

# Identificación de deleciones en el gen de la distrofina y detección de portadoras en familias con distrofia muscular de Duchenne/Becker

L. González-Herrera, P.A. Gamas-Trujillo, M.G. García-Escalante,  
I. Castillo-Zapata, D. Pinto-Escalante

IDENTIFICACIÓN DE DELECIONES EN EL GEN DE LA DISTROFINA Y DETECCIÓN DE PORTADORAS EN FAMILIAS CON DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE/BECKER

**Resumen.** Introducción. Del 60 al 65% de las mutaciones que causan distrofia muscular de Duchenne/Becker (DMD/DMB) corresponden a deleciones en el gen de la distrofina. La identificación de deleciones confirma el diagnóstico y permite la detección precisa de portadoras, que es el recurso principal de prevención. En el sudeste de México se desconoce la frecuencia y distribución de las deleciones del gen DMD. Objetivos. Identificar deleciones del gen DMD y detectar portadoras en familias con DMD/DMB del sudeste de México. Pacientes y métodos. Se incluyeron 26 familias cuyo propósito mostró signos clínicos de DMD/DMB. Las deleciones se determinaron en el ADN de 40 varones mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple de 22 segmentos del gen. La detección de portadoras se aplicó a 33 familiares femeninos con PCR mediante polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de los marcadores *Pert 87.8/Taq 1*, *pERT 87.15/Bam HI*, y PCR simple para el VNTR MPIP mediante análisis de ligamiento. Resultados. Las deleciones se identificaron en el 67,5% de pacientes con DMD y se localizaron en el extremo 5' y en la región central, exones 44 al 52, del gen. En la detección de portadoras, el 73,33% de las familias resultó informativo. Los marcadores *87.8/Taq I* y MPIP arrojaron el mayor poder de información, con el 26,67 y el 33,33%, respectivamente. De 33 mujeres, 21 (63,64%) resultaron portadoras, una (3,03%) no portadora y 11 (33,33%) no fueron informativas. Conclusión. La frecuencia de deleciones fue del 67,5%. Se determinó el estado de portador en el 66,67% de las mujeres analizadas. Los marcadores *pERT 87.8/Taq 1* y MPIP arrojaron el mayor poder de información. [REV NEUROL 2009; 48: 66-70]

**Palabras clave.** Deleciones. Distrofia muscular. Distrofina. DMD. México. Portadoras.

## INTRODUCCIÓN

Las distrofias musculares tipo Duchenne (DMD) y Becker (DMB) son enfermedades neuromusculares que se heredan en forma recesiva ligada al cromosoma X. Se caracterizan por debilidad muscular progresiva y por degeneración lenta de las fibras musculares esqueléticas [1]. La incidencia de la DMD es de 1 de cada 3.500 varones nacidos vivos, mientras que la DMB afecta a 1 de cada 30.000 [2]. Ambas enfermedades son clínicamente parecidas; sin embargo, pueden distinguirse porque, en la DMB, la edad de aparición es tardía, el curso de la enfermedad es benigno y tiene mayor sobrevida. De acuerdo con criterios tradicionales, aquellos sujetos confinados a silla de ruedas antes de los 12 o 13 años se clasifican como DMD, y aquéllos que todavía deambulan por los 16 se consideran DMB. El término 'fenotipo intermedio' se aplica a aquéllos que dejan de deambular en-

tre los 12 y 16 años [3]. No existe tratamiento curativo, por lo que el abordaje clínico está dirigido a retrasar la progresión de la enfermedad y mejorar la calidad de vida. Al respecto, se ha demostrado que los niños con DMD tienen una buena percepción de la calidad de vida a pesar de las limitaciones impuestas por la enfermedad, en concordancia con sus cuidadores [4].

En ambos padecimientos hay deficiencia de la proteína distrofina, debido a mutaciones en el gen que la produce, denominado *DMD* [1-3]. El gen defectuoso en los varones afectados puede ser el resultado de una mutación nueva en la línea germinal de la madre o puede ser heredada de una mujer portadora [5]. El gen *DMD* se localiza en la banda Xp21, consta de 2.400 kb y 79 exones [6]. Su producto primario, la distrofina, es una proteína del citoesqueleto de alto peso molecular (427 kDa) y 3.685 aminoácidos, que pertenece a la familia de las espectrinas [7]. Los aminoácidos se encuentran organizados en cuatro dominios: uno aminoterminal, que se asocia con la actina; un dominio en varilla, que consiste en hileras largas flexibles de 24 repetidos  $\alpha$ -hélice; una región rica en cisteína, y un dominio carboxiloterminal único [1,6]. La función biológica de la distrofina no se ha determinado completamente, pero se sugiere que debe ser puramente mecánica, para mantener la integridad estructural de la membrana muscular durante la contracción y relajación, o bien puede tener otras funciones, como proporcionar soporte a la unión de las proteínas del complejo transmembranal [8].

Aproximadamente, del 60 al 65% de las mutaciones que causan DMD y DMB son grandes deleciones, las cuales se distribuyen principalmente en la región central del gen denominada 'punto caliente mayor' (exones 44 al 52) y en el extremo 5'

Aceptado tras revisión externa: 01.12.08.

Departamento de Salud Reproductiva y Genética. Centro de Investigaciones Regionales Doctor Hideyo Noguchi. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.

Correspondencia: Dra. Lizbeth González Herrera. Departamento de Salud Reproductiva y Genética. Laboratorio de Genética. Centro de Investigaciones Regionales Doctor Hideyo Noguchi. Universidad Autónoma de Yucatán. Avda. Itzáes, 490 x 59. Centro. CP 97000. Mérida, Yucatán, México. Fax: (52) (999) 9 23 61 20. E-mail: lizbeth@uady.mx

Agradecimientos. Los autores agradecen a las familias que aceptaron participar en el estudio, a las autoridades medicoadministrativas del Centro de Rehabilitación y Educación Especial del Estado (CREE) de Campeche, México, por el financiamiento y las facilidades prestadas para la realización del estudio, y al Dr. José Miguel Ceballos Quintal, por acercarnos al CREE.

© 2009, REVISTA DE NEUROLOGÍA

del gen o 'punto caliente menor'. Se observa un efecto de la delección sobre el marco de lectura traduccional del ARN mensajero (ARNm). Si la delección altera el marco de lectura traduccional del ARNm de la distrofina, entonces se sintetiza una proteína no funcional truncada en el extremo C-terminal, lo que resulta en un fenotipo DMD grave. En el DMB menos grave, las delecciones mantienen el marco de lectura traduccional y se produce una proteína semifuncional.

Del 5 al 10% de los casos presenta duplicaciones de uno o más exones del gen, que ocurren en el extremo 5' y en la región central. Para el restante 30% aproximadamente de los pacientes, se han descrito mutaciones puntuales y pequeñas delecciones y duplicaciones, las cuales se distribuyen al azar a lo largo de la secuencia del gen. Un tercio de todos los casos se origina como mutaciones *de novo* [1,9,10]. Asimismo, se ha descrito deficiencia de distrofina con fenotipo DMD en el síndrome de delección de genes contiguos en Xp21 [11].

A pesar de los esfuerzos invertidos en la investigación de esta enfermedad y de los avances científicos logrados hasta el momento, todavía no existe tratamiento curativo o terapia definitiva, por lo que las estrategias de prevención de nuevos casos deben encaminarse a la detección de portadoras y al diagnóstico adecuado. Así, el objetivo del presente trabajo fue detectar grandes delecciones en el gen de la distrofina, así como determinar el estado de portadora mediante análisis de ligamiento en familias con DMD del sudeste de México, donde es escasa la información al respecto y la DMD/DMB es un motivo de consulta frecuente. El diagnóstico de portadora en las mujeres con riesgo de transmitir la enfermedad permite un asesoramiento genético de certeza, lo que contribuye a la prevención de nuevos casos.

## PACIENTES Y MÉTODOS

Se seleccionaron para el estudio 26 familias referidas a la interconsulta del Laboratorio de Genética de la Universidad Autónoma de Yucatán, procedentes del Servicio de Terapia Física del Centro de Rehabilitación y Educación Especial del Desarrollo Integral de la Familia de Campeche, México. Se entrevistó a cada familia para obtener datos sobre la historia clínica y la genealogía, y se realizó un examen clínico al propósito para clasificar el tipo de distrofia muscular de acuerdo con criterios clínicos tradicionales sobre edad de aparición de síntomas de debilidad muscular o problemas para deambulación antes de los 12 años (DMD), y considerando la elevación de los niveles de creatinfosfocinasa (referencia: 40-90 U/L), electromiografía, signo de Gowers positivo y pseudohipertrofia de músculos gemelos, entre otros. En todas las familias, el cuadro clínico del propósito fue compatible con DMD, excepto uno con DMB. Se determinó si se trataba de un caso familiar o esporádico, y se consideraron como casos familiares aquellas familias en las que había más de dos varones de primer o segundo grado afectados (hermanos y/o tíos). Las familias manifestaron su participación voluntaria al estudio mediante consentimiento informado según la Declaración de Helsinki.

Para el análisis molecular se obtuvo una muestra de 3 mL de sangre periférica en tubos *vacutainer* con EDTA a los miembros de la familia, incluyendo a los varones enfermos, a las mujeres de la familia con riesgo de ser portadoras, así como a la madre del propósito. A partir de la sangre periférica, se aisló el ADN siguiendo los protocolos convencionales con el método de fenolcloroformo y precipitación con etanol [12].

El diagnóstico molecular de DMD/DMB para la identificación de grandes delecciones en el gen de la distrofina se realizó en muestras de ADN de 40 varones de las familias seleccionadas. Cuatro de ellos aún no presentaban síntomas debido a su corta edad, ya que se trataba de hermanos menores del propósito. Las delecciones se determinaron mediante amplificación simultánea de 22 exones del gen ordenados en cuatro series, usando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple de acuerdo con Chamberlain et al [9]. La PCR múltiple se llevó a cabo amplificando los

exones de cada serie en un volumen total de 25  $\mu$ L, que contenía 125 ng de ADN genómico, 0,2 pM de cada oligonucleótido, 2,5 mM de desoxirribonucleósido trifosfatos, 10X de  $MgCl_2$ , 50 mM/L de KCl, 10 M/L de Tris HCl, 1 mM/L de DTE, 0,001% de gelatina, 2 U de Taq polimerasa con un programa de 26 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 50 s, alineación a 55 °C por 1 min, extensión a 68 °C por 4 min, y un ciclo de extensión final a 72 °C por 5 min. El resultado de la PCR múltiple se observó en un gel de poliacrilamida al 6% teñido con nitrato de plata.

El estado de portadora o no portadora en las mujeres con riesgo se determinó a través de análisis de ligamiento, identificando el alelo mutado por segregación de marcadores polimórficos ligados al gen *DMD*. El diagnóstico de portadoras se practicó en 33 familiares femeninos de los propósitos, sin contar a las portadoras obligadas. Para el estudio molecular de detección de portadoras se utilizaron tres marcadores polimórficos: pERT 87.8/Taq 1, localizado en el intrón 13, pERT 87.15/Bam HI, en el intrón 15 [13], y MPIP, en la región 3' no traducida del gen de la distrofina [14]. Estos marcadores se amplificaron por PCR bajo condiciones similares a las descritas para las delecciones, excepto que se siguió un programa de 30 ciclos de desnaturalización a 96 °C por 60 s, alineación a 55 °C por 60 s, extensión a 72 °C por 90 s, y un ciclo de extensión final a 72 °C por 7 min. El MPIP se amplificó por PCR simple y generó fragmentos de 98 pb (alelo M1) o 94 pb (alelo M2), según el número de repeticiones; en tanto que los marcadores pERT87, después de amplificación por PCR, se sometieron a digestión con enzimas de restricción, donde pERT87-15 produce fragmentos de 216 y 10 pb (alelo B1) y de 166, 50 y 10 pb (alelo B2) cuando se corta con Bam HI. pERT 87.8 produce un fragmento de 145 pb (alelo T1) y dos de 71 y 74 pb (alelo T2), que se cortan con Taq I. El resultado de la genotipificación se resolvió analizando alícuotas de los productos de amplificación y restricción mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% a 85 V por 1 h y tinción con nitrato de plata.

## RESULTADOS

De las 26 familias seleccionadas, en 14 (53,85%) se trataba de casos esporádicos, en 10 (38,46%) de casos familiares en los que había más de un varón afectado, y en dos (7,69%) de familias con hijos adoptivos de quienes no se conocían antecedentes hereditarios. Se incluyeron en el estudio un total de 40 varones: 36 con características clínicas sugestivas de DMD/DMB y cuatro hermanos menores que aún no presentaban síntomas. La edad de inicio de los síntomas en los propósitos varió en un rango de 18 meses a 19 años de edad, con un promedio de edad de aparición de síntomas de 4,5 años. De acuerdo con la edad de aparición de los síntomas, que es un signo clave para clasificar la enfermedad, se determinó que 35 de los 36 varones que ya habían desarrollado síntomas (97,29%) correspondían a DMD, y sólo uno de ellos, con edad de aparición de 19 años, se clasificó con DMB.

El análisis molecular reveló que 27 (67,5%) de los 40 varones analizados presentaron delección, al menos, en un exón del gen de la distrofina, confirmando el diagnóstico de DMD/DMB en 18 (69,23%) familias. Los familiares varones de primer y segundo grado analizados mostraron las mismas delecciones que el propósito. Las delecciones encontradas se localizaron en el extremo 5' y la región central del gen. El 61,11% de las delecciones se localizó en la región central conocida como 'punto caliente mayor', comprendiendo los exones del 43 al 55; el 11,11% en el extremo 5' del gen o 'punto caliente menor', extendiéndose hasta el exón 19; y el 27,78% eran delecciones que comprendían ambas regiones del gen de la distrofina (Tabla I). En suma, en el 88,88% (16 de 18) de las familias que tuvieron delecciones, estuvo involucrado el punto caliente mayor. Los exones más frecuentemente deleccionados fueron el 45 y el 49, con un 33,33% cada uno. En seis familias se encontró delección de un exón individual, mientras que las restantes presentaron múltiples delecciones. Se observó alta frecuencia (81,81%) de delecciones múltiples en casos aislados, mientras que en casos familiares se distribuyeron en igual proporción (50%) en pérdida de un exón individual y delecciones múltiples. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) en la frecuencia de delecciones en general entre casos familiares y casos aislados, un 80% frente a un 78,57%, respectivamente.

En 35 (87,5%) varones en los que se identificaron delecciones en el punto caliente mayor, éstas corresponden a mutaciones que afectan el marco de lectura y, por tanto, se encontraron en pacientes con DMD, lo cual se corroboró con la edad temprana de inicio de síntomas (media: 4,5 años). En tres varones familiares de primer grado que aún no presentaban síntomas por su

corta edad, se descartó la presencia de las deleciones que afectaban a su pariente propósito, con lo que se determinó que estos varones heredaron el cromosoma X normal, y por lo tanto, no desarrollarían la enfermedad, en tanto que en un varón se determinó el diagnóstico molecular positivo de DMD antes de iniciar los síntomas (diagnóstico presintomático), confirmando deleciones de los exones 49 y 50 del gen de la distrofina.

Con respecto a la detección de portadoras, en 15 de las 26 familias se encontró al menos una hermana u otro familiar femenino que requirieron la determinación de estado de portador a través de análisis de ligamiento. 11 familias (73,33%) resultaron informativas para al menos uno de los marcadores analizados (Tabla II). Los marcadores 87.8/Taq I y MPIP arrojaron el mayor poder de información con el 26,67 y el 33,33%, respectivamente. De las 33 mujeres a quienes se aplicó el análisis molecular para diagnóstico de portadoras, 21 (63,64%) resultaron portadoras y en una (3,03%) se confirmó estado de no portador, mientras que en 11 mujeres (33,33%) no se determinó el estado de portador por falta de información de los marcadores utilizados. A todas las familias analizadas se les ofreció asesoramiento genético basado en la información del diagnóstico molecular de identificación de deleciones y detección de portadoras.

## DISCUSIÓN

La DMD es el motivo de consulta más frecuente en lo que respecta a los trastornos del músculo, por lo que resulta primordial ofrecer información de certeza a las familias afectadas, principalmente cuando se trata de casos familiares en los que hay más de dos varones afectados, y que para nuestro estudio correspondió al 38,46% de las familias incluidas. Cuando existe sólo un varón afectado en la familia, puede resultar un caso esporádico, donde las mujeres tienen menor riesgo de ser portadoras. De esta manera, es de utilidad conocer si la DMD/DMB se presenta en su mayoría como casos familiares o esporádicos en la población del sudeste de México, pues es escasa la información que existe al respecto en este grupo poblacional, y son datos epidemiológicos relevantes desde el punto de vista preventivo.

La identificación de deleciones en un paciente con DMD no sólo confirma el diagnóstico, sino que también permite aplicar una adecuada detección de portadoras en la familia afectada.

La frecuencia obtenida de que el 67,5% de los casos índice presentó deleción al menos en un exón del gen de la distrofina y que estas deleciones grandes se localizaron en los puntos calientes mayor y menor del gen resultó similar a lo esperado, ya que otros estudios describen que aproximadamente del 50 al 70% de los individuos afectados tienen una deleción en uno o más exones localizados en estas dos regiones del gen: el 20% en la región proximal y casi el 80% en la región central [15-20], con excepción de la población china, que describe una frecuencia de deleciones de 41,8% en pacientes con DMD [21]. Los resultados también concuerdan con otros estudios en que al parecer no hay diferencias étnicas en la distribución y frecuencia de las deleciones del gen de la distrofina. Las diferencias entre poblaciones observadas sobre la frecuencia de deleciones se explican por un tamaño de muestra pequeño o por un análisis restringido a un pequeño número de exones [18,19]. Asimismo, los resultados confirman que los exones frecuentemente delecionados son los exones 45 y 49 [17,18,20,22], excepto en pacientes del sur de la India, que destacan la deleción del exón 50 como más frecuente [15].

Resulta notable la alta frecuencia de deleciones múltiples en los casos esporádicos (81,81%), así como la mayor frecuencia de éstos en comparación con los casos familiares en la población estudiada, lo que apoya hallazgos previos en mexicanos sobre una alta frecuencia de deleciones *de novo*. Ello sugiere

**Tabla I.** Distribución de deleciones del gen de la distrofina en las familias analizadas.

Propósito	Deleción de exones en extremo 5': punto caliente menor	Deleción de exones en la región central (44-52): punto caliente mayor
F1		Exón 52
F2		Exones 45 y 47 a 52
F3		Exón 45
F5	Exones 8 al 17	Exón 55
F7	Promotor 1 y exones 6, 8, 12, 13, 16, 17 y 19	Exones 43 y 44
F10		Exones 47 a 50
F12		Exón 55
F13	Exón 17	Exones 52 y 53
F15	Promotor 1 y exones 12 y 17	Exones 45, 48 y 50
F16		Exones 45, 47 y 49
F17		Exones 49 y 50
F18		Exón 52
F20		Exón 51
F21	Exones 8, 13 y 16	
F22	Exones 3 y 19	Exones 45 y 49
F23	Exones 6 y 8	
F25		Exones 49 y 50
F26		Exón 45

**Tabla II.** Frecuencia de información de cada marcador en las familias estudiadas.

	N.º de familias	Frecuencia
MPIP	5	33,33%
87.8/Taq I	4	26,67%
87.15/BamH I	2	13,33%
Ninguno	4	26,67%

predisposición étnica en la población mexicana para mutaciones nuevas [19].

Dado que la DMD y DMB son entidades con un patrón de herencia ligado al X –las mujeres son portadoras del gen mutado en uno de sus cromosomas X y sólo los hombres la padecen–, una de las estrategias hacia la prevención de la enfermedad es la detección de portadoras en las familias afectadas para apoyar el asesoramiento genético. La frecuencia de portadoras de DMD se estima en alrededor de  $7 \times 10^{-5}$  [6]. Las mujeres portadoras de DMD/DMB pueden mostrar debilidad muscular o cardiomiopatía dilatada. La debilidad muscular varía de media a moderadamente grave, y la cardiomiopatía se observa en el 8% de los casos; sin embargo, en algunas mujeres se aprecia una dilatación del ventrículo izquierdo, por lo que la frecuencia de una

alteración cardíaca se eleva al 40%. Aproximadamente el 70% de las portadoras obligadas del gen anormal tienen cifras elevadas de creatinfosfocinasa, ya que un pequeño porcentaje de las fibras musculares son distróficas y se necrosan; en general, estas alteraciones no son suficientes para producir manifestaciones clínicas [6]. Debido a que la mayor parte de las portadoras es asintomática, el dilema principal en el asesoramiento genético es la identificación del estado de portador en estos casos, y aún más en los casos esporádicos.

El reto más importante de la detección de portadoras reside en la habilidad de identificar la presencia de un gen mutante sobre el fondo genético de un alelo normal. El poder de información obtenido en este estudio con los tres marcadores utilizados resultó con una eficiencia del 73,33%, lo que es comparable a la información arrojada en otros estudios del país en los que se describe un rango de eficiencia del 50 al 81% para al menos uno de los polimorfismos [23,24].

El impacto del poder de información de los marcadores utilizados se refleja principalmente en el diagnóstico de no portadoras para casos esporádicos, que corresponden a la mayor parte de las familias estudiadas, en tanto que para casos familiares apoya la detección del estado de portador o no portador con certeza. A pesar de la utilidad y alta eficiencia de estos polimorfismos, se tuvieron limitaciones, como la posible delección de los marcadores analizados en dos familias en las que se demostró delección de la región 5' hasta el exón 17. En el caso índice, no se obtuvo la amplificación por PCR de los marcadores estudiados, debido a que probablemente estas regiones también estén delecionadas, pues la localización de los polimorfismos son las regiones intrónicas de los exones en 5'. Al respecto, se ha des-

critado el caso de una familia mexicana con estas características, en el que las regiones que amplifican para los polimorfismos analizados se encuentran delecionadas [25]. Se ha descrito que, a pesar de que el análisis de ligamiento es la estrategia más común para la detección de portadoras, existe una alta tasa de recombinación (12%) a través del gen *DMD* [26]. Se ha propuesto como alternativa para superar estas limitaciones en la identificación de portadoras el uso de la determinación de dosis génica mediante PCR múltiple cuantitativa, la cual también permite la identificación de mutaciones nuevas y duplicaciones en el gen, así como la amplificación múltiple de sondas de ligación [27] o el uso combinado de protocolos de detección de mutaciones involucrando PCR cuantitativa y secuenciación [28].

Por otro lado, el poder de información de los marcadores utilizados es variable de acuerdo con el grupo étnico. Para nuestro estudio, los polimorfismos con mayor contenido de información fueron los marcadores pERT87.8/Taq1 y MPIP, en tanto que, en poblaciones como la de Japón [29], el polimorfismo pERT87.8/Taq no resultó informativo, al igual que en una población del centro de México [23]. Sin embargo, para Japón resultó informativo el marcador pERT87.15/BamHI, que es un polimorfismo con un limitado poder de información en nuestra población y en Moldavia [30].

La identificación de delecciones en el gen de la distrofina y la detección de portadoras en familias con DMD/DMB contribuyen a la prevención del padecimiento para brindar un asesoramiento genético de certeza, lo que permite disminuir la aparición de casos nuevos mediante el planeamiento orientado de la reproducción, ya que la enfermedad es letal, invalidante y no existe tratamiento efectivo para ella.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Prior T, Bridgeman S. Experience and strategy for the molecular testing of Duchenne muscular dystrophy. *J Mol Diagn* 2005; 7: 317-26.
- Worton R, Molnar M, Brais B, Karpati G. The muscular dystrophies. In Scriver RC, Beaudet AL, Valle D, Childs B, Kinzler K, Vogelstein B, et al, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited diseases*. 8 ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 5493-523.
- Mostacciolo M, Lombardi A, Cambissa V. Population data on benign and severe forms of X-linked muscular dystrophy. *Hum Genet* 1987; 75: 217.
- Longo-Araujo de Melo E, Moreno-Valdés MT. Evaluación de la calidad de vida de los niños con distrofia muscular progresiva de Duchenne. *Rev Neurol* 2007; 45: 81-7.
- Richards CS, Watkins SC, Hoffman EP, Schneider NR, Milsark IW, Katz KS, et al. Skewed X inactivation in a female MZ twin results in Duchenne muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 1990; 46: 762-81.
- Guizar-Vázquez J. Genética clínica. Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias. México: El Manual Moderno; 2001.
- Davidson M, Baron M, Critchley D. Structural analysis of homologous repeated domains in alpha-actinin and spectrin. *Int J Biol Macromol* 1989; 11: 81.
- Zubrzyca-Gaarn E, Hutter OF, Karpani G, Klamut HJ. Dystrophine is tightly associated with the sarcolemma of mammalian skeletal muscle fibers. *Exp Cell Res* 1991; 192: 278.
- Chamberlain J, Gibbs R, Ranier JE, Nga-Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiple DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 11141-56.
- Clemens P, Fenwick R, Chamberlain J, Gibbs R, De Andrade M, Chakraborty R, et al. Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy families, using dinucleotide repeat polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 951-60.
- Pantoja-Martínez J, Martínez-Castellano F, Tarazona-Casany I, Buesa-Ibáñez E, Ardid-Encinar M, Esparza-Sánchez MA, et al. Síndrome de delección de genes contiguos en Xp21: asociación de deficiencia de gliceroquinasa, hipoplasia suprarrenal congénita y distrofia muscular de Duchenne. *Rev Neurol* 2007; 44: 606-9.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
- Roberts RC, Cole C, Hart K, Bobrow M. Rapid carrier and prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 811.
- Roberts RC, Montandon A, Bobrow M, Bentley DR. Detection of novel genetic markers by mismatch analysis. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 5961-71.
- Mallikarjuna GN, Hussain T, Geetha Devi N, Jain S, Chandak GR, Ananda R. Dystrophin gene deletions in South Indian Duchenne muscular dystrophy patients. *Indian J Med Sci* 2003; 57: 1-6.
- Elhawary-Nasser A, Rabah-Mohamad S, Nemat H. Frameshift deletion mechanisms in Egyptian Duchenne and Becker muscular dystrophy families. *Mol Cells* 2004; 18: 141-9.
- Kumari D, Mital A, Gupta M, Goyle S. Deletion analysis of the dystrophin gene in Duchenne and Becker muscular dystrophy patients: use in carrier diagnosis. *Neurol India* 2003; 51: 223-6.
- Aziza S, Fatiha El-K, Abdelaziz S. Analysis of dystrophin gene deletions by multiplex PCR in Moroccan patients. *J Biomed Biotech* 2002; 3: 158-60.
- Alcántara M, Villareal T, Del Castillo V, Gutiérrez G, Saldaña Y, Maulen I, et al. High frequency of de novo deletions in Mexican Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. Implications for genetic counselling. *Clin Genet* 1999; 55: 376-80.
- Freund A, Scola R, Arnd RC, Lorenzoni P, Kay C, Werneck L. Duchenne and Becker muscular dystrophy. A molecular and immunohistochemical approach. *Arq Neuropsiquiatr* 2007; 65: 73-6.
- Lo IF, Lai KK, Tong TM, Lam ST. A different spectrum of DMD gene mutations in local Chinese patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Chinese Med J (Engl)* 2006; 119: 1079-87.
- Carsana A, Frisso G, Tremolaterra M, Lanzillo R, Vitale D, Santero L, et al. Analysis of dystrophin gene deletions indicates that the III hinge region of the protein correlates with disease severity. *Ann Hum Genet* 2005; 69: 253-9.
- Lira-Romero E. Análisis del marcador pert 87.8/Taq 1 en familias con distrofia muscular de Duchenne (DMD) [tesis]. México: UNAM; 2002.

24. Hoelzel AR. Molecular genetic analysis of populations. A practical approach. Cambridge: IRL Press/Oxford University Press; 1994.
25. Alcántara MA, García-Cavazos R, Hernández E, González-Del Ángel A, Carnevale A, Orozco L. Carrier detection and prenatal molecular diagnosis in a Duchenne muscular dystrophy family without any affected relative available. *Ann Genet* 2001; 44: 149-53.
26. Abbs S, Roberts RG, Mathew CG, Bentley DR, Bobrow M. Accurate assessment of intragenic recombination frequency within the Duchenne muscular dystrophy gene. *Genomics* 1990; 7: 602-6.
27. Gatta V, Scarciolla O, Gaspari A, Palka C, De Angelis MV, Di Muzio A, et al. Identification of deletions and duplications of the DMD gene in affected males and carrier females by multiple ligation probe amplification (MLPA). *Hum Genet* 2005; 117: 92-8.
28. Taylor P, Maroulis S, Mullan G, Pedersen R, Baumli A, Elakis G, et al. Measurement of the clinical utility of a combined mutation detection protocol in carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *J Med Genet* 2007; 44: 368-72.
29. Tsukamoto H, Inui K, Fukushima H, Okada S. Allele frequencies of intragenic and 5' and 3' markers of the dystrophin gene in Japanese families afflicted with Duchenne or Becker muscular dystrophy. *Jpn J Hum Genet* 1996; 41: 391-7.
30. Sacara VC. Frequencies of pERT 87.8-8/Taq1 and pERT 87.15/BamH1 alleles linked to the Duchenne muscular dystrophy gene in Moldavian populations. *Am J Hum Genet* 2000; 218: 1180.

#### *IDENTIFYING DELETIONS IN THE DYSTROPHIN GENE AND DETECTING CARRIERS IN FAMILIES WITH DUCHENNE'S/BECKER'S MUSCULAR DYSTROPHY*

**Summary.** Introduction. *Between 60 and 65% of the mutations that cause Duchenne's/Becker's muscular dystrophy (DMD/BMD) are deletions in the dystrophin gene. Identifying deletions confirms the diagnosis and allows carriers to be detected with precision, which is the main preventive resource. The frequency and distribution of deletions in the DMD gene is unknown in south-east Mexico.* Aims. *To identify deletions in the DMD gene and to detect carriers in families with DMD/BMD in south-east Mexico.* Patients and methods. *The study involved 26 families that showed clinical signs of DMD/BMD. Deletions were determined in the DNA of 40 males by means of the multiple polymerase chain reaction (PCR) in 22 segments of the gene. Detection of carriers was applied to 33 female relatives using PCR-restriction fragment length polymorphism of the polymorphic markers Pert 87.8/Taq 1, pERT 87.15/Bam H1, and single PCR for VNTR MP1P by linkage analysis.* Results. *Deletions were identified in 67.5% of patients with DMD and they were located in the 5' end and in the central region, exons 44 to 52, of the gene. In the detection of carriers, 73.33% of the families were informative. The markers 87.8/Taq 1 and MP1P yielded the greatest information power, with 26.67 and 33.33%, respectively. Of a total of 33 females, 21 (63.64%) were carriers, one (3.03%) was a non-carrier and 11 (33.33%) were not informative.* Conclusions. *The frequency of deletions was 67.5%. Carrier status was determined in 66.67% of the females who were analysed. The markers pERT 87.8/Taq 1 and MP1P yielded the greatest information power.* [REV NEUROL 2009; 48: 66-70]

**Key words.** Carriers. Deletions. DMD. Dystrophin. Mexico. Muscular dystrophy.