c		25a	E
51/45	1,065	1,070	2	2,005	1,124	0,598	1	0,642	2
51/48	1,142	1,072	2	1,088	0,901	1,004	1	0,728	2
51/19	0,918	0,869	1	1,040	0,970	0,905	0,5	0,717	1
51/17	1,018	1,019	1	1,125	1,125	0,988	0,5	0,911	1
51/8	1,108	1,019	1	1,086	1,086	0,913	0,5	0,735	1
51/12	0,814	1,072	1	1,079	1,079	0,842	0,5	0,792	1
51/44	1,094	1,069	1	1,010	1,009	0,922	0,5	0,747	1
51/4	0,999	1,023	1	1,025	1,025	0,880	0,5	0,818	1
51/Total	1,045	1,034		1,113	1,113	0,896		0,783	
8/45	0,949	0,986	2	1,824	1,088	0,647	2	0,863	2
8/48	0,989	0,959	2	2,240	0,847	1,056	2	0,950	2
8/19	0,800	0,782	1	0,925	0,917	0,957	1	0,942	1
8/17	0,916	0,947	1	1,034	0,958	1,080	1	1,236	1
8/51	0,888	0,918	1	0,906	0,964	1,078	2	1,338	1
8/12	0,711	0,789	1	0,962	1,010	0,893	1	1,043	1
8/44	0,987	0,996	1	0,928	1,000	1,009	1	1,014	1
8/4	0,875	0,925	1	0,916	0,934	0,936	1	1,079	1
8/Total	0,932	0,953		1,013	0,981	0,970		1,053	
12/45	1,292	1,210	2	1,835	1,043	0,701	2	0,801	2
12/48	1,387	1,212	2	0,996	0,836	1,179	2	0,908	2
12/19	1,159	1,021	1	0,990	0,936	1,104	1	0,930	1
12/17	1,238	1,154	1	1,032	0,912	1,161	1	1,139	1
12/51	1,213	1,130	1	0,915	0,927	1,172	2	1,246	1
12/8	1,349	1,216	1	0,997	0,950	1,074	1	0,920	1
12/44	1,346	1,225	1	0,936	0,961	1,096	1	0,944	1
12/4	1,214	1,158	1	0,939	0,913	1,034	1	1,021	1
12/Total	1,275	1,175		1,024	0,945	1,056		0,982	
44/45	0,961	0,989	2	1,962	1,087	0,640	2	0,850	2
44/48	1,031	0,990	2	1,065	0,872	1,077	2	0,964	2
44/19	0,826	0,800	1	1,015	0,934	0,967	1	0,946	1
44/17	0,924	0,946	1	1,107	0,953	1,065	1	1,212	1
44/51	0,900	0,921	1	0,976	0,964	1,069	2	1,319	1
44/8	1,008	0,999	1	1,072	0,995	0,987	1	0,981	1
44/12	0,727	0,799	1	1,045	1,019	0,893	1	1,037	1
44/4	0,891	0,933	1	0,991	0,938	0,932	1	1,069	1
44/Total	0,945	0,956		1,090	0,981	0,962		1,038	

**Cuadro 5 (continuación). Razones obtenidas con respecto al promedio para mujeres a riesgo de ser portadoras de deleciones mediante la cuantificación de dosis fluorescente (nueve pares de imprimadores)**

Razón* (exones)	familia del paciente								
	n°5 (del. 45-50)			n°8 (del. 45-52)			n° 25 (del. 45-50)		
	5a	5b	E	8a	8b	8c	E	25a	E
4/48	1,067	1,048	2	1,958	1,145	0,679	2	0,786	2
4/45	1,143	1,048	2	1,062	0,917	1,141	2	0,890	2
4/19	0,941	0,870	1	1,039	1,010	1,052	1	0,898	1
4/17	1,020	0,997	1	1,099	0,999	1,123	1	1,115	1
4/51	1,001	0,978	1	0,976	1,018	1,136	2	1,223	1
4/8	1,114	1,053	1	1,065	1,044	1,042	1	0,903	1
4/12	0,815	0,855	1	1,054	1,085	0,958	1	0,969	1
4/44	1108	1,058	1	0,996	10,520	1,059	1	0,923	1
4/Total	1,050	1,014		1,090	1,035	1,021		0,961	

\* Los valores corresponden a los cocientes de las razones de cada probando con respecto al promedio de los cocientes correspondientes en los controles normales.

E: valores esperados para una mujer portadora según la deleción indicada en cada familia.  
del: deleción

permiten concluir también que la madre no es portadora de la deleción.

Los casos que restan por resolver son los de la familia de los pacientes n°2 (deleción del exón 52), n°10 (deleción de los exones 60-66) y n°19 (deleción del exón 52), debido a los problemas técnicos experimentados con el MM2, como se citó anteriormente, ya que los exones involucrados son amplificados con este grupo de imprimadores. Tampoco se pudo buscar deleciones en las mujeres parientes del paciente n°26 (deleción de los exones 12-19), ya que fue imposible recolectar ninguna otra muestra aparte de la del paciente.

## 4 DISCUSIÓN

La técnica del PCR-múltiplex ha demostrado ser un método útil para la detección de deleciones en el gen de la distrofina. La implementación de pruebas discriminatorias, tal como esta, contribuye a refinar el diagnóstico clínico, sobre todo en enfermedades en las cuales es complejo establecerlo como en el caso de las distrofias musculares. Según se ha mencionado previamente, el traslape de sintomatologías así como el desconocimiento, hasta hace pocos años, de los genes involucrados en este tipo de padecimientos han sido responsables en gran medida de la dificultad. La situación en Costa Rica no es más alentadora, la deficiencia en el diagnóstico clínico de estas enfermedades se hizo evidente desde el inicio del estudio. Como se menciona en el apartado 3. 1, cinco de treinta y un pacientes clasificados clínicamente como distrofinopáticos debieron ser retirados del estudio porque no cumplían ni clínica ni molecularmente con las características propias de la enfermedad. El problema de estas inconsistencias radica principalmente en la ausencia de otras pruebas confirmatorias a nivel molecular que brinden al médico un mayor criterio en el momento de establecer el diagnóstico, aparte de que existen pocos especialistas en Genética Médica y la experiencia en el diagnóstico de enfermedades de origen genético es, en general, escasa. Hoy en día no se justifica esta deficiencia dado que se conocen una buena parte de los genes involucrados en los diferentes tipos de distrofias musculares y gracias al avance de la biotecnología, el diagnóstico clínico puede ser complementado con el diagnóstico molecular, ya sea a nivel del ADN o mediante la evaluación de sus productos génicos, como se realiza rutinariamente en diversos países.

En Costa Rica se hace necesario implementar técnicas moleculares discriminatorias como el PCR-múltiple y fundamentalmente concluyentes tal como es la detección de distrofina en el músculo del paciente. Con estas herramientas, el médico tendría más certeza a la hora de establecer qué tipo de distrofia afecta al paciente y mejoraría por tanto, la atención del mismo. Los sistemas de salud se verían beneficiados también con el diagnóstico de portadoras, controlándose así el nacimiento de niños enfermos mediante un apropiado consejo genético.

Para tener una noción de esto en Costa Rica, podríamos estimar cuantos niños afectados con distrofinopatías habrán nacido de la cohorte de mujeres del año 2000. Según proyecciones del Centro de Información Demográfica, de la Universidad de Costa Rica (U.C.R. 2001), a finales del año 2000 había en Costa Rica 1 567 094\* mujeres entre los 0 y los 44 años de edad. Si la tasa de mutación ( $\mu$ ) compensa a la tasa de eliminación de alelos por muerte o incapacidad reproductiva de los varones distrofinopáticos (coeficiente de selección  $\sigma$ ), sea  $\mu = \sigma$ , la proporción de portadoras sería:

$2pq$  para DMD, donde

$q$  = frecuencia de alelos produciendo DMD ó  $1/3500$

y

$p = 1 - q$ ;

mientras que  $2p'q'$  para BMD,

donde  $q' = 1/18500$

y  $p' = 1 - q'$ .

---

\* Incluye los resultados del Censo 2000, aunque algunos datos son aún preliminares por lo que la cifra podría estar sujeta a variaciones mínimas.

De esta manera, habría 895 portadoras de DMD y 169 de BMD, en total 1064. Si cada mujer tiene en promedio 2.4 hijos en Costa Rica, estas portadoras habrán procreado al año 2044, cuando se espera que las que ahora tienen 0 años han concluido su ciclo reproductivo, un total de 2553 descendientes, 638 de ellos varones afectados con distrofinopatías y un número igual de hijas portadoras. Cifras bastante elevadas y que podrían controlarse mediante la implementación de las tecnologías pertinentes.

Es importante destacar también otra de las aplicaciones, mencionada ya anteriormente, como es el diagnóstico prenatal. Su utilidad fue demostrada con el caso que se presentó en el transcurso del estudio. La técnica del PCR-múltiplex permitió detectar la mutación en el probando así como la condición del bebé en gestación, mientras que con la determinación de dosis génica fue posible confirmar el estado de portadora obligada en la madre.

Este estudio no tuvo carácter epidemiológico y la muestra analizada fue muy pequeña como para establecer alguna conclusión en ese sentido, sin embargo, nos permite hacer algunas consideraciones generales. Según se ha descrito en la literatura las regiones del gen con mayor porcentaje de deleciones se hallan entre los exones 2-20, para el 20% de los casos y en la región central del gen, entre los exones 44-53, para el 80% restante (Darras *et al.* 1988, den Dunnen *et al.* 1989, Gillard *et al.* 1989, Emery 1993). En la muestra analizada, como es de esperar, las deleciones se localizaron efectivamente en la mismas regiones y en una proporción muy similar, un 30% en la región 5' y un 70% en la parte central del gen.

De 26 pacientes analizados 10 presentaron deleciones, lo cual representa un 38.5%, un porcentaje mucho menor de lo esperado (65%) según se ha observado en diversos estudios a nivel mundial (Emery 1993, Florentin *et al.* 1995). Como se mencionó anteriormente, el tamaño

de la muestra no permite concluir nada al respecto, sin embargo, asumiendo que lo observado nos dé un indicio de cuál es la situación real, podemos considerar al menos dos opciones: primero, la posibilidad de que en Costa Rica el porcentaje de deleciones en pacientes distrofinopáticos sea menor a lo observado en el resto del mundo ó segundo, que por los problemas de diagnóstico clínico se hayan incluido pacientes que no son realmente distrofinopáticos y esto haya alterado el porcentaje de deleciones esperado.

Por otro lado, y tomando en consideración lo discutido antes, con respecto a los pacientes en los que no se encontraron deleciones, no se puede descartar que no sean distrofinopáticos, ya que la técnica utilizada detecta únicamente deleciones. Debe recordarse que un tercio de las mutaciones responsables de las distrofinopatías son mutaciones de punto (Roest *et al.* 1996, Tuffery *et al.* 1996), duplicaciones (Hu *et al.* 1990) e inversiones (Baxter *et al.* 1997).

En la segunda fase del estudio, fue posible resolver el caso de 6 familias mediante la estimación de dosis génica de 15 mujeres con riesgo de ser portadoras de deleciones. La técnica demostró funcionar de manera sensible y precisa, según se comprobó en la sección 3.2.1. Las razones obtenidas tanto para los controles normales como para la portadora obligada se ajustan a los valores esperados. No obstante, al tratarse de un PCR-múltiplex se observan desviaciones mínimas, aunque por lo general, los valores que corresponden a 0.5 suelen ser la mitad de aquellos que corresponden a 1. Estas variaciones pueden deberse a que las condiciones de amplificación no son óptimas para todos los pares de imprimadores en un PCR-múltiplex, por lo que no es sorprendente que los exones muestren distintos rendimientos. La temperatura óptima para que ocurra la hibridación depende de la secuencia de las bases nitrogenadas que tenga el

imprimador así como su longitud (Innis & Gelfand 1990). Tomando en cuenta estas posibles variaciones, la decisión debe fundamentarse en la evaluación del conjunto de todas las razones obtenidas con cada uno de los exones.

Los rangos más amplios de variación se observaron en los exones 19 y 45. El exón 19 presenta también coeficientes de variación más elevados que el resto, según se observa en los cuadros 6A y 8A. Cabe discutir aquí el caso del exón 45, que se encuentra particularmente alterado en la familia del paciente 8 -muestras 8a, 8b y 8c- (Cuadro 5). Si observamos la muestra 8a, todas las razones tienden a 0.5 aún aquellas que deberían ser de 1. En el caso de que esta mujer fuera portadora se esperaría en las razones en que los dos exones están deletados, valores de 1, sin embargo se mantienen constantes -cerca de 0.5-, por lo cual se interpreta como 1. Lo mismo sucede con las otras dos muestras, únicamente que en el caso de la muestra 8b las razones tienden a 0.9 y en la muestra 8c tienden a 1.5. Además, si se analiza el exón 51 que estaría deletado en el caso de ser portadoras, se puede observar que los valores son de 1 para todas las mujeres de esta familia, lo cual descarta la posibilidad de que sean portadoras. Esta es la ventaja de conocer la mutación que afecta al probando.

Según el método indirecto para estimar tasa de mutación propuesto por Haldane se esperaría que en un desorden recesivo ligado al X, como es el caso de las distrofinopatías, únicamente 1/3 de los casos sea resultado de mutaciones *de novo* (Haldane 1932, 1935). Sin embargo, de las 6 madres analizadas, ninguna fue portadora de la delección que afecta a su hijo a excepción de la portadora obligada. Haldane sugirió que la tasa de mutación en la DMD podría ser mayor en varones que en mujeres, y por lo tanto la proporción de nuevos mutantes disminuiría (Haldane 1956). No obstante, diversos estudios se ajustan al tercio esperado (Caskey *et al.* 1980).

El estudio no fue diseñado para determinar la tasa de mutación en pacientes distrofinopáticos en Costa Rica, sin embargo, los resultados podrían sugerir que en nuestra población es más frecuente que en otros países. Sería interesante analizarlo ya que este caso se ha observado, por ejemplo, en pacientes del norte de la India (Sinha *et al.* 1996).

El hecho de que ninguna de las mujeres estudiadas fue portadora de deleciones podría indicar que ninguna de ellas tiene mayor riesgo que el resto de la población de tener un hijo afectado. Sin embargo, hay un aspecto a considerar para las madres de hijos afectados que tiene grandes implicaciones en el consejo genético. Aún cuando una mujer no sea portadora en sus células somáticas, podría presentar un mosaico a nivel de línea germinal; inclusive el hecho de tener un hijo afectado aumenta la posibilidad de tener otro igualmente enfermo (Bakker *et al.* 1987, Darras *et al.* 1988). Así mismo, el hecho de que la madre no sea portadora no exime a sus hijas de serlo. Alguna podría haber recibido en el momento de su concepción, una célula germinal portadora de un alelo mutado para el gen de la distrofina. De hecho, se han descrito varios casos en la literatura en los que la madre sana transmite alelos mutados del gen de la distrofina a su descendencia (Bakker *et al.* 1987, Covone *et al.* 1991).

Las recomendaciones finales se dirigen en gran medida al cuerpo médico nacional, para que por medio de su colaboración se inicien los estudios epidemiológicos en Costa Rica, mediante la implementación de estas tecnologías. Con el diagnóstico molecular, obtendrán un beneficio directo las familias de pacientes con deleciones a través del consejo genético. De manera que, aquellas mujeres conscientes de su condición, podrán planear junto con su pareja el futuro reproductivo que desean. Así mismo, el sistema de salud costarricense se verá beneficiado al refinarse el diagnóstico clínico de las distrofinopatías.

## APÉNDICE

Cuadro 1A. Secuencias de los nueve pares de imprimadores del MMI.

Exón y tamaño	secuencia del imprimador
Exón 8 360 pb	5'-GTC-CTT-TAC-ACA-CTT-TAC-CTG-TTG-AG-3' 5'-GGC-CTC-ATT-CTC-ATG-TTC-TAA-TTA-G-3'
Exón 17 416 pb	5'-GAC-TTT-CGA-TGT-TGA-GAT-TAC-TTT-CCC-3' 5'-AAG-CTT-GAG-ATG-CTC-TCA-CCT-TTT-CC-3'
Exón 19 459 pb	5'-TTC-TAC-CAC-ATC-CCA-TTT-TCT-TCC-A-3' 5'-GAT-GGC-AAA-AGT-GTT-GAG-AAA-AAG-TC-3'
Exón 44 268 pb	5'-CTT-GAT-CCA-TAT-GCT-TTT-ACC-TGC-A-3' 5'-TCC-ATC-ACC-CTT-CAG-AAC-CTG-ATC-T-3'
Exón 45 547 pb	5'-AAA-CAT-GGA-ACA-TCC-TTG-TGG-GGA-C-3' 5'-CAT-TCC-TAT-TAG-ATC-TGT-CGT-CCT-AC-3'
Exón 48 506 pb	5'-TTG-AAT-ACA-TTG-GTT-AAA-TCC-CAA-CAT-G-3' 5'-CCT-GAA-TAA-AGT-CTT-CCT-TAC-CAC-AC-3'
Exón 12 331 pb	5'-GAT-AGT-GGG-CTT-TAC-TTA-CAT-CCT-TC-3' 5'-GAA-AGC-ACG-CAA-CAT-AAG-ATA-CAC-CT-3'
Exón 51 388 pb	5'-GAA-ATT-GGC-TCT-TTA-GCT-TGT-GTT-TC-3' 5'-GGA-GAG-TAA-AGT-GAT-TGG-TGG-AAA-ATC-3'
Exón 4 196 pb	5'-TTG-TCG-GTC-TCC-TGC-TGG-TCA-GTG-3' 5'-CAA-AGC-CCT-CAC-TCA-AAC-ATG-AAG-C-3'

Fuente: Chamberlain *et al.* 1988, 1990

Cuadro 2A. Secuencias de los nueve pares de imprimadores del MM 2.

Exón y tamaño	secuencia del imprimador
Pm 535 pb	5'-GAA-GAT-CTA-GAC-AGT-GGA-TAC-ATA-ACA-AAT-GCA-TG-3' 5'-TTC-TCC-GAA-GGT-AAT-TGC-CTC-CCA-GAT-CTG-AGT-CC-3'
Éxón 3 410 pb	5'-TCA-TCC-ATC-ATC-TTC-GGC-AGA-TTA-A-3' 5'-CAG-GCG-GTA-GAG-TAT-GCC-AAA-TGA-AAA-TCA-3'
Exón 6 202 pb	5'-CCA-CAT-GTA-GGT-CAA-AAA-TGT-AAT-GAA-3' 5'-GTC-TCA-GTA-ATC-TTC-TTA-CCT-ATG-ACT-ATG-G-3'
Exón 13 238 pb	5'-AAT-AGG-AGT-ACC-TGA-GAT-GAT-GCA-GAA-AT-3' 5'-CTG-ACC-TTA-AGT-TGT-TCT-TCC-AAA-GCA-G-3'
Exón 43 357 pb	5'-GAA-CAT-GTC-AAA-GTC-ACT-GGA-CTT-CAT-GG-3' 5'-ATA-TAT-GTG-TTA-CCT-ACC-CTT-GTC-GGT-CC-3'
Exón 47 181 pb	5'-CGT-TGT-TGC-ATT-TGT-CTG-TTT-CAG-TTA-C-3' 5'-GTC-TAA-CCT-TTA-TCC-ACT-GGA-GAT-TTG-3'
Exón 50 271 pb	5'-CAC-CAA-ATG-GAT-TAA-GAT-GTT-CAT-GAA-T-3' 5'-TCT-CTC-TCA-CCC-AGT-CAT-CAC-TTC-ATA-G-3'
Exón 52 113 pb	5'-AAT-GCA-GGA-TTT-GGA-ACA-GAG-GCG-TCC-3' 5'-TTC-GAT-CCG-TAA-TGA-TTG-TTC-TAG-CCT-C-3'
Exón 60 139 pb	5'-AGG-AGA-AAT-TGC-GCC-TCT-GAA-AGA-GAA-CG-3' 5'-CTG-CAG-AAG-CTT-CCA-TCT-GGT-GTT-CAG-G-3'

Fuente: Beggs *et al.* 1990

Cuadro 3A. Secuencias de los ocho pares de imprimadores del MM 3.

Exón y tamaño	secuencia del imprimador
pb 429 pb	5'-TCT-GGC-TCA-TGT-GTT-TGC-TCC-GAG-GTA-TAG-3' 5'-CTT-CCA-TGC-CAG-CTG-TTT-TTC-CTG-TCA-CTC-3'
Exón 16 290 pb	5'-TCT-ATG-CAA-ATG-AGC-AAA-TAC-ACG-C-3' 5'-GGT-ATC-ACT-AAC-CTG-TGC-TGT-ACT-C-3'
Exón 32 253 pb	5'-GAC-CAG-TTA-TTG-TTT-GAA-AGG-CAA-A-3' 5'-TTG-CCA-CCA-GAA-ATA-CAT-ACC-ACA-CAA-TG-3'
Exón 34 171 pb	5'-GTA-ACA-GAA-AGA-AAG-CAA-CAG-TTG-GAG-AA-3' 5'-CTT-TCC-CCA-GGC-AAC-TTC-AGA-ATC-CAA-A-3'
Exón 41 270 pb	5'-GTT-AGC-TAA-CTG-CCC-TGG-GCC-CTG-TAT-TG-3' 5'-TAG-AGT-AGT-AGT-TGC-AAA-CAC-ATA-CGT-GG-3'
Exón 42 194 pb	5'-CAC-ACT-GTC-CGT-GAA-GAA-ACG-ATG-ATG-G-3' 5'-CTT-CAG-AGA-CTC-CTC-TTG-CTT-AAA-GAG-AT-3'
Exón 49 439 pb	5'-GTG-CCC-TTA-TGT-ACC-AGG-CAG-AAA-TTG-3' 5'-GCA-ATG-ACT-CGT-TAA-TAG-CCT-TAA-GAT-C-3'
Exón 46 148 pb	5'-GCT-AGA-AGA-ACA-AAA-GAA-TAT-CTT-GTC-3' 5'-CTT-GAC-TTG-CTC-AAG-CTT-TTC-TTT-TAG-3'

Fuente: Beggs *et al.* 1994.

**Cuadro 4A. Secuencias de los cuatro pares de imprimadores del MM 4.**

Exón y tamaño	secuencia del imprimador
Exón 2 174 pb	5'-AGA-TGA-AAG-AGA-AGA-TGT-TCA-AAA-G-3' 5'-AAT-GAC-ACT-ATG-AGA-GAA-ATA-AAA-CGG-3'
Éxón 25 113 pb	5'-CAA-TTC-AGC-CCA-GTC-TAA-AC-3' 5'-CTG-AGT-GTT-AAG-TTC-TTT-GAG-3'
Exón 66 68 pb	5'-CAG-GGA-GGA-TCC-GTG-TCC-TG-3' 5'-GTC-TTC-CAA-ATG-TGC-TTT-AC-3'
Exón 79 123-137 pb	5'-GAA-AGA-TTG-TAA-ACT-AAA-GTG-TGC-3' 5'-GGA-TGC-AAA-ACA-ATG-CGC-TGC-CTC-3'

Fuente: Research Genetics Inc. (N° de catálogo M504.69m)

**Cuadro 5A . Razón entre exones a partir del área del pico de señal fluorescente para doce mujeres normales (siete pares de imprimadores).**

Exón	área del pico de señal fluorescente (valores absolutos)					
	control 1	control 2	control 3	control 4	control 5	control 6
19	291	640	977	603	1090	830
17	971	715	1110	774	1317	988
51	777	942	1219	833	1487	1234
8	1430	1240	1898	1357	2170	1826
12	345	431	871	517	932	792
44	1253	1224	1946	1442	2355	1938
4	693	997	1630	987	1701	1323
Total	5760	6189	9651	6513	11052	8931
Exones	(valor de la razón entre exones)					
	control 1	control 2	control 3	control 4	control 5	control 6
19/17	0.29969104	0.895104895	0.88018018	0.779069767	0.827638573	0.840080972
19/51	0.374517375	0.67940552	0.80147662	0.723889556	0.733019502	0.6726094
19/8	0.203496503	0.516129032	0.514752371	0.444362564	0.502304147	0.454545455
19/12	0.843478261	1.484918794	1.121699196	1.166344294	1.169527897	1.047979798
19/44	0.232242618	0.522875817	0.502055498	0.418169209	0.462845011	0.428276574
19/4	0.41991342	0.641925777	0.599386503	0.610942249	0.64079953	0.627362056
19/Total	0.050520833	0.103409275	0.101233033	0.092584063	0.098624683	0.092934722
17/19	3.336769759	1.1171875	1.136131013	1.28358209	1.208256881	1.190361446
17/51	1.24967825	0.759023355	0.910582445	0.929171669	0.885675857	0.800648298
17/8	0.679020979	0.576612903	0.584826133	0.570375829	0.606912442	0.541073384
17/12	2.814492754	1.658932715	1.274397245	1.497098646	1.413090129	1.247474747
17/44	0.774940144	0.584150327	0.570400822	0.536754508	0.559235669	0.509803922
17/4	1.401154401	0.717151454	0.680981595	0.784194529	0.774250441	0.746787604
17/Total	0.168576389	0.115527549	0.115013988	0.118839245	0.119163952	0.11062591
51/19	2.670103093	1.471875	1.247697032	1.381426202	1.364220183	1.486746988
51/17	0.800205973	1.317482517	1.098198198	1.098198198	1.129081245	1.248987854
51/8	0.543356643	0.759677419	0.642255005	0.642255005	0.685253456	0.675794085
51/12	2.252173913	2.185614849	1.399540758	1.399540758	1.595493562	1.558080808
51/44	0.620111732	0.769607843	0.626413155	0.626413155	0.631422505	0.636738906
51/4	1.121212121	0.944834504	0.747852761	0.747852761	0.874191652	0.932728647
51/Total	0.134895833	0.152205526	0.126308155	0.126308155	0.134545784	0.138170418
8/19	4.914089347	1.9375	1.942681679	2.250414594	1.990825688	2.2
8/17	1.472708548	1.734265734	1.70990991	1.753229974	1.647684131	1.848178138
8/51	1.84041184	1.316348195	1.557013946	1.629051621	1.459314055	1.479740681
8/12	4.144927536	2.877030162	2.179104478	2.624758221	2.32832618	2.305555556
8/44	1.141260974	1.013071895	0.975334018	0.941054092	0.921443737	0.942208462
8/4	2.063492063	1.243731194	1.164417178	1.374873354	1.275720165	1.380196523
8/Total	0.248263889	0.200355469	0.196663558	0.208352526	0.196344553	0.204456388

**Cuadro 5A (continuación). Razón entre exones a partir del área del pico de señal fluorescente para doce mujeres normales (siete pares de imprimadores).**

Exones	(valor de la razón entre exones)					
	control 1	control 2	control 3	control 4	control 5	control 6
12/19	1.18556701	0.6734375	0.891504606	0.857379768	0.855045872	0.954216867
12/17	0.355303811	0.602797203	0.784684685	0.667958656	0.707668945	0.801619433
12/51	0.444015444	0.457537155	0.714520098	0.620648259	0.626765299	0.641815235
12/8	0.241258741	0.347580645	0.45890411	0.380987472	0.429493088	0.43373494
12/44	0.275339186	0.352124183	0.447584789	0.35852982	0.395753715	0.408668731
12/4	0.497835498	0.432296891	0.534355828	0.523809524	0.547912992	0.598639456
12/Total	0.059895833	0.069639683	0.090249715	0.079379702	0.084328628	0.088679879
44/19	4.305841924	1.9125	1.991811668	2.391376451	2.160550459	2.334939759
44/17	1.290422245	1.711888112	1.753153153	1.863049096	1.788154897	1.961538462
44/51	1.612612613	1.299363057	1.596390484	1.731092437	1.583725622	1.570502431
44/8	0.876223776	0.987096774	1.025289779	1.062638172	1.085253456	1.061336254
44/12	3.631884058	2.839907193	2.234213548	2.789168279	2.526824034	2.446969697
44/4	1.808080808	1.227683049	1.193865031	1.460992908	1.384479718	1.464852608
44/Total	0.217534722	0.197770238	0.201637136	0.221403347	0.213083605	0.216996977
4/19	2.381443299	1.5578125	1.668372569	1.63681592	1.560550459	1.593975904
4/17	0.713697219	1.394405594	1.468468468	1.275193798	1.291571754	1.339068826
4/51	0.891891892	1.058386412	1.337161608	1.18487395	1.143913921	1.072123177
4/8	0.484615385	0.804032258	0.858798736	0.72733972	0.783870968	0.724534502
4/12	2.008695652	2.313225058	1.87141217	1.909090909	1.825107296	1.670454545
4/44	0.553072626	0.814542484	0.837615622	0.684466019	0.722292994	0.682662539
4/Total	0.1203125	0.16109226	0.168894415	0.151543068	0.153908795	0.148135707

**Cuadro 5A (continuación). Razón entre exones a partir del área del pico de señal fluorescente para doce mujeres normales (siete pares de imprimadores).**

Exón	área del pico de señal fluorescente (valores absolutos)					
	control 7	control 8	control 9	control 10	control 11	control 12
19	757	469	660	440	1529	1505
17	1072	1028	752	612	2262	1946
51	1324	1406	951	792	2765	2203
8	1986	2184	1188	1181	4365	3325
12	705	654	544	277	1107	1047
44	2134	2102	1316	1006	4130	3301
4	1446	1445	956	840	2966	2325
Total	9424	9288	6367	5148	19124	15652
Exones	(valor de la razón entre exones)					
	control 7	control 8	control 9	control 10	control 11	control 12
19/17	0.706156716	0.456225681	0.877659574	0.718954248	0.675950486	0.773381295
19/51	0.571752266	0.333570413	0.694006309	0.555555556	0.552983725	0.683159328
19/8	0.381168177	0.21474359	0.555555556	0.372565622	0.350286369	0.452631579
19/12	1.073758865	0.717125382	1.213235294	1.588447653	1.381210479	1.437440306
19/44	0.354732896	0.223120837	0.501519757	0.437375746	0.370217918	0.455922448
19/4	0.52351314	0.324567474	0.690376569	0.523809524	0.515509103	0.647311828
19/Total	0.080326825	0.050495263	0.103659494	0.085470085	0.079951893	0.096153846
17/19	1.416116248	2.191897655	1.139393939	1.390909091	1.4793983	1.293023256
17/51	0.809667674	0.731152205	0.790746583	0.772727273	0.818083183	0.883340899
17/8	0.539778449	0.470695971	0.632996633	0.518204911	0.518213058	0.585263158
17/12	1.520567376	1.571865443	1.382352941	2.209386282	2.043360434	1.858643744
17/44	0.502343018	0.48905804	0.571428571	0.608349901	0.547699758	0.589518328
17/4	0.741355463	0.711418685	0.786610879	0.728571429	0.762643291	0.836989247
17/Total	0.113752122	0.110680448	0.118109	0.118881119	0.118280694	0.124329159
51/19	1.749009247	2.997867804	1.440909091	1.8	1.808371485	1.463787375
51/17	1.235074627	1.36770428	1.26462766	1.294117647	1.222369584	1.132065776
51/8	0.666666667	0.643772894	0.800505051	0.67061812	0.633447881	0.662556391
51/12	1.878014184	2.149847095	1.748161765	2.859205776	2.497741644	2.104106972
51/44	0.620431115	0.668886775	0.722644377	0.787276342	0.669491525	0.667373523
51/4	0.915629322	0.973010381	0.994769874	0.942857143	0.932231962	0.947526882
51/Total	0.14049236	0.151378122	0.149363908	0.153846154	0.144582723	0.140748786
8/19	2.623513871	4.656716418	1.8	2.684090909	2.854807063	2.209302326
8/17	1.85261194	2.124513619	1.579787234	1.929738562	1.929708223	1.708633094
8/51	1.5	1.553342817	1.249211356	1.491161616	1.578661844	1.509305493
8/12	2.817021277	3.339449541	2.183823529	4.263537906	3.943089431	3.17574021
8/44	0.930646673	1.039010466	0.902735562	1.173956262	1.056900726	1.007270524
8/4	1.373443983	1.511418685	1.242677824	1.405952381	1.471679029	1.430107527
8/Total	0.21073854	0.235142119	0.18658709	0.229409479	0.228247229	0.212432916

**Cuadro 5A (continuación). Razón entre exones a partir del área del pico de señal fluorescente para doce mujeres normales (siete pares de imprimadores).**

Exones	(valor de la razón entre exones)					
	control 7	control 8	control 9	control 10	control 11	control 12
12/19	0.931307794	1.39445629	0.824242424	0.629545455	0.724002616	0.695681063
12/17	0.657649254	0.63618677	0.723404255	0.452614379	0.48938992	0.538026721
12/51	0.532477341	0.46514936	0.572029443	0.349747475	0.400361664	0.475261008
12/8	0.354984894	0.299450549	0.457912458	0.234546994	0.253608247	0.314887218
12/44	0.330365511	0.311132255	0.41337386	0.275347913	0.268038741	0.317176613
12/4	0.487551867	0.452595156	0.569037657	0.329761905	0.373229939	0.450322581
12/Total	0.074808998	0.070413437	0.085440553	0.053807304	0.05788538	0.06689241
44/19	2.819022457	4.481876333	1.993939394	2.286363636	2.701111838	2.193355482
44/17	1.990671642	2.044747082	1.75	1.64379085	1.82581786	1.696300103
44/51	1.611782477	1.495021337	1.383806519	1.27020202	1.493670886	1.498411257
44/8	1.074521652	0.962454212	1.107744108	0.851820491	0.946162658	0.992781955
44/12	3.026950355	3.214067278	2.419117647	3.631768953	3.730803975	3.152817574
44/4	1.475795297	1.45467128	1.376569038	1.197619048	1.392447741	1.419784946
44/Total	0.226443124	0.226313523	0.206690749	0.195415695	0.215959004	0.210899566
4/19	1.910171731	3.081023454	1.448484848	1.909090909	1.939829954	1.544850498
4/17	1.348880597	1.405642023	1.271276596	1.37254902	1.311229001	1.194758479
4/51	1.092145015	1.027738265	1.005257624	1.060606061	1.072694394	1.055379029
4/8	0.728096677	0.661630037	0.804713805	0.711261643	0.679495991	0.69924812
4/12	2.05106383	2.209480122	1.757352941	3.032490975	2.67931346	2.220630372
4/44	0.67760075	0.687440533	0.726443769	0.83499006	0.718159806	0.704332021
4/Total	0.153438031	0.155577089	0.150149207	0.163170163	0.155093077	0.148543317

Cuadro 6A. Promedio de la razón entre exones de doce mujeres normales (siete pares de imprimadores).

Razón entre exones	x valor promedio	s desviación estándar	C. V. coeficiente de variación
19/17	0.727507786	0.181211443	0.249085229
19/51	0.614662131	0.143081933	0.232781436
19/8	0.41354508	0.11415369	0.276036871
19/12	1.187097185	0.257077579	0.216559843
19/44	0.409112861	0.09853095	0.240840509
19/4	0.563784764	0.107045942	0.189870228
19/Total	0.086280335	0.018557942	0.215088895
17/19	1.515252265	0.643051293	0.424385634
17/51	0.861708141	0.137306911	0.15934271
17/8	0.568664488	0.056139376	0.098721438
17/12	1.707638538	0.457715304	0.268039924
17/44	0.570306917	0.074177009	0.13006507
17/4	0.806009085	0.191894348	0.238079634
17/Total	0.120981631	0.015478139	0.12793793
51/19	1.740167792	0.545194161	0.313299765
51/17	1.184009463	0.149614903	0.126362928
51/8	0.668846551	0.063955105	0.095619997
51/12	1.968960174	0.453679933	0.230416003
51/44	0.670567579	0.058613904	0.087409391
51/4	0.922891501	0.101076948	0.109522028
51/Total	0.141070494	0.009534482	0.067586651
8/19	2.671995158	1.040645111	0.389463696
8/17	1.774247425	0.175261431	0.098780716
8/51	1.513630289	0.148152956	0.097879222
8/12	3.015197002	0.762946769	0.253033804
8/44	1.003741116	0.086809599	0.086486044
8/4	1.411475825	0.229421998	0.162540508
8/Total	0.213082813	0.01843248	0.086503831
12/19	0.884698939	0.220328678	0.249043679
12/17	0.618108669	0.136374517	0.220631944
12/51	0.525027315	0.110679745	0.210807594
12/8	0.350612446	0.083151506	0.237160736
12/44	0.34611961	0.060158464	0.17380831
12/4	0.483112441	0.079559361	0.164680836
12/Total	0.073451794	0.012401816	0.168842924

**Cuadro 6A (continuación). Promedio de la razón entre exones de doce mujeres normales (siete pares de imprimadores).**

Razón entre exones	x valor promedio	s desviación estándar	C.V. coeficiente de variación
44/19	2.63105745	0.867517763	0.329722091
44/17	1.776627792	0.197221889	0.11100912
44/51	1.512215095	0.136412616	0.090207152
44/8	1.002776941	0.08227868	0.08205083
44/12	2.970374382	0.514828044	0.173320928
44/4	1.404736789	0.164400218	0.117032756
44/Total	0.212512307	0.010381445	0.048851029
4/19	1.852701837	0.465189545	0.251087107
4/17	1.282228448	0.193133873	0.150623607
4/51	1.083514279	0.107230499	0.098965469
4/8	0.722303153	0.094685757	0.131088666
4/12	2.129026444	0.398171709	0.187020556
4/44	0.720301602	0.079583177	0.110485909
4/Total	0.152488136	0.011880814	0.077913037

**Cuadro 7A. Razón entre exones a partir del área del pico de señal fluorescente para nueve mujeres normales (nueve pares de imprimadores).**

Exón	área del pico de señal fluorescente (valores absolutos)				
	control 13	control 14	control 15	control 16	control 17
45	691	748	1028	729	1288
48	931	941	1307	955	1625
19	291	640	977	603	1090
17	971	715	1110	774	1317
51	777	942	1219	833	1487
8	1430	1240	1898	1357	2170
12	345	431	871	517	932
44	1253	1224	1946	1442	2355
4	693	997	1630	987	1701
Total	7382	7878	11986	8197	13965

Exones	(valor de la razón entre exones)				
	control 13	control 14	control 15	control 16	control 17
45/48	0.74221267	0.79489904	0.78653405	0.76335079	0.79261538
45/19	2.37457045	1.16875	1.05220061	1.20895522	1.18165138
45/17	0.71163749	1.04615385	0.92612613	0.94186047	0.97798026
45/51	0.88931789	0.7940552	0.84331419	0.87515006	0.8661735
45/8	0.48321678	0.60322581	0.54162276	0.53721444	0.59354839
45/12	2.00289855	1.73549884	1.18025258	1.41005803	1.38197425
45/44	0.55147646	0.61111111	0.5282631	0.50554785	0.54692144
45/4	0.997114	0.75025075	0.63067485	0.73860182	0.75720165
45/Total	0.09360607	0.09494796	0.08576673	0.08893498	0.09223058
48/45	1.34732272	1.25802139	1.27140078	1.31001372	1.26164596
48/19	3.19931271	1.4703125	1.33776868	1.58374793	1.49082569
48/17	0.95880536	1.31608392	1.17747748	1.23385013	1.23386484
48/51	1.1981982	0.99893843	1.07219032	1.14645858	1.0928043
48/8	0.65104895	0.75887097	0.6886196	0.70375829	0.74884793
48/12	2.69855072	2.18329466	1.50057405	1.84719536	1.74356223
48/44	0.74301676	0.76879085	0.67163412	0.66227462	0.69002123
48/4	1.34343434	0.94383149	0.80184049	0.96757852	0.9553204
48/Total	0.12611758	0.11944656	0.10904388	0.11650604	0.11636233
19/45	0.4211288	0.85561497	0.95038911	0.82716049	0.84627329
19/48	0.31256713	0.68012752	0.74751339	0.63141361	0.67076923
19/17	0.29969104	0.8951049	0.88018018	0.77906977	0.82763857
19/51	0.37451737	0.67940552	0.80147662	0.72388956	0.7330195
19/8	0.2034965	0.51612903	0.51475237	0.44436256	0.50230415
19/12	0.84347826	1.48491879	1.1216992	1.16634429	1.1695279
19/44	0.23224262	0.52287582	0.5020555	0.41816921	0.46284501
19/4	0.41991342	0.64192578	0.5993865	0.61094225	0.64079953
19/Total	0.03942021	0.08123889	0.08151176	0.0735635	0.07805227

**Cuadro 7A. Razón entre exones a partir del área del pico de señal fluorescente para nueve mujeres normales (nueve pares de imprimadores).**

Exones	(valor de la razón entre exones)				
	control 13	control 14	control 15	control 16	control 17
17/45	1.40520984	0.95588235	1.07976654	1.0617284	1.02251553
17/48	1.04296455	0.75982997	0.84927314	0.8104712	0.81046154
17/19	3.33676976	1.1171875	1.13613101	1.28358209	1.20825688
17/51	1.24967825	0.75902335	0.91058244	0.92917167	0.88567586
17/8	0.67902098	0.5766129	0.58482613	0.57037583	0.60691244
17/12	2.81449275	1.65893271	1.27439724	1.49709865	1.41309013
17/44	0.77494014	0.58415033	0.57040082	0.53675451	0.55923567
17/4	1.4011544	0.71715145	0.6809816	0.78419453	0.77425044
17/Total	0.13153617	0.09075908	0.09260804	0.09442479	0.0943072
51/45	1.12445731	1.25935829	1.18579767	1.14266118	1.15450311
51/48	0.83458647	1.0010627	0.93267024	0.87225131	0.91507692
51/19	2.67010309	1.471875	1.24769703	1.3814262	1.36422018
51/17	0.80020597	1.31748252	1.0981982	1.0981982	1.12908125
51/8	0.54335664	0.75967742	0.64225501	0.64225501	0.68525346
51/12	2.25217391	2.18561485	1.39954076	1.39954076	1.59549356
51/44	0.62011173	0.76960784	0.62641316	0.62641316	0.63142251
51/4	1.12121212	0.9448345	0.74785276	0.74785276	0.87419165
51/Total	0.10525603	0.1195735	0.10170199	0.10170199	0.10648049
8/45	2.06946454	1.65775401	1.8463035	1.86145405	1.68478261
8/48	1.53598281	1.31774708	1.8463035	1.42094241	1.33538462
8/19	4.91408935	1.9375	1.94268168	2.25041459	1.99082569
8/17	1.47270855	1.73426573	1.70990991	1.75322997	1.64768413
8/51	1.84041184	1.3163482	1.55701395	1.62905162	1.45931406
8/12	4.14492754	2.87703016	2.17910448	2.62475822	2.32832618
8/44	1.14126097	1.0130719	0.97533402	0.94105409	0.92144374
8/4	2.06349206	1.24373119	1.16441718	1.37487335	1.27572016
8/Total	0.19371444	0.15740036	0.15835141	0.16554837	0.15538847
12/45	0.49927641	0.57620321	0.84727626	0.70919067	0.72360248
12/48	0.37056928	0.45802338	0.66641163	0.54136126	0.57353846
12/19	1.18556701	0.6734375	0.89150461	0.85737977	0.85504587
12/17	0.35530381	0.6027972	0.78468468	0.66795866	0.70766894
12/51	0.44401544	0.45753715	0.7145201	0.62064826	0.6267653
12/8	0.24125874	0.34758065	0.45890411	0.38098747	0.42949309
12/44	0.27533919	0.35212418	0.44758479	0.35852982	0.39575372
12/4	0.4978355	0.43229689	0.53435583	0.52380952	0.54791299
12/Total	0.0467353	0.05470932	0.07266811	0.06307186	0.06673827

**Cuadro 7A (continuación). Razón entre exones a partir del área del pico de señal fluorescente para nueve mujeres normales (nueve pares de imprimadores).**

Exones	(valor de la razón entre exones)				
	control 13	control 14	control 15	control 16	control 17
44/45	1.81331404	1.63636364	1.89299611	1.97805213	1.82841615
44/48	1.34586466	1.30074389	1.48890589	1.50994764	1.44923077
44/19	4.30584192	1.9125	1.99181167	2.39137645	2.16055046
44/17	1.29042225	1.71188811	1.75315315	1.8630491	1.7881549
44/51	1.61261261	1.29936306	1.59639048	1.73109244	1.58372562
44/8	0.87622378	0.98709677	1.02528978	1.06263817	1.08525346
44/12	3.63188406	2.83990719	2.23421355	2.78916828	2.52682403
44/4	1.80808081	1.22768305	1.19386503	1.46099291	1.38447972
44/Total	0.1697372	0.15536938	0.16235608	0.17591802	0.16863588
4/45	1.00289436	1.3328877	1.58560311	1.35390947	1.32065217
4/48	0.7443609	1.05951116	1.24713083	1.03350785	1.04676923
4/19	2.3814433	1.5578125	1.66837257	1.63681592	1.56055046
4/17	0.71369722	1.39440559	1.46846847	1.2751938	1.29157175
4/51	0.89189189	1.05838641	1.33716161	1.18487395	1.14391392
4/8	0.48461538	0.80403226	0.85879874	0.72733972	0.78387097
4/12	2.00869565	2.31322506	1.87141217	1.90909091	1.8251073
4/44	0.55307263	0.81454248	0.83761562	0.68446602	0.72229299
4/Total	0.093877	0.12655496	0.13599199	0.12040991	0.12180451

**Cuadro 7A. Razón entre exones a partir del área del pico de señal fluorescente para nueve mujeres normales (nueve pares de imprimadores).**

Exón	área del pico de señal fluorescente (valores absolutos)			
	control 18	control 19	control 20	control 21
45	1003	1156	1134	734
48	1271	1328	1406	952
19	830	757	469	660
17	988	1072	1028	752
51	1234	1324	1406	951
8	1826	1986	2184	1188
12	792	705	654	544
44	1938	2134	2102	1316
4	1323	1446	1445	956
Total	11205	11908	11828	8053

Exones	(valor de la razón entre exones)			
	control 18	control 19	control 20	control 21
45/48	0.78914241	0.87048193	0.80654339	0.7710084
45/19	1.20843373	1.52708058	2.41791045	1.11212121
45/17	1.01518219	1.07835821	1.10311284	0.97606383
45/51	0.81280389	0.87311178	0.80654339	0.77181914
45/8	0.54928806	0.58207452	0.51923077	0.61784512
45/12	1.26641414	1.63971631	1.73394495	1.34926471
45/44	0.51754386	0.54170572	0.5394862	0.55775076
45/4	0.75812547	0.79944675	0.78477509	0.76778243
45/Total	0.08951361	0.09707759	0.0958742	0.09114616
48/45	1.2671984	1.14878893	1.23985891	1.29700272
48/19	1.5313253	1.75429326	2.9978678	1.44242424
48/17	1.28643725	1.23880597	1.36770428	1.26595745
48/51	1.02998379	1.00302115	1	1.00105152
48/8	0.69605696	0.66868077	0.64377289	0.8013468
48/12	1.60479798	1.88368794	2.14984709	1.75
48/44	0.65583075	0.62230553	0.66888677	0.72340426
48/4	0.96069539	0.91839557	0.97301038	0.9958159
48/Total	0.1134315	0.11152167	0.11887048	0.11821681
19/45	0.82751745	0.65484429	0.41358025	0.89918256
19/48	0.65302911	0.57003012	0.33357041	0.69327731
19/17	0.84008097	0.70615672	0.45622568	0.87765957
19/51	0.6726094	0.57175227	0.33357041	0.69400631
19/8	0.45454545	0.38116818	0.21474359	0.55555556
19/12	1.0479798	1.07375887	0.71712538	1.21323529
19/44	0.42827657	0.3547329	0.22312084	0.50151976
19/4	0.62736206	0.52351314	0.32456747	0.69037657
19/Total	0.07407407	0.06357071	0.03965167	0.08195703

**Cuadro 7A (continuación). Razón entre exones a partir del área del pico de señal fluorescente para nueve mujeres normales (nueve pares de imprimadores).**

Exones	(valor de la razón entre exones)			
	control 18	control 19	control 20	control 21
17/45	0.98504487	0.92733564	0.90652557	1.02452316
17/48	0.77734068	0.80722892	0.7311522	0.78991597
17/19	1.19036145	1.41611625	2.19189765	1.13939394
17/51	0.8006483	0.80966767	0.7311522	0.79074658
17/8	0.54107338	0.53977845	0.47069597	0.63299663
17/12	1.24747475	1.52056738	1.57186544	1.38235294
17/44	0.50980392	0.50234302	0.48905804	0.57142857
17/4	0.7467876	0.74135546	0.71141869	0.78661088
17/Total	0.08817492	0.09002351	0.08691241	0.09338135
51/45	1.23030907	1.14532872	1.23985891	1.29564033
51/48	0.97088906	0.99698795	1	0.99894958
51/19	1.48674699	1.74900925	2.9978678	1.44090909
51/17	1.24898785	1.23507463	1.36770428	1.26462766
51/8	0.67579409	0.66666667	0.64377289	0.80050505
51/12	1.55808081	1.87801418	2.14984709	1.74816176
51/44	0.63673891	0.62043112	0.66888677	0.72264438
51/4	0.93272865	0.91562932	0.97301038	0.99476987
51/Total	0.11012941	0.11118576	0.11887048	0.11809264
8/45	1.82053838	1.71799308	1.92592593	1.61852861
8/48	1.43666404	1.49548193	1.55334282	1.24789916
8/19	2.2	2.62351387	4.65671642	1.8
8/17	1.84817814	1.85261194	2.12451362	1.57978723
8/51	1.47974068	1.5	1.55334282	1.24921136
8/12	2.30555556	2.81702128	3.33944954	2.18382353
8/44	0.94220846	0.93064667	1.03901047	0.90273556
8/4	1.38019652	1.37344398	1.51141869	1.24267782
8/Total	0.16296296	0.16677864	0.1846466	0.14752266
12/45	0.78963111	0.60986159	0.57671958	0.74114441
12/48	0.62313139	0.53087349	0.46514936	0.57142857
12/19	0.95421687	0.93130779	1.39445629	0.82424242
12/17	0.80161943	0.65764925	0.63618677	0.72340426
12/51	0.64181524	0.53247734	0.46514936	0.57202944
12/8	0.43373494	0.35498489	0.29945055	0.45791246
12/44	0.40866873	0.33036551	0.31113225	0.41337386
12/4	0.59863946	0.48755187	0.45259516	0.56903766
12/Total	0.07068273	0.0592039	0.05529253	0.06755246

**Cuadro7A (continuación). Razón entre exones a partir del área del pico de señal fluorescente para nueve mujeres normales (nueve pares de imprimadores).**

Exones	(valor de la razón entre exones)			
	control 18	control 19	control 20	control 21
44/45	1.93220339	1.84602076	1.85361552	1.79291553
44/48	1.52478363	1.60692771	1.49502134	1.38235294
44/19	2.33493976	2.81902246	4.48187633	1.99393939
44/17	1.96153846	1.99067164	2.04474708	1.75
44/51	1.57050243	1.61178248	1.49502134	1.38380652
44/8	1.06133625	1.07452165	0.96245421	1.10774411
44/12	2.4469697	3.02695035	3.21406728	2.41911765
44/4	1.46485261	1.4757953	1.45467128	1.37656904
44/Total	0.1729585	0.17920726	0.1777139	0.16341736
4/45	1.31904287	1.25086505	1.27425044	1.30245232
4/48	1.04091267	1.08885542	1.02773826	1.00420168
4/19	1.5939759	1.91017173	3.08102345	1.44848485
4/17	1.33906883	1.3488806	1.40564202	1.2712766
4/51	1.07212318	1.09214502	1.02773826	1.00525762
4/8	0.7245345	0.72809668	0.66163004	0.8047138
4/12	1.67045455	2.05106383	2.20948012	1.75735294
4/44	0.68266254	0.67760075	0.68744053	0.72644377
4/Total	0.11807229	0.12143097	0.12216774	0.11871352

**Cuadro 8A. Promedio de la razón entre exones de nueve mujeres normales (nueve pares de imprimadores).**

Razón entre exones	x valor promedio	s desviación estándar	C.V. coeficiente de variación
45/48	0.790754229	0.035608959	0.045031639
45/19	1.472408182	0.540032318	0.366768078
45/17	0.975163916	0.115450079	0.118390434
45/51	0.836921005	0.041823159	0.049972649
45/8	0.558585183	0.043787461	0.078389944
45/12	1.522224707	0.269191762	0.176841015
45/44	0.544422945	0.030015809	0.055133254
45/4	0.775996978	0.095812059	0.123469629
45/Total	0.092121985	0.003659572	0.039725287
48/45	1.266805948	0.054818938	0.043273351
48/19	1.867542013	0.708761862	0.379515886
48/17	1.230998518	0.115787787	0.094060054
48/51	1.060294033	0.073099912	0.068943057
48/8	0.706778128	0.052923731	0.074880262
48/12	1.929056672	0.365629012	0.189537724
48/44	0.689573877	0.046683555	0.067699135
48/4	0.984435833	0.145853758	0.148159741
48/Total	0.116612985	0.004993045	0.042817228
19/45	0.74396569	0.201512532	0.270862669
19/48	0.588033094	0.157678539	0.268145689
19/17	0.729089711	0.198984991	0.272922506
19/51	0.620471885	0.163134675	0.262920334
19/8	0.420784155	0.13022161	0.309473653
19/12	1.093118642	0.219674804	0.200961538
19/44	0.405093135	0.112995387	0.278936811
19/4	0.564309635	0.119968413	0.212593239
19/Total	0.06811557	0.017180877	0.252231274
17/45	1.040947988	0.148565392	0.142721244
17/48	0.819848686	0.090245509	0.110075811
17/19	1.557744059	0.747184899	0.47965832
17/51	0.874038482	0.15641612	0.178957933
17/8	0.578032525	0.059698254	0.103278365
17/12	1.597808	0.475487776	0.297587555
17/44	0.566457224	0.085193679	0.150397374
17/4	0.81598945	0.222296093	0.272425205
17/Total	0.095791941	0.013661722	0.142618694

**Cuadro 8A (continuación). Promedio de la razón entre exones de nueve mujeres normales (nueve pares de imprimadores).**

Razón entre exones	x valor promedio	s desviación estándar	C.V. coeficiente de variación
51/45	1.197546064	0.060599831	0.05060334
51/48	0.946941581	0.06219785	0.06568288
51/19	1.756650516	0.630727805	0.359051388
51/17	1.173284506	0.169153085	0.144170561
51/8	0.673281803	0.073756353	0.109547521
51/12	1.796274188	0.336393467	0.187272895
51/44	0.658074396	0.053332067	0.081042611
51/4	0.916898003	0.117774134	0.128448458
51/Total	0.110332473	0.00714897	0.064794796
8/45	1.800304968	0.144903438	0.080488273
8/48	1.465527596	0.175898536	0.120024035
8/19	2.701749066	1.207101171	0.44678508
8/17	1.746987692	0.186595696	0.106809966
8/51	1.509381612	0.171947365	0.11391908
8/12	2.755555164	0.647217799	0.234877461
8/44	0.978529542	0.075301695	0.076953931
8/4	1.403330108	0.267950493	0.190939032
8/Total	0.165812657	0.014628633	0.088223864
12/45	0.674767303	0.114709874	0.169999159
12/48	0.533387425	0.090639724	0.169932247
12/19	0.951906459	0.214092845	0.224909541
12/17	0.659697001	0.131644312	0.199552692
12/51	0.563884182	0.095144711	0.168730945
12/8	0.378256322	0.075017457	0.198324398
12/44	0.365874672	0.055174875	0.150802663
12/4	0.516003874	0.053879805	0.104417442
12/Total	0.061850498	0.008532297	0.137950336
44/45	1.84154414	0.096888891	0.052612853
44/48	1.455975387	0.096650228	0.066381773
44/19	2.710206494	0.994156185	0.36681935
44/17	1.794847188	0.223146767	0.124326332
44/51	1.542699664	0.130969404	0.084896242
44/8	1.026950909	0.073412567	0.071485956
44/12	2.792122454	0.444491542	0.15919486
44/4	1.427443304	0.176559568	0.123689374
44/Total	0.169479286	0.007932202	0.046803373

**Cuadro 8A (continuación). Promedio de la razón entre exones de nueve mujeres normales (nueve pares de imprimadores).**

Razón entre exones	x valor promedio	s desviación estándar	C.V. coeficiente de variación
4/45	1.30472861	0.148954664	0.114165247
4/48	1.032554224	0.129467618	0.125385781
4/19	1.870961187	0.532901295	0.284827552
4/17	1.278689431	0.221795251	0.173455138
4/51	1.090387985	0.124811608	0.114465319
4/8	0.73084801	0.1092453	0.149477454
4/12	1.95732028	0.209507015	0.107037676
4/44	0.709570815	0.083080456	0.117085504
4/Total	0.119891432	0.011161085	0.093093268

Cuadro 9A . Razón entre exones a partir del área del pico de señal fluorescente para mujeres a riesgo de ser portadoras de deleciones (siete pares de imprimadores).

Exón	área del pico de señal fluorescente de cada exón para cada una de las posibles portadoras								
	7a	7b	7c	7d	3a	3b	3c	3d	12a
19	1239	1619	1298	1366	796	574	777	798	1606
17	1892	2001	1590	1489	1263	678	1086	940	1834
51	2163	2307	1843	1626	1382	851	1304	1382	2447
8	3030	3388	2855	2552	2371	1254	1737	1901	3435
12	1106	1121	857	738	703	621	723	774	1156
44	3039	3483	2742	2456	2284	1281	1985	2033	3676
4	2508	2549	2095	2013	1467	946	1217	1264	1962
Total	14977	16468	13280	12240	10266	7504	11126	11464	16116

Exones	valor de la razón entre exones para cada posible portadora								
	7a	7b	7c	7d	3a	3b	3c	3d	12a
19/17	0.654862579	0.809095452	0.816352201	0.917394224	0.630245447	0.84660767	0.715469613	0.84893617	0.87568157
19/51	0.572815534	0.7017772	0.704286489	0.840098401	0.575976845	0.674500588	0.595858896	0.577424023	0.656313854
19/8	0.408910891	0.477863046	0.454640981	0.535266458	0.335723323	0.457735247	0.447322971	0.419779064	0.467540029
19/12	1.120253165	1.444246209	1.514585764	1.850948509	1.132290185	0.92431562	1.074688797	1.031007752	1.389273356
19/44	0.407699901	0.46482917	0.473377097	0.556188925	0.348511384	0.448087432	0.391435768	0.392523364	0.436887922
19/4	0.494019139	0.63515104	0.619570406	0.67858917	0.542603954	0.606765328	0.638455218	0.631329114	0.818552497
19/Total	0.082726848	0.098311878	0.097740964	0.111601307	0.077537502	0.076492537	0.069836419	0.069609211	0.099652519
17/19	1.527037934	1.235948116	1.224961479	1.090043924	1.586683417	1.181184669	1.397683398	1.177944862	1.141967621
17/51	0.874711049	0.867360208	0.86272382	0.915744157	0.913892909	0.796709753	0.832822086	0.680173661	0.74948917
17/8	0.624422442	0.590613932	0.556917688	0.58346395	0.53268663	0.540669856	0.625215889	0.494476591	0.533915575
17/12	1.710669078	1.785013381	1.855309218	2.017615176	1.79658606	1.09178744	1.502074689	1.214470284	1.58650519
17/44	0.622573215	0.574504737	0.579868709	0.606270358	0.552977233	0.529274005	0.547103275	0.46237088	0.498911861
17/4	0.754385965	0.785013731	0.758949881	0.739692002	0.860940695	0.716701903	0.892358258	0.743670886	0.934760449
17/Total	0.126327035	0.12150838	0.119728916	0.121650327	0.123027469	0.090351812	0.097609204	0.081995813	0.11379995

Cuadro 9A (continuación). Razón entre exones a partir del área del pico de señal fluorescente para mujeres a riesgo de ser portadoras de delecciones (siete pares de imprimadores).

Exón	área del pico de señal fluorescente de cada exón para cada una de las posibles portadoras							12a		
	7a	7b	7c	7d	3a	3b	3c	3d	3e	12a
51/19	1.745762712	1.424953675	1.419876733	1.19033675	1.736180905	1.482578397	1.678249678	1.731829574	1.731829574	1.52366127
51/17	1.143234672	1.152923538	1.159119497	1.092008059	1.094220111	1.255162242	1.255162242	1.470212766	1.470212766	1.334242094
51/8	0.713861386	0.680932704	0.645534151	0.637147335	0.582876423	0.678628389	0.678628389	0.726985797	0.726985797	0.712372635
51/12	1.955696203	2.057983943	2.150525088	2.203252033	1.965860597	1.37037037	1.37037037	1.785529716	1.785529716	2.116782007
51/44	0.711747285	0.662360034	0.672137126	0.662052117	0.605078809	0.664324746	0.664324746	0.679783571	0.679783571	0.665669206
51/4	0.862440191	0.905060808	0.879713604	0.807749627	0.942058623	0.899577167	0.899577167	1.09335443	1.09335443	1.247196738
51/Total	0.144421446	0.140089871	0.13878012	0.132843137	0.134619131	0.113406183	0.113406183	0.120551291	0.120551291	0.151836684
8/19	2.445520581	2.092649784	2.19953775	1.868228404	2.978643216	2.18466899	2.235521236	2.382205514	2.382205514	2.138854296
8/17	1.601479915	1.693153423	1.795597484	1.713901948	1.877276326	1.849557322	1.599447514	2.022340426	2.022340426	1.872955289
8/51	1.400832178	1.468573906	1.549104721	1.569495695	1.715629522	1.473560517	1.332055215	1.375542692	1.375542692	1.403759706
8/12	2.73960217	3.022301517	3.331388565	3.45799458	3.372688478	2.019323671	2.402489627	2.456072351	2.456072351	2.971453287
8/44	0.9970385	0.972724663	1.041210795	1.039087948	1.038091068	0.978922717	0.875062972	0.935071323	0.935071323	0.934439608
8/4	1.208133971	1.329148686	1.362768496	1.267759563	1.616223586	1.325581395	1.427280197	1.503955696	1.503955696	1.750764526
8/Total	0.202310209	0.205732329	0.21498494	0.208496732	0.230956556	0.167110874	0.156120798	0.165823447	0.165823447	0.213142219
12/19	0.892655367	0.692402718	0.660246533	0.540263543	0.883165829	1.081881533	0.930501931	0.969924812	0.969924812	0.719800747
12/17	0.584566596	0.56021989	0.538993711	0.495634654	0.556611243	0.915929204	0.665745856	0.823404255	0.823404255	0.630316249
12/51	0.511326861	0.48591244	0.465002713	0.453874539	0.508683068	0.72972973	0.554447853	0.560057887	0.560057887	0.472415202
12/8	0.365016502	0.330873672	0.300175131	0.289184953	0.296499367	0.495215311	0.416234888	0.407154129	0.407154129	0.336535662
12/44	0.363933505	0.321848981	0.312545587	0.300488599	0.307793345	0.484777518	0.364231738	0.380718151	0.380718151	0.314472252
12/4	0.440988836	0.439780306	0.409069212	0.36661699	0.479209271	0.656448203	0.594083813	0.612341772	0.612341772	0.589194699
12/Total	0.073846565	0.068071411	0.064533133	0.060294118	0.068478473	0.082755864	0.064982923	0.067515701	0.067515701	0.071729958

Cuadro 9A (continuación). Razón entre exones a partir del área del pico de señal fluorescente para mujeres a riesgo de ser portadoras de delecciones (siete pares de de imprimadores).

Exón	área del pico de señal fluorescente de cada exón para cada una de las posibles portadoras								
	7a	7b	7c	7d	3a	3b	3c	3d	12a
44/19	2.452784504	2.15132798	2.11248074	1.79795022	2.869346734	2.231707317	2.554697555	2.547619048	2.288916563
44/17	1.606236786	1.740629685	1.724528302	1.649429147	1.808392716	1.889380531	1.827808471	2.162765957	2.00436205
44/51	1.404993065	1.509752926	1.487791644	1.510455105	1.652677279	1.505287897	1.522239264	1.47105644	1.50224765
44/8	1.002970297	1.028040142	0.960420315	0.962382445	0.963306622	1.0215311	1.142774899	1.069437138	1.070160116
44/12	2.747739602	3.107047279	3.199533256	3.327913279	3.248933144	2.062801932	2.745504841	2.626614987	3.179930796
44/4	1.211722488	1.366418203	1.308830549	1.220069548	1.556918882	1.354122622	1.631059984	1.608386076	1.873598369
44/Total	0.20291113	0.211501093	0.206475904	0.200655595	0.222481979	0.170708955	0.178410929	0.177337753	0.228096302
4/19	2.024213075	1.57442866	1.614021572	1.473645681	1.842964824	1.648083624	1.566280566	1.5839599	1.221668742
4/17	1.32581395	1.273863068	1.317610063	1.351914036	1.16152019	1.395280236	1.120626151	1.344680851	1.069792803
4/51	1.159500693	1.104898136	1.136733587	1.23800738	1.061505065	1.111633373	0.933282209	0.914616498	0.80179812
4/8	0.827722772	0.752361275	0.73380035	0.788793103	0.618726276	0.754385965	0.700633276	0.664913204	0.571179039
4/12	2.267631103	2.273862623	2.444574096	2.727642276	2.086770982	1.523349436	1.683264177	1.633074935	1.697231834
4/4	0.825271471	0.731840367	0.764040846	0.819625407	0.642294221	0.738485558	0.613098237	0.621741269	0.533732318
4/Total	0.167456767	0.154785038	0.157756024	0.164460784	0.14289889	0.126066098	0.109383426	0.1102582	0.121742368

**Cuadro 10A . Razón entre exones a partir del área del pico de señal fluorescente para mujeres a riesgo de ser portadoras de delecciones (nueve pares de imprimadores).**

Exón	área del pico de señal fluorescente de cada exón					
	5a	5b	16a	16b	16c	25a
45	1345	1844	357	601	1364	1369
48	1586	2329	832	948	1026	1527
19	1063	1549	469	475	614	836
17	1436	1978	649	703	842	985
51	1715	2364	857	809	976	1053
8	2299	3274	1172	1177	1588	2127
12	1173	1506	442	423	645	740
44	2381	3359	1290	1203	1609	2143
4	1872	2521	912	898	1209	1404
Total	14870	20724	6980	7237	9873	12184
Exones	valor de la razón entre exones para cada posible portadora					
	5a	5b	16a	16b	16c	25a
45/48	0.848045397	0.791756119	0.429086538	0.633966245	1.329434698	0.896529142
45/19	1.265286924	1.190445449	0.76119403	1.265263158	2.221498371	1.637559809
45/17	0.936629526	0.932254803	0.550077042	0.854907539	1.619952494	1.389847716
45/51	0.78425656	0.780033841	0.416569428	0.74289246	1.397540984	1.300094967
45/8	0.585036973	0.563225412	0.304607509	0.510620221	0.858942065	0.643629525
45/12	1.146632566	1.224435591	0.807692308	1.420803783	2.114728682	1.85
45/44	0.564888702	0.548972909	0.276744186	0.499584372	0.84773151	0.638824078
45/4	0.718482906	0.731455772	0.391447368	0.669265033	1.128205128	0.975071225
45/Total	0.090450572	0.088978962	0.051146132	0.083045461	0.138154563	0.112360473
48/45	1.179182156	1.263015184	2.330532213	1.577371048	0.752199413	1.11541271
48/19	1.492003763	1.503550678	1.773987207	1.995789474	1.671009772	1.826555024
48/17	1.104456825	1.177451972	1.281972265	1.348506401	1.218527316	1.550253807
48/51	0.924781341	0.985194585	0.970828471	1.171817058	1.051229508	1.45014245
48/8	0.689865159	0.711362248	0.709897611	0.805437553	0.646095718	0.717912553
48/12	1.352088662	1.546480744	1.882352941	2.241134752	1.590697674	2.063513514
48/44	0.666106678	0.693361119	0.64496124	0.788029925	0.637663145	0.712552497
48/4	0.847222222	0.923839746	0.912280702	1.055679287	0.848635236	1.087606838
48/Total	0.1066577	0.11238178	0.119197708	0.130993506	0.103919781	0.125328299
19/45	0.790334572	0.840021692	1.31372549	0.790349418	0.450146628	0.610664719
19/48	0.670239596	0.665092314	0.563701923	0.501054852	0.598440546	0.547478716
19/17	0.740250696	0.783114257	0.722650231	0.675675676	0.729216152	0.848730964
19/51	0.619825073	0.655245347	0.547257876	0.587144623	0.629098361	0.793922127
19/8	0.462374946	0.473121564	0.400170648	0.403568394	0.386649874	0.393041843
19/12	0.906223359	1.028552457	1.061085973	1.122931442	0.951937984	1.12972973
19/44	0.446451071	0.461149152	0.363565891	0.394846218	0.38160348	0.390107326
19/4	0.56784188	0.614438715	0.514254386	0.528953229	0.507857734	0.595441595
19/Total	0.071486214	0.074744258	0.067191977	0.065634932	0.062189811	0.068614576

**Cuadro 10A (continuación). Razón entre exones a partir del área del pico de señal fluorescente para mujeres a riesgo de ser portadoras de deleciones (nueve pares de imprimadores).**

Exones	valor de la razón entre exones para cada posible portadora					
	5a	5b	16a	16b	16c	25a
17/45	1.067657993	1.072668113	1.817927171	1.169717138	0.617302053	0.719503287
17/48	0.905422446	0.849291541	0.780048077	0.741561181	0.820662768	0.645055665
17/19	1.350893697	1.276952873	1.383795309	1.48	1.371335505	1.178229665
17/51	0.837317784	0.836717428	0.757292882	0.868974042	0.862704918	0.935422602
17/8	0.6246194	0.60415394	0.553754266	0.597281223	0.5302267	0.463093559
17/12	1.224211424	1.313413015	1.468325792	1.661938534	1.305426357	1.331081081
17/44	0.603107938	0.588865734	0.503100775	0.584372402	0.523306401	0.459636024
17/4	0.767094017	0.784609282	0.711622807	0.78285078	0.696443342	0.701566952
17/Total	0.096570276	0.095444895	0.092979943	0.097139699	0.085283095	0.080843729
51/45	1.275092937	1.281995662	2.400560224	1.34608985	0.715542522	0.76917458
51/48	1.081336696	1.015027909	1.030048077	0.853375527	0.951267057	0.689587426
51/19	1.61335842	1.526145901	1.827292111	1.703157895	1.589576547	1.259569378
51/17	1.194289694	1.195146613	1.320493066	1.320493066	1.159144893	1.069035533
51/8	0.745976512	0.722052535	0.731228669	0.731228669	0.614609572	0.49506347
51/12	1.462063086	1.569721116	1.938914027	1.938914027	1.513178295	1.422972973
51/44	0.720285594	0.703780887	0.664341085	0.664341085	0.606587943	0.491367242
51/4	0.916132479	0.937723126	0.939692982	0.939692982	0.807278743	0.75
51/Total	0.115332885	0.114070643	0.12277937	0.12277937	0.098855464	0.086424819
8/45	1.70929368	1.775488069	3.282913165	1.958402662	1.164222874	1.553688824
8/48	1.449558638	1.405753542	3.282913165	1.241561181	1.547758285	1.392927308
8/19	2.162746943	2.113621691	2.498933902	2.477894737	2.586319218	2.544258373
8/17	1.60097493	1.65520728	1.805855162	1.674253201	1.885985748	2.159390863
8/51	1.340524781	1.384940778	1.36756126	1.454882571	1.62704918	2.01994302
8/12	1.959931799	2.173970784	2.65158371	2.78250591	2.462015504	2.874324324
8/44	0.965560689	0.97469485	0.908527132	0.978387365	0.986948415	0.992533831
8/4	1.228098291	1.298690996	1.285087719	1.310690423	1.313482217	1.514957265
8/Total	0.15460659	0.157981085	0.167908309	0.162636452	0.160842702	0.174573211
12/45	0.872118959	0.81670282	1.238095238	0.703826955	0.4728739	0.540540541
12/48	0.739596469	0.646629455	0.53125	0.446202532	0.628654971	0.484610347
12/19	1.103480715	0.972240155	0.942430704	0.890526316	1.050488599	0.885167464
12/17	0.816852368	0.761375126	0.681047766	0.60170697	0.766033254	0.751269036
12/51	0.683965015	0.637055838	0.515752625	0.522867738	0.660860656	0.702754036
12/8	0.510221836	0.459987783	0.377133106	0.359388275	0.406171285	0.347907851
12/44	0.492650147	0.448347723	0.342635659	0.351620948	0.400870106	0.345310313
12/4	0.626602564	0.597381991	0.484649123	0.471046771	0.533498759	0.527065527
12/Total	0.078883658	0.072669369	0.063323782	0.058449634	0.065329687	0.060735391

**Cuadro 10A (continuación). Razón entre exones a partir del área del pico de señal fluorescente para mujeres a riesgo de ser portadoras de deleciones (nueve pares de imprimadores).**

Exones	valor de la razón entre exones para cada posible portadora					
	5a	5b	16a	16b	16c	25a
44/45	1.770260223	1.821583514	3.613445378	2.001663894	1.179618768	1.565376187
44/48	1.501261034	1.442249893	1.550480769	1.268987342	1.568226121	1.40340537
44/19	2.239887112	2.168495804	2.750533049	2.532631579	2.620521173	2.563397129
44/17	1.658077994	1.69817998	1.987673344	1.711237553	1.910926366	2.175634518
44/51	1.388338192	1.420896785	1.505250875	1.487021014	1.648565574	2.035137702
44/8	1.035667682	1.025962126	1.100682594	1.022090059	1.013224181	1.007522332
44/12	2.029838022	2.230411687	2.918552036	2.843971631	2.494573643	2.895945946
44/4	1.271901709	1.332407775	1.414473684	1.339643653	1.330851944	1.526353276
44/Total	0.160121049	0.16208261	0.184813754	0.1662291	0.162969715	0.175886408
4/45	1.391821561	1.367136659	2.554621849	1.494176373	0.886363636	1.025566107
4/48	1.180327869	1.082438815	1.096153846	0.947257384	1.178362573	0.919449902
4/19	1.761053622	1.627501614	1.9445629	1.890526316	1.969055375	1.679425837
4/17	1.30362117	1.274519717	1.405238829	1.277382646	1.435866983	1.425380711
4/51	1.09154519	1.06641286	1.064177363	1.110012361	1.238729508	1.333333333
4/8	0.814267073	0.770006109	0.778156997	0.762956669	0.761335013	0.660084626
4/12	1.595907928	1.673970784	2.063348416	2.122931442	1.874418605	1.897297297
4/44	0.786224276	0.750520988	0.706976744	0.746467165	0.751398384	0.655156323
4/Total	0.125891056	0.1216464	0.130659026	0.124084565	0.122455181	0.115233093

## 6 REFERENCIAS

1. Abbadi N., Philippe C., Chery M., Gilgenkrantz H., Tome F., Collin, H., Theau D., Recan D., Broux O., Fardeau M., Kaplan J.C., Gilgenkrantz S. 1994. Additional case of female monozygotic twins discordant for the clinical manifestations of Duchenne muscular dystrophy due to opposite X-chromosome inactivation. *Am. J. Med. Genet.* 52: 198-206.
2. Adams R., Victor M. 1981. *Principios de Neurología*. Reverté, España. 1141 p.
3. Ahn A.H., Kunkel L.M. 1993. The structural and functional diversity of dystrophin. *Nature Genet.* 3: 283-291.
4. Allamand V., Campbell K. 2000. Animal models for muscular dystrophy: valuable tools for the development of therapies. *Hum. Molec. Genet.* 9 (16): 2459-2467.
5. Amann K.J., Renley B.A., Ervasti J.M. 1998. A cluster of basic repeats in the dystrophin rod domain binds F-actin through an electrostatic interaction. *J. Biol. Chem.* 273: 28419-28423.
6. Azofeifa J., Voit T., Hübner C., Cremer M. 1995. X-chromosome methylation in manifesting and healthy carriers of dystrophinopathies: concordance of activation ratios

- among first degree female relatives and skewed inactivation as cause of the affected phenotypes. *Hum. Genet.* 96: 167-176.
7. Bakker E., Hofker M. H., Goor N., Mandel J. L., Wrogemann K., Davies K. E., Kunkel L.M.; Willard H. F.; Fenton W. A., Sandkuyl L., Majoor-Krakauer D., van Essen A. J., Jahoda M. G. J., Sachs E. S., van Ommen G. J. B., Pearson P. L. 1985. Prenatal diagnosis and carrier detection of Duchenne muscular dystrophy with closely linked RFLP's. *Lancet* I: 655-658.
  8. Bakker, E., Van Broeckhoven, C., Bonten, E. J., van de Vooren, M. J., Veenema, H., Van Hul, W., Van Ommen, G. J. B., Vandenberghe, A., Pearson, P. L. 1987. Germline mosaicism and Duchenne muscular dystrophy mutations. *Nature* 329: 554-556.
  9. Bardoni A., Felisari G., Sironi M., Comi G., Lai M., Robotti M., Bresolin N. 2000. Loss of Dp 140 regulatory sequences is associated with cognitive impairment in dystrophinopathies. *Neuromusc. Disord.* 10 (3): 194-199.
  10. Barton-Davis E. R., Cordier L., Shoturma D. I., Leland S. E., Sweeney H. L. 1999. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx-mice. *J. Clin. Invest.* 104: 375-381.

11. Baumbach L. L., Chamberlain J. S., Ward P. A., Farwell N. J., Caskey C. T. 1989. Molecular and clinical correlation of deletion leading to Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Neurol.* 39: 465-474.
12. Baxter P. S., Maltby E. L., Quarrell O. 1997. Xp21 Muscular dystrophy due to X chromosome inversion. *Neurol.* 49: 260.
13. Becker P. E., Kiener F. 1955. Eine neue X-chromosomale Muskeldystrophie. *Archiv für Psychiatrisch und Nervenkrankheiten.*
14. Beggs A., Koenig M., Boyce F., Kunkel L. 1990. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum. Genet.* 86: 45-48.
15. Bortolini E. R., da Silva D. M., Santos-Chequer R., Vianna-Morgante A. M., Zatz M. 1986. Duchenne muscular dystrophy in a girl with a 45,X/46,XX/47,XXX chromosome constitution. *Am. J. Med. Genet.* 25:239-243.
16. Bresolin N., Castelli E., Comi P., Felisari G., Bardoni A., Perani D., Grassi F., Urconi A., Mazzucchelli F., Gallotti D., Moggio M., Prella A., Ausenda C., Fazio G., Scarlato G. 1994. Cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Neur. Disord.* 4: 359-369.

17. Calvano S., Memeo E., Piemontese M. R., Melchionda S., Bisceglia L., Gasparini P., Zelante L. 1997. Detection of dystrophin deletion carriers using FISH analysis. *Clin. Genet.* 52:17-22.
18. Campbell K., Kahl S. 1989. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature* 338:259-262.
19. Carola R., Harley J. P., Noback C. R. 1990. *Human Anatomy and Fisiology*. McGrawHill, U.S.A. 925p.
20. Caskey C. T., Nussbaum R. L., Cohan L. C., Pollack L. 1980. Sporadic occurrence of Duchenne muscular dystrophy: evidence for new mutation. *Clin. Genet.* 18: 329-341.
21. Chamberlain J. S., Gibbs R. A., Ranier J.E. 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 16: 11141.
22. Chamberlain J. S., Gibss R. A., Ranier J. E., Caskey C. T. 1990. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. In: Innis MA, Gelfand D. H., Sninsky J. J., White TS eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. 272-281 p.

23. Chelly J, Hamard G, Koulakoff A, Kaplan JC, Kahn A, Berwald-Netter Y. 1990. Dystrophin gene transcribed from different promoters in neuronal and glial cells. *Nature* 344:64-65.
24. Chelly J, Marlhens F, Le Marec B, Jeanpierre M, Lambert M, Hamard G, Dutrillaux B, Kaplan J. C. 1986. *De novo* DNA microdeletion in a girl with Turner syndrome and Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Genet.* 74: 193-196.
25. Clemens P. R., Fenwick R. G., Chamberlain J. S., Gibbs R. A., de Andrade M., Chakraborty R., Caskey C. T. 1991. Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy families, using dinucleotide repeat polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 49: 951-960.
26. Cockburn D. J., Munro E. A., Craig I. W., Boyd Y. 1992. Mapping of X chromosome translocation breakpoints in females with Duchenne muscular dystrophy with respect to exons of the dystrophin gene. *Hum. Genet.* 90: 407-412.
27. Cohn R. D., Campbell K. P. 2000. Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle & Nerve* (oct): 1456-1471.

28. Covone, A. E., Lerone, M., Romeo, G. 1991. Genotype-phenotype correlation and germline mosaicism in DMD/BMD patients with deletions of the dystrophin gene. *Hum. Genet.* 87: 353-360.
29. Darras B. T., Francke U. 1987. A partial deletion of the muscular dystrophy gene transmitted twice by an unaffected male. *Nature* 329: 556-558.
30. Darras B., Blattner P., Harper J., Spiro A., Alter S., Francke U. 1988. Intragenic deletions in 21 Duchenne muscular dystrophy (DMD)/Becker muscular dystrophy (BMD) families studied with the dystrophin cDNA: location of breakpoints on HindIII and BglII exon-containing fragments maps, meiotic and mitotic origin of the mutations. *Am. J. Hum. Genet.* 43: 620-629.
31. den Dunnen, J. T., Grootsholten, P. M., Bakker, E., Blonden, L. A. J., Ginjaar, H. B., Wapenaar, M. C., van Paassen, H. M. B., van Broeckhoven, C., Pearson, P. L., van Ommen, G. J. B. 1989. 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.* 45: 835-847.
32. Edwards R. H. T., Young A., Wiles M. 1980. Needle biopsy of skeletal muscle in the diagnosis of myopathy and the clinical study of muscle function and repair. *N. Eng. J. Med.* 302: 261-271.

33. Emery A. E. H. 1977. Muscle histology and creatine kinase levels in the foetus in Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 266: 472-473.
34. Emery A. E. H. 1991. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases - a world survey. *Neuromus. Disord.* 1: 19-29.
35. Emery A. E. H. 1993. *Duchenne Muscular Dystrophy*. Oxford University. Great Britain. 391p.
36. Emery A. E. H., Skinner R., Holloway S. 1979. A study of possible heterogeneity in Duchenne muscular dystrophy. *Clin. Genet.* 15: 444-449.
37. England S. B., Nicholson L. V. B., Johnson M. A., Forrest S. M., Love D. R., Zubrzycka-Gaarn E. E., Bulman D. E., Harris J. B., Davies K. E. 1990. Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin. *Nature* 343:180-182.
38. Ervasti J. M., Campbell K.P. 1991. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 66: 1121.

39. Fenichel G., Pestronk A., Florence J., Robinson V., Hemelt V. 1997. A beneficial effect of oxandrolone in the treatment of Duchenne muscular dystrophy: a pilot study. *Neurology* 48: 1225-1226.
40. Florentin L., Mavrou A., Kekou K., Metaxotou C. 1995. Deletion patterns of Duchenne and Becker muscular dystrophies in Greece. *J. Med. Genet.* 32: 48-51.
41. Fortina P., Cheng J., Shoffner M. A., Surrey S., Hitchcock W. M., Kricka L. J., Wilding P. 1997. Diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy and quantitative identification of carrier status by use of entangled solution capillary electrophoresis. *Clin. Chem.* 43:745-751.
42. Gillard E.F., Chamberlain J. S., Murphy E. G., Duff C. L., Smith B., Burghes A. H. M., Thompson M. W., Sutherland J., Oss I., Bodrug S. E., Klamur H. J., Ray P. N., Worton R. G. 1989. Molecular and phenotypic analysis of patients with deletions within the deletion-rich region of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene. *Am. J. Hum. Genet.* 45: 507-520.
43. Gomez X., Sáenz R. 1998. Análisis de la situación de salud con base en las condiciones de vida. Costa Rica 1970-1996. Instituto Costarricense de Investigación en Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA). Cartago, Ministerio de Salud, Costa Rica. 91 p.

44. Gussoni E., Pavlath G. K., Lanctot A. M., Sharma K. R., Miller R. G., Steinman L., Blau H. M. 1992. Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. *Nature* 356: 435-438.
45. Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C. D., Buzney, E. A., Khan, M. K., Flint, A. F., Kunkel, L. M., Mulligan, R. C. 1999. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401: 390-394.
46. Haldane J.B.S. 1932. *The Causes of Evolution*. Longmans, Green. Londres.
47. Haldane J.B.S. 1935. The rate of spontaneous mutation of a human gene. *J Genet* 31: 317-326
48. Haldane, J. B. S. 1956. Mutation in the X-linked recessive type of muscular dystrophy: a possible sex difference. *Ann. Hum. Genet.* 20: 344-347.
49. Hammonds, R. G., Jr. 1987. Protein sequence of DMD gene is related to actin-binding domain of alpha-actinin. (Letter) *Cell* 51: 1.
50. Hiraishi Y., Kato S., Ishihara T., Takano T. 1992. Quantitative Southern blot analysis of the dystrophin gene of Japanese patients with Duchenne or Becker muscular dystrophy: a high frequency of duplications. *J. Med. Genet.* 29: 897-901.

51. Hoffman E. P., Brown R. H., Kunkel L. M. 1987. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51: 919-928.
52. Hoffman, E. P., Fischbeck, K. H., Brown, R. H., Johnson, M., Medori, R., Loike, J. D., Harris, J. B., Waterston, R., Brooke, M., Specht, L., Kupsky, W., Chamberlain, J., Caskey, C. T., Shapiro, F., Kunkel, L. M. 1988. Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *New Eng. J. Med.* 318: 1363-1368.
53. Hu X., Ray P., Murphy G., Thompson M., Worton R. 1990. Duplicational mutation at the Duchenne muscular dystrophy locus: its frequency, distribution, origin, and phenotype-genotype correlation. *Am. J. Hum. Gent.* 46: 682-695.
54. Imamura M., Araishi K., Noguchi S., Ozawa E. 2000. A sarcoglycan-dystroglycan complex anchors Dp 116 and utrophin in the peripheral nervous system. *Hum. Molec. Genet.* 9: 3091-3100.
55. Innis M. A., Gelfand D. H. 1990. Optimization of PCR's. In: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. S. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications.* Academic Press. pp 273-281.

56. Ioannou P., Christopoulos G., Panayides K., Kleanthous M., Middleton L. 1992. Detection of Duchenne and Becker Muscular Dystrophy carriers by quantitative multiplex polymerase chain reaction analysis. *Neurology* 42: 1783-1790.
57. Ishii K., Sakuraba H., Minamikawa-Tachino R., Shimmoto M., Suzuki Y. 1992. Carrier detection of Duchenne/Becker muscular dystrophy: computer-assisted direct quantitation of gene amplification products. *Brain Dev.* 14: 80-83.
58. Karpati G., Pardi G., Molnar M. J. 1999. Molecular therapy for genetic muscle disease—status 1999. *Clin. Genet.* 55: 1-8.
59. Kaufman R. J. 1999. Correction of genetic disease by making sense from nonsense. *J. Clin. Invest.* 104: 367-368.
60. Koenig M., Hoffman E. P., Bertelson C. J., Monaco A. P., Feen C., Kunkel L. M. 1987. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50: 509-517.
61. Koenig, M., Beggs, A. H., Moyer, M., Scherpf, S., Heindrich, K., Bettecken, T., Meng, G., Muller, C. R., Lindlof, M., Kaariainen, H., *et al.* 1989. The molecular basis for

- Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am. J. Hum. Genet.* 45: 498-506.
62. Koenig M., Kunkel L. M. 1990. Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J. Biol. Chem.* 265: 4560-4566.
63. Lindenbaum R. H., Clarke G., Patel C., Moncrieff M., Hughes J. T. 1979. Muscular dystrophy in an X;1 translocation female suggests that Duchenne locus is on X chromosome short arm. *J. Med. Genet.* 16: 389-392.
64. Malhotra S. B., Hart K. A., Thomas N. S. T., Bodrug S. E., Burghes A. H. M., Bobrow M., Harper P. S., Thompsom M. W., Ray P. N., Worton R. G. 1988. Frame-shift deletions in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Science* 242: 755-759.
65. Mansfield E. S., Robertson J. M., Lebo R. V., Lucero M. Y., Mayrand P. E., Rappaport E., Parella T., Sartore M., Surrey S., Fortina P. 1993. Duchenne/Becker muscular dystrophy carrier detection using quantitative PCR and fluorescence-based strategies. *Am. J. Med. Genet. (Neuropsychiat. Genet.)* 48: 200-208.

66. Miller S. A., Dykes D. D., Polesky H. F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16:1215
67. Mohs E. 1982. Infectious diseases and health in Costa Rica: the development of a new paradigm. *Pediat. Infect. Dis.* 1:212-216.
68. Moizard M. P., Billard C., Toutain A., Berret F., Marmin N., Moraine C. 1998. Are Dp71 and Dp140 brain dystrophin isoforms related to cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy?. *Am. J. Med. Genet.* 80: 32-41.
69. Moser H. 1984. Duchenne muscular dystrophy: pathogenic aspects and genetic prevention. *Hum. Genet.* 66: 17-40.
70. Moser H., Emery A. E. H. 1974. The manifesting carrier in Duchenne muscular Dystrophy. *Clin. Genet.* 5: 271-284.
71. Muntoni F., Wilson L., Marrosu G. et al. 1995. A mutation in the dystrophin gene selectively affecting dystrophin expression in the hearth. *J. Clin. Invest.* 96: 693-699.
72. Murray J. M., Davies K. E., Harper P. S., Meredith L., Mueller C. R., Williamson R. 1982. Linkage relationship of a cloned DNA sequence on the short arm of the X chromosome to Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 300: 69-71.

- prednisone treatment of Duchenne dystrophy: side effects and effectiveness. *Neurology* 46: A308.
79. Pastore L., Caporaso M. G., Frisso G., Orsini A., Santoro L., Sacchetti L., Salvatore F. 1996. A quantitative polymerase chain reaction (PCR) assay completely discriminates between Duchenne and Becker muscular dystrophy deletion carriers and normal females. *Mol Cell Probes* 10: 129- 137.
80. Peterlin B., Zidar J., Meznaric-Petrusa M., Zupancic N. 1997. Genetic epidemiology of Duchenne and Becker muscular dystrophy in Slovenia. *Clin. Genet.* 51: 94-97.
81. Phelps S. F, Hauser M. A., Cole N. M., Rafael J. A., Hinkle R. T., Faulkner J. A., Chamberlain J. S. 1995. Expression of full-length and truncated dystrophin mini-genes in transgenic mdx mice. *Hum. Mol. Genet.* 4:1251-1258.
82. Prior T. W. Papp A. C., Snyder P. J., Highsmith W. E., Friedman K. J., Perry T. R., Silverman L. M., Mendell J. R. 1990. Determination of carrier status in Duchenne and Becker muscular dystrophies by quantitative polymerase chain reaction and allele-specific oligonucleotides. *Clin. Chem.* 36(12): 2113-2117.
83. Prior, TW. 1995. Perspectives and molecular diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Clinics in Laboratory Medicine* 15: 927-941.

84. Quan F, Janas J, Toth-Fejel S, Johnson D, Wolford JK. 1997. Uniparental disomy of the entire chromosome in a female with Duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 60: 160-165.
85. Richards C. S., Watkins S. C., Hoffman E. P., Schneider N. R., Milsark I. W., Katz K. S., Cook J. D., Kunkel L. M., Cortada J. M. 1990. Skewed X inactivation in a female MZ twin results in Duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 46:672-681.
86. Ried T., Mahler V., Vogt P., Blonden L., van Ommen G. J. B., Cremer T. 1990. Direct carrier detect by *in situ* suppression hybridization with cosmid clones of the Duchenne/Becker muscular dystrophy locus. *Hum. Genet.* 85: 581-586.
87. Roberts R., Barby T., Manners E., Bobrow M., Bentley D. 1991. Direct detection of dystrophin gene rearrangements by analysis of dystrophin mRNA peripheral blood lymphocytes. *Am. J. Hum. Genet.* 49: 298-310.
88. Roberts R. G., Gardner R. J., Bobrow M. 1994. Searching for the 1 in 2,400,000: a review of dystrophin gene point mutations. *Hum. Mutat.* 4(1): 1-11.
89. Roest P. A. M., Bout M., van der Tuijn A. C., Ginjaar I. B., Bakker E., Hogervorst F. B. L., van Ommen G. J., den Dunnen J. T. 1996. Splicing mutation in DMD/BMD detected

- by RT-PCR/PTT: detection of a 19 AA insertion in the cysteine rich domain of dystrophin compatible with BMD. *J. Med. Genet.* 33: 935-939.
90. Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
91. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning. A Laboratory Manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
92. Schwartz L. S., Tarleton J., Popovich B., Seltzer W. K., Hoffman E. P. 1992. Fluorescent multiplex linkage analysis and carrier detection for Duchenne/Becker Muscular Dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 51: 721-729.
93. Shiga N., Takeshima Y., Sakamoto H., Inoue K., Yokota Y., Yokoyama M., Matsuo M. 1997. Disruption of the splicing enhancer sequence within exon 27 of the dystrophin gene by a nonsense mutation induces partial skipping of the exon and is responsible for Becker muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.* 100: 2204-2210.
94. Sinha S., Mishra S., Singh V., Mittal R. D., Mittal B. 1996. High frequency of new mutations in North Indian Duchenne/Becker muscular dystrophy patients. *Clin. Genet.* 50: 327-331.

95. Strachan T., Read A. 1999. Human Molecular Genetics 2. Wiley-Liss, New York. 576p.
96. Suthers G. K., Manson J. L., Stern L. M. et al. 1989. Becker muscular dystrophy (BMD) and Klinefelter's syndrome : a possible cause of variable expression of BMD within a pedigree. *J. Med. Genet.* 26: 251-254.
97. Tinsley J. M., Blake D. J., Pearce M., Knight A. E., Kendrick-Jones J., Davies K. E. 1993. Dystrophin and related proteins. *Curr. Opin. Genet.Dev.* 3: 484-90.
98. Tocharoentanaphol C. H., Cremer M., Schröck E., Blonden L., Kilian K., Cremer T., Ried T. 1994. Multicolor fluorescence in situ hybridization on metaphase chromosomes and interphase halo-preparations using cosmid and YAC clones for the simultaneous high resolution mapping of deletions in the dystrophin gene. *Hum. Genet.* 93: 229-35.
99. Towbin J. A., Hejtmancik J. F., Brink P., Gelb B., Zhu X. M., Chamberlain J. S., McCabe E. R. B., Swift M. 1993. X-linked dilated cardiomyopathy: molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus. *Circulation* 87: 1854-1865.
100. Tuffery S., Bareil C., Demaille J., Claustres M. 1996. Four novel dystrophin point mutations: detection by protein truncation test and transcript analysis in lymphocytes

106. Yau S. C., Bobrow M., Mathew C. G., Abbs S. J. 1996. Accurate diagnosis of carriers of deletions and duplications in Duchenne/Becker muscular dystrophy by fluorescent dosage analysis. *J. Med. Genet.* 33: 550-558.
107. Yoshioka M., Yorifuji T., Mituyoshi I. 1998. Skewed X inactivation in manifesting carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Clin. Genet.* 52: 102-107.
108. Zatz M., Vallada H., Melo M. S., Passos-Bueno M. R., Vieira A. H. G., Vainzof M., Gill M., Gentil V. 1993. Cosegregation of schizophrenia with Becker muscular dystrophy: susceptibility locus for schizophrenia at Xp21 or an effect of the dystrophin gene in the brain?. *J. Med. Genet.* 30: 131-134.
109. Zellweger H., Niedermeyer E. 1965. Central nervous system manifestations in childhood muscular dystrophy (CMD) I. *Ann. Paediat.* 205: 25-42.
110. Zubrzycka-Gaarn E. E., Bulman D. E., Karpati G., Burghes A. H. M., Belfall B., Klamut H. J., Talbot J., Hodges R. S., Ray P. N., Worton R. G. 1988. The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. *Nature* 333: 466-469.

