
Detección de portadoras de distrofia muscular Duchenne/Becker a través del análisis de loci STRs ligados al gen de la distrofina en familias venezolanas.

Wilmer Noé Delgado-Luengo¹, Lisbeth Borjas-Fuentes¹, William Zabala-Fernández¹, Erika Fernández-Salgado¹, Ernesto Solís-Añez¹, Carlos Chávez¹, Caridad Martínez-Basalo¹, Sandra González-Ferrer¹, Alicia Rojas-Atencio¹, Alisandra Morales-Machin¹, Joaquín Peña¹, Lennie Pineda-Bernal¹, Richard González¹, Luis Eduardo Miranda¹, Juana Delgado-Luengo², María Luisa Hernández¹, José Antonio Chacín¹ y Maribel Quintero¹.

¹Unidad de Genética Médica y ²Postgrado de Puericultura y Pediatría. Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. Correo electrónico: lisbor@iamnet.com, ratencio@iamnet.com

Palabras clave: Distrofia muscular de Duchenne, detección de portadores, STRs.

Resumen. La Distrofia Muscular tipo Duchenne/Becker (DMD/DMB) es una enfermedad letal recesiva ligada al cromosoma X; el riesgo de recurrencia en una mujer portadora de DMD/DMB es de 50% de hijos sanos y 50% de hijos enfermos, 50% de hijas no portadoras y 50% de hijas portadoras, en cada gestación. El diagnóstico de DMD/DMB en una familia establece la necesidad de detectar a las mujeres portadoras con la finalidad de poder establecer el asesoramiento genético y el diagnóstico prenatal. El análisis de los polimorfismos de repeticiones cortas en tandem (STRs) localizados en los extremos 5', 3'e intrones 44, 45, 49 y 50 del gen de la Distrofina se han utilizado para determinar los haplotipos en personas normales y en riesgo, a través de establecer el ligamiento genético entre el gen mutado y el haplotipo segregado. Se analizaron 105 individuos provenientes de 15 familias venezolanas con DMD/DMB, con uno o más afectados y 7 varones no emparentados. De los 105 individuos, 37 eran varones (26 afectados y 11 sanos) y 68 mujeres. Se amplificaron las secuencias STRs (STR44, STR45, STR49, STR 50 y STR3'DYS) del gen de la Distrofina por reacción en cadena de la polimerasa y se analizaron los alelos polimórficos en los individuos estudiados. En 5/15 (33%) familias se demostró la delección de uno o varios exones. De las 68 mujeres, 27 (39,7%) resultaron portadoras, 27 (39,7%) no portadoras y en 14 (20,58%) no se pudo establecer un diagnóstico definitivo. En conclusión esta investigación pudo establecer el diagnóstico en 79,4% de las mujeres. Además en una familia se demostró que la mutación original ocurrió en el cromosoma X del abuelo materno, en otra se hizo el diagnóstico directo de portadora por hemiciigosidad para el alelo mutado y en otra fue posible el diagnóstico prenatal. No se pudo excluir el mosaicismo germinal en 3 casos.

Carrier detection of muscular dystrophy Duchenne/Becker by analysis de STRs loci linked to the gene of the distrofina in venezuelan families.

Invest Clin 2002; 43(4): 239-254.

Key words: Duchenne Muscular Dystrophy, carrier detection, STRs.

Abstract. The Duchenne/Becker Muscular Dystrophy (DMD/BMD) is an X linked recessive lethal disease. The female carrier will transmit the disease gene to half of her sons and half of her daughters; half of the daughters will be carriers, while half will be normal. Half of the sons will be normal and, on average, half will have the disease. It is of particular relevance to be able to detect carrier status among female relatives of the patients for genetic counseling and prenatal diagnosis. The method of Short Tandem Repeat (STR) sequence polymorphism analysis can determine haplotype at normal status or at risk status and, to establish genetic linkage between the mutated gene and the segregated haplotype. We have analyzed 105 members from 15 unrelated Venezuelan families with one or more siblings affected with DMD/DMB and 7 unrelated males. Of the 105, 37 were male (26 affected and 11 normal) and 68 were female. STR sequences (STR44, STR45, STR49, STR50, STR3'DYS) of the gene of the Dystrophin were amplified by polymerase chain reaction (PCR) to analyze allelic polymorphism in the families. Five of the 15 families (33%) had a deletion of one or several of the exons. Of the 68 females, 27 (39,7%) were carriers, 27 (39,7%) were non-carriers and in 14 cases (20,58%) it was not possible to reach a definitive diagnosis. The definitive diagnosis could be established in 79% of the females. This analysis also shows that the mutation occurred on the grandpaternal X chromosome in one family. Hemi-zygosity was detected and carrier status ascertained in the mother of other patient and in one family we were able to do prenatal diagnosis. The germinal mosaicism could not be excluded in 3 patients.

Recibido: 12-09-2001. Aceptado: 05-09-2002.

INTRODUCCIÓN

La Distrofia Muscular tipo Duchenne (DMD), es una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X. Afecta a 1/3500 varones nacidos vivos. La Distrofia Muscular tipo Becker (DMB) es una variante alélica más benigna y heterogénea en sus manifestaciones clínicas.

Se caracteriza por debilidad muscular progresiva, invalidante y por la creatinquinasa (CK) basal y post-ejercicio elevada (1).

La electromiografía (EMG) detecta un patrón miopático y los resultados de los estudios anatomopatológicos son referidos como distrofia muscular.

El locus del gen de la Distrofina se localiza en Xp21 (2-5) Comprende 79 exones extendidos aproximadamente sobre 2,4 megabases (Mb) de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) (6), con nueve promotores (Dp427l, Dp427c, Dp427m, Dp427p, Dp260, Dp140, Dp116, Dp71 y Dp40) (7-23) y un amplio rango de empalmes alternativos (24-31). El

gen codifica para la Distrofina, una proteína del citoesqueleto que junto a las glicoproteínas asociadas a la Distrofina (GAD), une el citoesqueleto subsarcolemal con la matriz extracelular ('eje Actina-Distrofina-complejo distroglicano - Laminina) (32). El papel de la Distrofina en la membrana aún no está claro, su distribución espacial e interacción con las GAD en la superficie del sarcolema puede actuar a manera de anclaje y protección del sarcolema y/o conformar canales o receptores de membrana (basados en alteraciones de los canales de Ca^{2+} en el músculo distrófico (33, 34).

Utilizando las sondas de ADN complementario (ADNc) del gen de la Distrofina, en diferentes poblaciones, se detectan entre 42,1 y 65% de mutaciones (35-39). La utilidad de los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (FRLPs) ligados al gen de la Distrofina se basa en su nivel de información, siendo los fragmentos más útiles cuanto mayor sea el nivel de heterocigosidad. El nivel de heterocigosidad en diferentes poblaciones (japoneses, chinos, turcos, rusos y caucásicos) oscila entre 80 y 99% (38-42). Aplicando la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) para diferentes secuencias nucleotídicas (43-45), las tasas de delección encontradas mundialmente oscilan entre 37 y 66% (40, 46-56).

En Venezuela, Delgado Luengo y col. estudiaron 24 individuos varones no relacionados, con diagnóstico de DMD/DMB, utilizando 2 estuches múltiples (9-plex: 4,8,12,17,19,44,45,48,51; 5-plex: Pmf + 1, 13,43,50,52) y detectaron 37,5% de las mutaciones (57). Posteriormente, ampliando el número de individuos estudiados a 30 y agregando un nuevo estuche múltiple (6-plex: 8,19,43,45,48,51) la frecuencia de detección de mutaciones se ubicó en 43,3% (trabajo no publicado).

El hecho que el gen de la Distrofina sea extremadamente largo (2,4 Mb), obliga a considerar la posibilidad de que ocurran

eventos de recombinación (12%), por lo que se deben utilizar sondas ADNc intragénicas y vecinas al gen o polimorfismos de repeticiones cortas en tandem (STRs por sus siglas en inglés) en los extremos 5', 3' y en la parte central del gen; esto es fundamental para establecer el haplotipo ligado al gen mutado para el diagnóstico de portadoras de DMD/DMB, diagnóstico prenatal, casos sin mutación detectable, caso único y familias con muerte del afectado.

Cuando la DMD/DMB es debida a delección en el gen de la Distrofina, el diagnóstico de portadoras a riesgo puede realizarse con sondas de ADNc (Southern blott), RFLPs, cuantificación del producto de la RCP marcado con radioactividad, sondas específicas para la hibridización *in situ* fluorescente (FISH) o electroforesis de gel en campo pulsado o invertido (58).

La identificación de portadoras y diagnóstico prenatal se hace difícil cuando por técnicas convencionales no se detectan mutaciones en el afectado o no se cuenta con el afectado. El análisis de ligamiento con RFLPs resulta difícil al considerar la posibilidad de eventos de recombinación intragénica entre los fragmentos analizados y la mutación. Para solventar esta limitación, es necesario estudiar FRLPs localizados en los extremos 5' y 3' del gen, pero la mayoría de las sondas se localizan en una región de 500-800 Kb del extremo 5' y muy pocas hacia el extremo 3'.

Dentro del gen de la Distrofina se han localizado diversos bloques repetitivos de STRs con diferentes niveles de información (46, 58-61), por lo que pueden ser utilizados en el estudio de genes de enfermedades hereditarias y desarrollo del mapa genético humano (62).

Beggs y Kunkel (59), detectaron cuatro polimorfismos de (CA)_n en el extremo 3' con frecuencias alélicas de A1= 0,22 (131 pb), A2= 0,70 (133 pb), A3= 0,07 (135 pb) y A4= 0,01 (137 pb); la heteroci-

gosisidad se calculó en 50%. Oudet y col. (58), detectaron estos polimorfismos de (CA)_n en el extremo 3' de la región no traducida del gen de la Distrofina humana. Estudiando población caucásica, identificaron dos alelos con frecuencias de A1= 0,22 (alelo de 135 pb), A2= 0,76 (alelo de 131 pb); luego se identificaron otros dos alelos en población diferente a la caucásica, A3 (alelo de 119 pb) y A4 (alelo de 117 pb); se calculó la heterocigosisidad en 37%, que pudiera considerarse baja si se toma en cuenta la presencia de sólo dos alelos en población caucásica. Clemens y col. (63), estudiaron varones caucásicos no emparentados y no afectados con DMD/DMB. El locus más polimórfico fue la secuencia corta repetitiva en tandem (STR) del intron 49 con 19 alelos (227-257 pares de bases) y heterocigosisidad de 93,3%, seguido por el STR-45 con 13 alelos (156-184 pares de bases), el STR-44 con 12 alelos (174-204) y el menos polimórfico fue el STR-50 con 6 alelos (233-251 pares de bases) y heterocigosisidad de 71,6%.

Tsukamoto y col. (64), estudiaron pacientes japoneses con DMD/DMB, analizando la frecuencia alélica y heterocigosisidad para la sonda pERT87 y polimorfismos de (CA)_n en los extremos 5' y 3'; las frecuencias alélicas de los (CA)_n en el 5' fueron diferentes de las halladas en población caucásica, el número de alelos en 5'DYSI y 5'DYSII eran menores que en caucásicos y la heterocigosisidad de los tres marcadores (5'DYSI, 5'DYSII y 5'DYSIII) fue más baja que en caucásicos. La frecuencia y heterocigosisidad de los polimorfismos de (CA)_n en 3' fueron similares a los de la población caucásica.

Miller y col. (65), utilizaron los polimorfismos de (CA)_n de la región 3' no traducida del gen de la Distrofina para el diagnóstico de DMD/DMB en familias donde no se detectó ninguna mutación (delección o duplicación); estudiaron familias con DMD/DMB a través de estos polimorfismos

ligados al gen de la Distrofina y lograron establecer sus haplotipos y diagnósticos en 27 familias (39%).

Los loci de STRs de los intrones 44, 45, 49 y 50 se ubican dentro de una de las dos regiones calientes del gen más frecuentemente mutadas, lo que los hace útiles para el diagnóstico directo de portadoras por detección de hemicigosisidad en la mujer con riesgo, solo sí, la mujer es heterocigota para dicho alelo basado en los haplotipos de sus padres.

En las familias en las cuales no se dispone de material del paciente afectado, el haplotipo respectivo de algún hermano sano puede utilizarse como diagnóstico de exclusión para el cromosoma portador de la mutación, y así detectar portadoras; esto podría extenderse al estudio de algún tío materno sano disponible. Otra aplicación del estudio de éstos polimorfismos es establecer el origen del cromosoma portador del gen mutado mediante la elaboración del haplotipo ligado a la enfermedad y su segregación a través de las generaciones. La alta información de estos cuatro loci de STRs, con 6-19 alelos y heterocigosisidad entre 58 y 93%, significa que las familias pueden ser informativas en esta región del gen de Distrofina. Aparte del estudio para diagnóstico de DMD/DMB, también los STRs pueden utilizarse en genética forense; en algunos casos la ocurrencia de nuevos alelos dentro de la familia es debida a no-paternidades y no a eventos mutacionales que generen nuevos alelos (52).

Baranzini y col. (66), estudiaron familias argentinas con DMD/DMB, utilizando polimorfismos de (CA)_n ligados al gen de la Distrofina, con los siguientes resultados: 8/28 (22,2%) portadoras obligadas corroboradas, 7/28 (25%) portadoras probables confirmadas y 20/28 (71,43%) no portadoras; las frecuencias alélicas en esta muestra diferían de la encontrada en una población de América del Norte.

Christodoulou y col. (67), estudiaron 29 familias chipriotas, analizando 18 exones por R.C.P. multiplex, detectando 21/28 (75%) de las deleciones y 1/28 (3,6%) duplicación; por R.C.P. cuantitativo, se estudiaron 69 hembras con riesgo de portadoras de las cuales en 20 (28,9%) se confirmó el estado de portadora.

El objetivo de este trabajo es establecer los haplotipos de polimorfismos de STRs de los loci 44, 45, 49, 50 y 3'DYS del gen de la Distrofina para determinar el estado de portadoras y no portadoras de Distrofia Muscular tipo Duchenne/Becker en familias venezolanas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron 112 individuos (26 afectados con DMD/DMB, 18 varones sanos y 68 mujeres con riesgo de portadoras) provenientes de 15 familias venezolanas no relacionadas que fueron referidas a la Unidad de Genética Médica de la Facultad de Medicina de La Universidad del Zulia (Maracaibo-Venezuela). El diagnóstico del propósito se basó en su fenotipo, creatinquinasa (CK), electromiografía, estudio anatomopatológico de músculo y análisis molecular del gen de la Distrofina (estuche de 9-plex: exones 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 48, 51; estuche de 5-plex: exones Pmf+1, 13, 43, 50, 52), previamente publicados (57). Los criterios de inclusión para considerar la condición de portadora obligada fueron: madre con 2 ó más hijos afectados, o un hijo afectado y antecedentes familiares de la enfermedad o madre sin hijos afectados pero con dos hijas portadoras obligadas; portadora a riesgo (probables y posibles) es la madre con CK normal, un hijo afectado e hijas con CK elevado, o hembras por línea materna de afectados con CK normal o CK elevado.

A cada individuo se le extrajeron 6 mL de sangre periférica que se anticoaguló con

ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (500 mM) Para la extracción de ADN se utilizaron los pasos de solución de lisis y digestión con proteinasa K de la técnica Fenol-Sevag (68) y se complementó con la técnica inorgánica (69). A cada ADN se le determinó su concentración a través de un espectrofotómetro (UV/VIS) Spectrometer Lambda Perkin-Elmer y se conservó a -20°C .

La mezcla de reacción para la amplificación de polimorfismos de (CA) $_n$ ligados al gen de la Distrofina se realizó bajo las siguientes condiciones:

Intrones 44 y 49

2,5 μL de buffer Taq DNA Polimerasa, 1,5 μL MgCl_2 (1,5 mM), 0,5 μL dNTPs (0,2 mM), Taq ADN Polimerasa (0,5 unidades), 2,5 μL de cada uno de los siguientes iniciadores (15 pmol):

- 44/A: 5'-TCCAACATTggAAATCACATT TCAA-3'
- 44/B: 5'-TCATCACAAATAgATgTTTCACAG-3'
- 49/A: 5'-CgTTTACCAGCTCAAAATCTCAAC-3'
- 49/B: 5'-CATATgATACgATTCgTgTTT TgC-3'
- 100 nanogramos (ng) de ADN genómico en un volumen final de 25 μL .

Intrones 45 y 50

2,5 μL de buffer Taq DNA Polimerasa, 1,5 μL MgCl_2 (1,5 mM), 0,5 μL dNTPs (0,2 mM), Taq ADN Polimerasa (0,5 unidades), 2,5 μL de cada uno de los siguientes iniciadores (15 pmol):

- 45/A: 5'-gAggCTATAATTCTTTAACTTT ggC-3'
- 45/B: 5'-CTCTTCCCTCTTTATTCATg TTAC-3'
- 50/A: 5'-AAggTTCCTCCAgTAACAgATT Tgg-3'
- 50/B: 5'- TATgCTACATAgTATgTCCT CAgAC-3'

- 100 nanogramos (ng) de ADN genómico en un volumen final de 25 μ L.

Las muestras fueron colocadas en un termociclador bajo el siguiente programa: A. 94°C por 4 minutos, B. 94°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos, 65°C por 2 minutos, C. Ir al paso B. Por 25 ciclos, D. 65°C por 7 minutos, E. 4°C.

Extremo 3': 3DYS

2,5 μ L de buffer Taq DNA Polimerasa, 1,5 μ L MgCl₂ (1,5 mM), 0,5 μ L dNTPs (0,2 mM), Taq ADN Polimerasa (0,5 unidades), 2,5 μ L de cada uno de los siguientes iniciadores (15 pmol):

- 3DYS/A: 5'-gAAAAgATTgTAACTAA AgTgTgCTTTA- 3'
- 3DYS/B: 5'-ggATgCAAAACAATgCgC TTg CCTCTCA-3'.

Las muestras fueron colocadas en un termociclador bajo el siguiente programa: A. 94°C por 7 minutos, B. 94°C por 60 segundos, 65°C por 40 segundos, 72°C por 2 minutos, C. Ir al paso B. Por 20 ciclos, D. 72°C por 10 minutos, E. 4°C. Verificación y análisis de los productos amplificados: Electroforesis de 5 μ L del producto amplificado en gel de agarosa al 2% a 100 voltios por 35 minutos, tinción en solución de bromuro de etidium y visualización en pantalla de luz ultravioleta (UV), posteriormente, se tomaron 2,5 μ L del producto de la amplificación y se mezclaron con colorantes de azul de bromofenol y xilencianol, la mezcla se colocó en gel de poliacrilamida al 5% en condiciones desnaturizantes (poliacrilamida/urea: 19:1) a 2300 voltios hasta verificar una migración de 36 centímetros. Para la visualización de las bandas del producto amplificado se utilizó un método de tinción con nitrato plata (nitrato de plata, formaldehído 37%, tiosulfato de sodio y carbonato de sodio anhídrido) (70).

RESULTADOS

De los 112 individuos que se estudiaron, 26 eran varones afectados, 18 varones sanos (11 varones sanos con antecedentes familiares de DMD/DMB y 7 varones sanos no relacionados sin antecedentes familiares de DMD/DMB) y 68 mujeres a riesgo.

De las 68 mujeres, 27 (39,7%) resultaron sanas no portadoras, 27 (38,23%) portadoras y en 14 (22,06%) no se pudo obtener un diagnóstico definitivo.

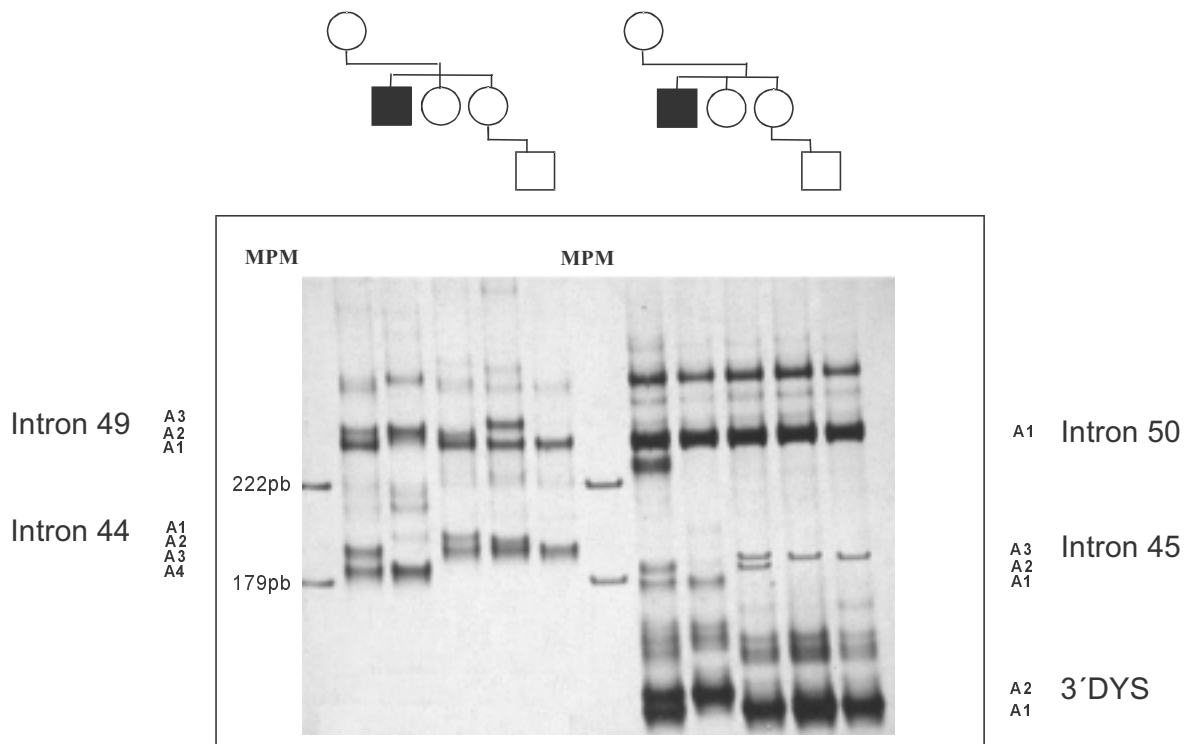
De las 15 familias, 9 (60%) tenían antecedentes familiares de DMD/DMB y 6 (40%) no tenían antecedentes. Se detectaron deleciones por RCP con los estuches de 9 y 5-plex en 5 (33%) de las 15 familias. En la Fig. 1 se muestra los productos amplificados de STRs de los intrones 44, 45, 49, 50 y 3'DYS de una de las familias en estudiadas.

Familia 95-9377 (Fig. 2)

No hay antecedentes familiares de DMD/DMB. No se detectaron deleciones por RCP con los estuches de 9 y 5-plex en el propósito. Los loci 44, 45, 49, 50 y 3'DYS mostraron 2, 4, 4, 2 y 3 alelos diferentes, respectivamente. El haplotipo de Polimorfismos de (CA)_n ligado a DMD/DMB fue A2-(del)-A1-A3-A3. Basándose en esto, se descartó que la madre fuera portadora obligada (II₃), ya que ella era heterocigota para el locus 45 (A2/A4) y el propósito tenía deleción el intron 45, por lo que la condición de mosaicismo germinal no puede descartarse. Además, se diagnosticaron 2 no portadoras (II₆ y II₈). Probablemente el propósito es una mutación de novo.

Familia 79-1974 (Fig. 3)

Hay antecedentes familiares de DMD/DMB: un tío materno muerto (II₁) y dos primos hermanos (III₂ y III₃), por lo que se asume deben presentar la misma muta-



MPM: Marcador de peso molecular

Fig. 1. Detección de portadoras de distrofia muscular Duchenne/ Becker a través del análisis de loci STRs ligados al gen de la distrofina en familias venezolanas.

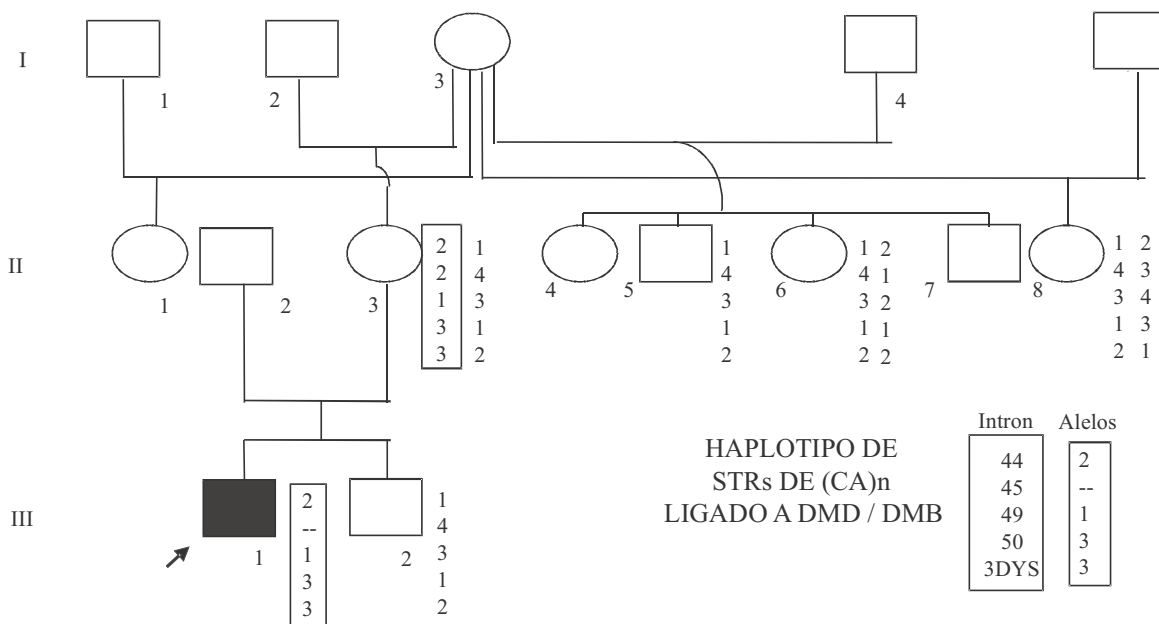


Fig. 2. Familia # 95-9377. Detección de portadoras de distrofia muscular Duchenne/Becker a través del análisis de loci STRs ligados al gen de la distrofina en familias venezolanas.

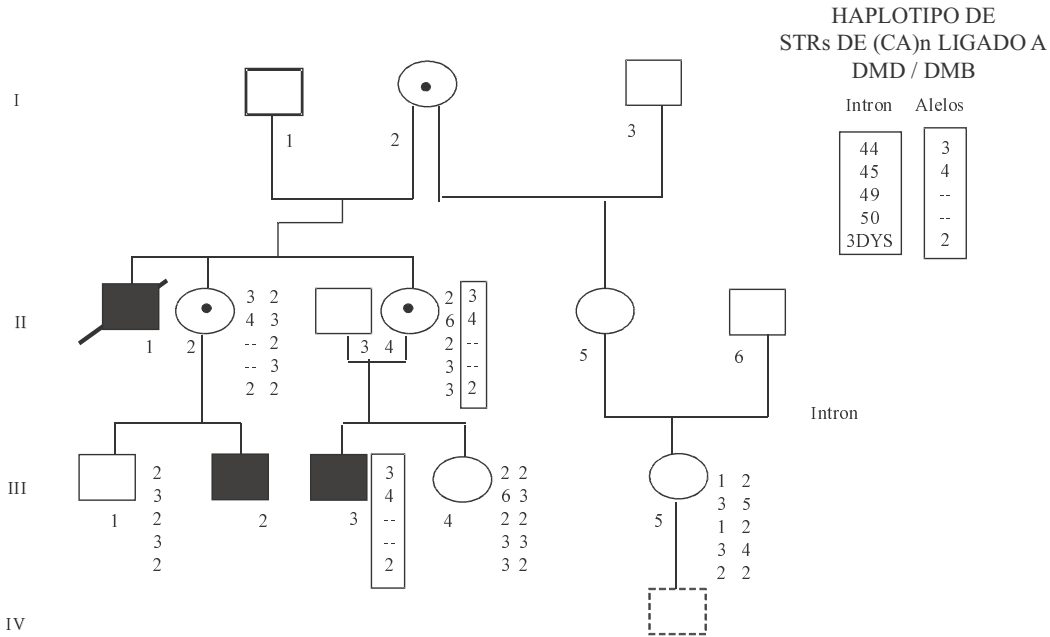


Fig. 3. Familia 79-1974. Detección de portadoras de distrofia muscular Duchenne/Becker a través del análisis de loci STRs ligados al gen de la distrofina en familias venezolanas.

ción. Se detectaron deleciones de los exones 50, 51 y 52 con los estuches de 9 y 5-plex por RCP en el propósito, además la deleción del intron 49 y 50 en el presente trabajo. Los loci 44, 45, 49, 50 y 3'DYS mostraron 3, 4, 2, 2 y 2 alelos diferentes, respectivamente. Los loci 49 y 50 presentaron 2 alelos cada uno, de los cuales un alelo para los loci 49 y 50 estaban delecionados II₂ y II₄ por lo que sus condiciones son hemicigotas para ese alelo, basado en la heterocigosidad de III₄ y las deleciones de III₁ III₃. El haplotipo de Polimorfismos de (CA)_n ligado a DMD/DMB fue A3-A4-(del)-(del)-A2. Sobre la base de esto, se diagnosticaron 3 portadoras obligadas (II₂ y II₄), 2 no portadoras (III₄ y III₅). El diagnóstico prenatal realizado en (III₅) utilizando estos polimorfismos demostró que IV₁ era un varón sano.

Familia 85-4614 (Fig. 4)

No hay antecedentes familiares de DMD/DMB. Se detectó en el propósito (III₁)

deleción del exon 45 con el estuche de 9-plex por RCP y deleción del intron 45 en el presente trabajo. Los loci 44, 45, 49, 50 y 3'DYS mostraron 3, 2, 2, 2 y 1 alelos diferentes, respectivamente. El haplotipo de Polimorfismos de (CA)_n ligado a DMD/DMB fue A1-(del)-A2-A2-A2. Basándose en esto, II₂, II₆ y II₇ son no portadoras; no se descarta mosaicismo germinal en II₂. Se diagnosticó que III₂ no era portadora, por su heterocigosidad para los alelos 44, 45, 49 y 50, donde el haplotipo A3 - A4 - A1 - A3 - A2 fue heredado de su padre. Igualmente el análisis de ligamiento demostró que el origen del cromosoma que porta la mutación génica proviene del abuelo materno. La condición de mutación de novo en el propósito no puede descartarse.

Familia 95-9284 (Fig. 5)

No hay antecedentes familiares de DMD/DMB. Se detectó en el propósito (III₁) deleción del exon 45 con el estuche de 9-plex por RCP y deleción del intron 45 en el pre-

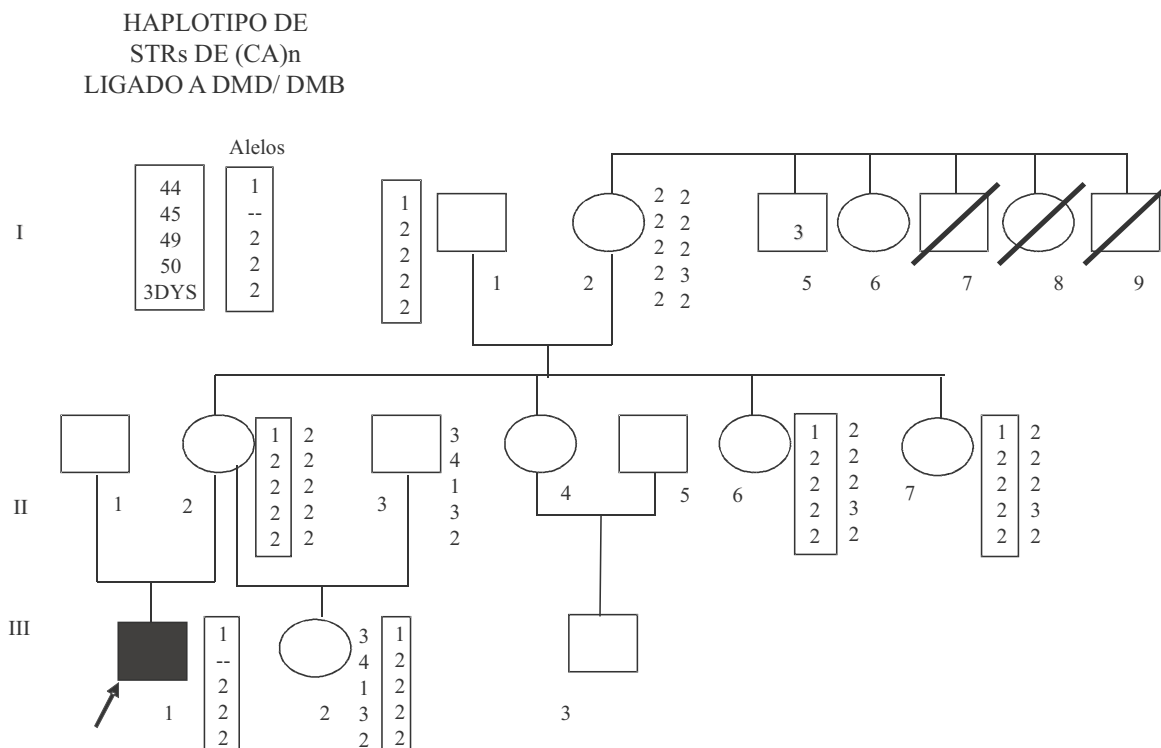


Fig. 4. Familia 85-4614. Detección de portadoras de distrofia muscular Duchenne/Becker a través del análisis de loci STRs ligados al gen de la distrofina en familias venezolanas.

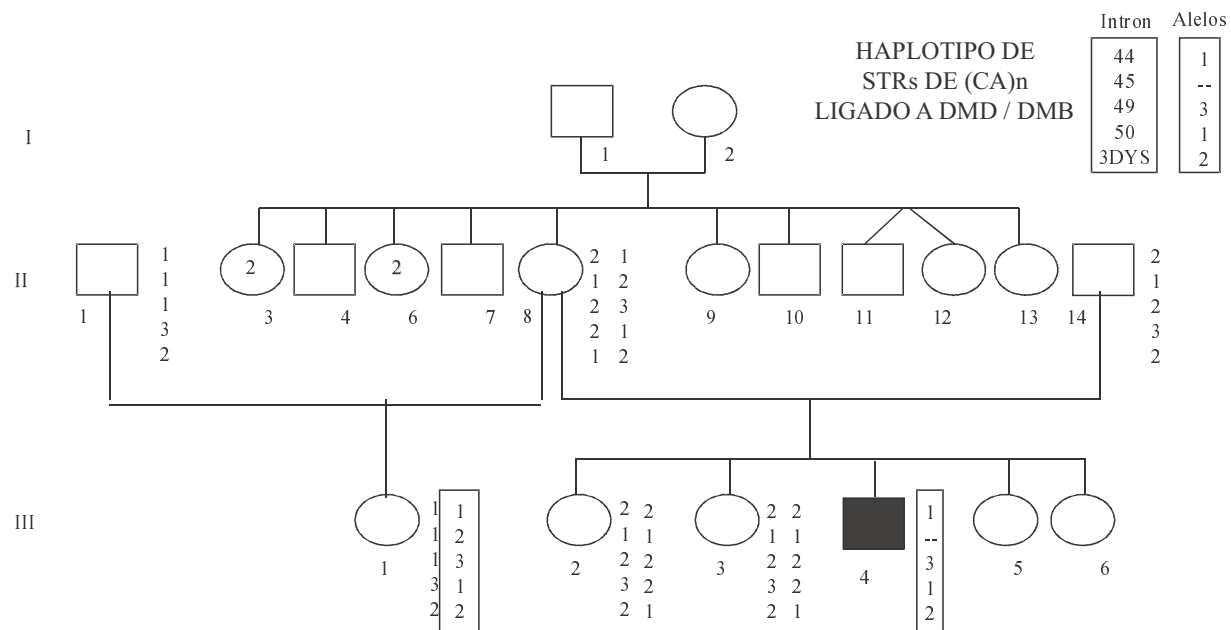


Fig. 5. Familia 95-9284. Detección de portadoras de distrofia muscular Duchenne/Becker a través del análisis de loci STRs ligados al gen de la distrofina en familias venezolanas.

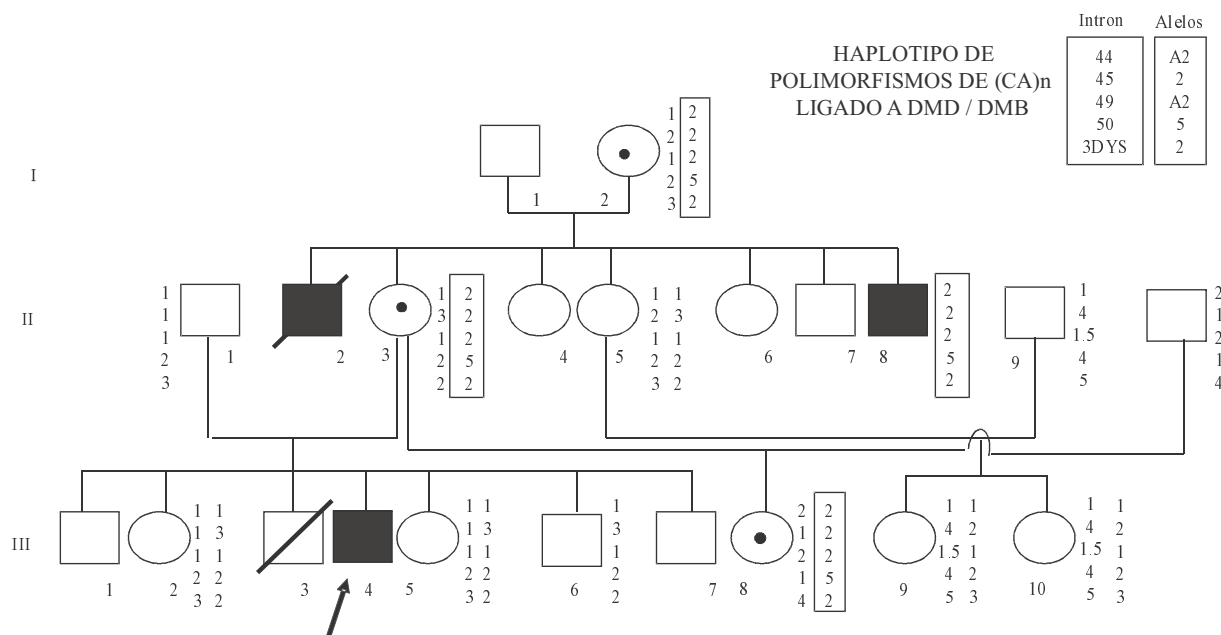


Fig. 6. Familia 95-9090. Detección de portadoras de distrofia muscular Duchenne/Becker a través del análisis de loci STRs ligados al gen de la distrofina en familias venezolanas.

sente trabajo. Los loci 44, 45, 49, 50 y 3'DYS mostraron 2, 2, 3, 3 y 2 alelos diferentes, respectivamente. El haplotipo ligado a DMD/DMB fue A1-(del)-A3-A1-A2. Basándose en esto, no se obtuvo diagnóstico definitivo de portadoras, ya que II₈ resultó ser heterocigota para el alelo 45; Aunque III₁ porta el haplotipo heredado por III₄, ella es heterocigota para el alelo 45 por lo que se descarta la condición de portadora; por otra parte, III₂ y III₃ no portan el haplotipo ligado a la enfermedad descartándose también la condición de portadora. Probablemente el propósito es una mutación de novo. No se descarta el mosaicismo germinal en la madre (II₈) ya que es heterocigota para el alelo 45 el cual está ausente en el propósito (III₄).

Familia 95-9090 (Fig. 6)

Hay antecedentes familiares de DMD/DMB. No se detectaron deleciones con los estuches de 9 y 5-plex por RCP. Los loci 44, 45, 49, 50 y 3'DYS mostraron 2, 4,

2, 4 y 4 alelos diferentes, respectivamente. El haplotipo (A2-2-A2-5-2) de II₈ está ligado a DMD/DMB. La condición de I₂ es de portadora obligada por tener dos hijos afectados. Sobre la base de esto, se diagnosticaron 3 portadoras obligadas (I₂, II₃ y III₈); 5 no portadoras (II₅, III₂, III₅, III₉ y III₁₀).

DISCUSIÓN

La DMD/DMB es una de los primeros motivos de consulta en la Unidad de Genética Médica de la Facultad de Medicina de La Universidad del Zulia (71). La ocurrencia de una enfermedad genética y/o malformación congénita en una familia, origina angustias e incertidumbre acerca de 'algo' de lo cual muchos médicos generales y/o especialistas desconocen. La aparición de estas enfermedades genera un reto para el Genetista al momento de dar el asesoramiento genético. Establecer el diagnóstico, complicaciones, evolución, pronóstico, ries-

go de ocurrencia o recurrencia basándose en el modo de herencia, posible tratamiento, rehabilitación y diagnóstico prenatal, son fundamentales para un correcto asesoramiento genético.

La mujer portadora de una mutación recesiva ligada al cromosoma X tiene un riesgo de tener 50% de varones sanos y 50% de varones enfermos, 50% de hijas no portadoras y 50% de hijas portadoras de la mutación, en cada gestación. Por lo tanto, la ocurrencia de enfermedades recesivas ligadas al cromosoma X establece un reto para el investigador, al tener que determinar entre las mujeres de una familia por línea materna: (portadoras obligadas o probables) cuáles de ellas son portadoras de la mutación y cuáles no. Por otro lado, esto es aún más necesario cuando se requiere realizar diagnóstico prenatal en las portadoras (obligadas y probables).

En aproximadamente el 40% de los pacientes con DMD/DMB no se detecta mutación, por lo que el análisis de ligamiento a través de marcadores polimórficos ligados al gen mutado se hace imprescindible para el diagnóstico indirecto y asesoramiento de mujeres portadoras en la familia. Los STRs de (CA)_n localizado en los intrones 44, 45, 49, 50 y 3'DYS del gen de la Distrofina pueden ser utilizados para estos estudios; los cuatro primeros se encuentran en una región de alta frecuencia de mutación que a menudo están deletados en el paciente, lo que permite el diagnóstico de afectados y de portadoras por detección de hemiciigosidad en la mujer con riesgo, solo si, la mujer es heterocigota para dichos alelos, basándose en los haplotipos de sus padres, sin excluir el mosaicismo germinal. En esta investigación se pudo establecer que la madre II₈ en la familia 95-9284 es heterocigota para el alelo mutado (intron 45) por lo que no es portadora obligada de la mutación, no obstante la condición del mosaicismo germinal en ella no puede excluirse. En la familia 79-

1974 la hemiciigosidad para los alelos 49 y 50 en II₂ y II₄ pudo establecerse por los haplotipos de III₁, III₃ y III₄. Aparte de esto, en la familia 85-4614 pudo establecerse el origen del cromosoma portador de la mutación segregado a partir del abuelo materno. Hay investigaciones que sugieren que en algunos casos la mutación pudo originarse durante la espermatogénesis del abuelo materno (72), basados en el hecho que la misma es continua, y que cada vez que la espermatogonía se divide duplica su ADN y por tanto existe la posibilidad que ocurra la mutación; esta mutación es segregada a sus hijas (portadoras) y éstas a su vez la transmiten a sus hijos e hijas, con el consiguiente desenlace.

De las 68 mujeres, 27 (39,7%) resultaron sanas no portadoras, 27 (39,7%) portadoras y en 14 (20,58%) no se pudo obtener un diagnóstico definitivo.

Con la utilización de estos polimorfismos de (CA)_n, se pudo establecer el diagnóstico en 54 (79,4%) de las 68 mujeres; de las cuales 27 (39,7%) fueron portadoras obligadas, 27 (39,7%) no portadoras y en 14 (20,58%) no se obtuvo diagnóstico definitivo. Miller y col. (65) reportaron que en el 37% de los casos lograron establecer haplotipos y diagnósticos. Nuestros resultados, sin embargo, difieren poco de los de otras investigaciones en poblaciones argentina y asiática, quizás nuestra mezcla étnica es más heterogénea (caucásica, negroide y mongoloide) y la utilización de un número suficiente de loci STRs localizados a lo largo del gen de la Distrofina pudiera aumentar el porcentaje de diagnóstico de portadoras.

El número de alelos observados para cada locus en cada una de las familias está en relación directa con el nivel de heterocigosidad. Esta es una de las características utilizadas para la aplicación de estos loci de STRs, lo cual pudo ser detectado en la investigación. Sin embargo, deben establecer-

se los tamaños (pb) de los diferentes alelos de los diferentes loci en toda la muestra para definirse con mayor exactitud su nivel de heterocigosidad en población venezolana (en proceso).

En conclusión, la determinación de los haplotipos de los loci de STRs de los intrones 44, 45, 49, 50 y 3'DYS del gen de la Distrofina en estas familias, permitió el diagnóstico de portadoras (obligadas y probables) o no portadoras e hizo posible el diagnóstico prenatal, estableciendo las bases para un adecuado asesoramiento genético en los miembros de cada familia.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de La Universidad del Zulia (Proyecto 01391-97)

REFERENCIAS

1. **Munsat TL, Balch R, Pearson CM, Fowler W.** Serum enzyme alterations in neuromuscular disorders. *J Am Med Assoc* 1973; 226:1536.
2. **Bakker E, Hofker MH, Goor N, Mandel JL, Wrogemann K, Davies KE, Kunkel LM, Willard HF, Fenton WA, Sandkuy L, Majoor-Krakauer D, van Essen AJ, Jahoha MGJ, Sach ES, van Ommen GJB, Pearson PL.** Diagnosis and carrier detection of Duchenne muscular dystrophy with closely linked RFLPs. *Lancet* 1985; 1:655-658.
3. **Davies KE, Pearson PL, Harper PS, Murray JM, O'Brien T.** Linkage analysis of two cloned DNA sequences flanking the Duchenne Muscular Dystrophy locus on the short arm of the human X chromosome. *Nucl Acid Res* 1983; 11:2303-2312.
4. **Kingston HM, Sarfarazi M, Thomas NST, Harper PS.** Localization of the Becker muscular dystrophy gene on the short arm of the X chromosome by linkage to cloned DNA sequences. *Hum Genet* 1984; 67: 6-17.
5. **Monaco AP, Kunkel LM.** A giant locus for the Duchenne and Becker muscular dystrophy gene. *TIG* 1987; 3:33-37.
6. **Roberts R.** Dystrophins and dystrobrevins. *Genome Biology* 2001; 2(4): 3006.1-3006.7
7. **Boyce FM, Beggs AH, Feener C, Kunkel LM.** Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:1276.
8. **Byers TJ, Lidov HGW, Kunkel LM.** An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nature Genet* 1993; 4:77.
9. **Coffey AJ, Roberts RG, Green ED, Cole CG, Butler R, Anand R, Gianelli F, Burtley DR.** Construction of a 2.6 Mb contig in yeast artificial chromosome spanning the human Dystrophin gene using an STS-based approach. *Genomics* 1992; 12:474-484.
10. **Den Dunnen JT, Grootsholten PM, Dauwerse JG, Walker AP, Monaco AP, Butler R, Anand R, Coffey AJ, Bentley DR, Steensma HY, Van Ommen GJB.** Reconstruction of the 2,4 Mb human DNA - gene by homologous recombination in yeast. *Hum Mol Genet* 1992; 1:19-28.
11. **Gorecki DC, Monaco AP, Derry JM, Walker AP, Barnard EA, Barnard PJ.** Expression of four alternative transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Hum Mol Genet* 1992; 1:505-510.
12. **Klamut HJ, Gangopadhyay SB, Worton RG, Ray PN.** Molecular and functional analysis of the muscle-specific promoters region of the Duchenne Muscular Dystrophy gene. *Mol Cell Biol* 1990; 10:193-205.
13. **Roberts RG, Bobrow M, Bentley DR.** Point mutations in the Dystrophin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:2331-2335.
14. **Nishio H, Takeshima Y, Narita N, Yanagawa H, Suzuki Y, Ishikawa Y, Ishikawa Y, Minami R, Nakamura H, Matsuo M.** Identification of a novel first exon in the human dystrophin gene and of a new promoter located more than 500 kb upstream of the nearest known promoter. *J Clin Invest* 1994; 94(3):1037-1042.

15. **Nudel U, Zuk D, Einat P, Zeelon E, Levy Z, Neuman S, Yaffe D.** Duchenne muscular dystrophy gene product is not identical in muscle and brain. *Nature* 1989; 337 (6202):76-78
16. **Holder E, Maeda M, Bies RD.** Expression and regulation of the dystrophin Purkinje promoter in human skeletal muscle, heart, and brain. *Hum Genet* 1996; 97(2):232-239
17. **Pillers DM, Bulman DE, Weleber RG, Sigesmund DA, Musarella MA, Powell BR, Murphey WH, Westall C, Panton C, Becker LE, Worton RG, Ray PN.** Dystrophin expression in the human retina is required for normal function as defined by electroretinography. *Nat Genet* 1993; 4(1):82-86
18. **D'Souza VN, Nguyen TM, Morris GE, Kargès W, Pillers DA, Ray PN.** A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Human Molecular Genetics* 1995; 4:837-842.
19. **Lidov HG, Kunkel LM.** Dp140: alternatively spliced isoforms in brain and kidney. *Genomics* 1997, 45(1):132-139
20. **Lidov HG, Selig S, Kunkel LM.** Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Hum Mol Genet* 1995; 4(3):329-335
21. **Bar S, Barnea E, Levy Z, Neuman S, Yaffe D, Nudel U.** A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the known isoforms in its structure and tissue distribution. *Biochem J* 1990; 272(2):557-560
22. **Rapaport D, Lederfein D, den Dunnen JT, Grootsholten PM, Van Ommen GJ, Fuchs O, Nudel U, Yaffe D.** Characterization and cell type distribution of a novel, major transcript of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Differentiation* 1992; 49(3):187-193.
23. **Austin RC, Howard PL, D'Souza VN, Klamut HJ, Ray PN.** Cloning and characterization of alternatively spliced isoforms of Dp71. *Hum Mol Genet* 1995; 4(9): 1475-1483
24. **Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl S, Gaver M, Campbell KP.** Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* 1990; 345:315-319.
25. **Ervasti JM, Campbell KP.** Membrane organization of the Dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 1991; 66:1121-1131.
26. **Rapaport D, Passos-Bueno MR, Brandao L, Love D, Vainzof M, Zatz M.** Apparent association of mental retardation and specific patterns of deletions screened with probes cf56a and cf23a in Duchenne muscular dystrophy. *Am J Med Genet* 1991; 39(4):437-441
27. **Reiss J, Rininsland F.** An explanation for the constitutive exon 9 cassette splicing of the DMD gene. *Hum Mol Genet*, 1994, 3: 295-298
28. **Barbieri AM, Soriani N, Ferlini A, Michelato A, Ferrari M, Carrera P.** Seven novel additional small mutations and a new alternative splicing in the human dystrophin gene detected by heteroduplex analysis and restricted RT-PCR heteroduplex analysis of illegitimate transcripts. *Eur J Hum Genet* 1996; 4(3):183-187
29. **Tinsley JM, Blake DJ, Davies KE.** Apodystrophin-3: a 2.2kb transcript from the DMD locus encoding the dystrophin glycoprotein binding site. *Hum Mol Genet* 1993, 2(5): 521-524
30. **Feener CA, Koenig M, Kunkel LM.** Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature* 1989; 338(6215):509-511
31. **Tuffery-Giraud S, Chambert S, Demaille J, Claustres M.** Point mutations in the dystrophin gene: evidence for frequent use of cryptic splice sites as a result of splicing defects. *Hum Mutat* 1999; 14(5):359-368
32. **Ozawa E, Yoshida M, Suzuki A, Mizuno Y, Hagiwara Y, Noguchi S.** Dystrophin-associated proteins in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*, 1995; 4:1711-1716.
33. **Franco A Jr, Lansman JB.** Calcium entry through stretch inactivated ion channels in mdx myotubes. *Nature* 1990; 344:670-673.
34. **Fong PY, Turner PR, Denetclaw WF, Sleinhardt RA.** Increased activity of calcium leak channels in myotubes of Duchenne human and mdx mouse origin. *Science* 1990; 250: 673.

35. **Falco-Conceio DN, Goncalves-Pimentel MM, Moreira CP.** Screening for deletions in Duchenne and Becker muscular dystrophy patients using the genomic probe P20 and the cDNA XJ10 (1-2b), 7b-8, and 44-1 probes. *Rev Bras Genet* 1992; 15(2): 469-481.
36. **Pasos-Bueno MR, Rapaport D, Love D, Flint T, Bortilini ER, Zats M, Davies KE.** Screening of deletions in the dystrophin gene with the cDNA probes Cf23a, Cf56a, and Cf115. *J Med Genet* 1990; 27:145-150.
37. **Rapaport D, Pasos-Bueno MR, Vainzof M, Lima MABO, Zatz M.** Frequency and pattern of DNA deletions in Duchenne (DMD) and (BMD) patients: comparisons of different racial background and isolated versus inherited cases. *Rev Bras Genet* 1992; 15(2):459-467.
38. **Soong BW, Tsai TF, Su CHH, Kao KP, Hsiao KJ, Su TS.** DNA polymorphism and deletions analysis of the Duchenne-Becker muscular Dystrophy gene in the chinese. *Am J Med Genet* 1991; 38:593-600.
39. **Sugino S, Fujishita S, Kamimura N, Matsumoto T, Wapenaar MC, Deng HX, Shibuya N, Miike T, Niikawa N.** Molecular genetic study of Duchenne and Becker muscular dystrophies: Deletion analysis of 45 Japanese patients and segregation analysis in their families with RFLPs based on the data from normal japonese females. *Am J Med Genet* 1989; 34:555-561.
40. **Baranov VS, Gorbunova VN, Malysheva OV, Artemyeva OV, Kascheeva OV, Polyakov AV, Lebedev VM, Kuznetzova TV, Shylova SN, Mikhailov AV Varharlovsky VG.** Dystrophin gene analysis and prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy in Russia. *Prenat Diagn* 1993; 13:323-333.
41. **Gokgoz N, Kuseyri F, Topaloglu H, Vukel-Apak M, Kardav B.** Screening of deletions and RFLPs analysis in Turkish DMD/DMB families by PCR. *Clin Genet* 1993; 43:261-266.
42. **Pearson PL, Kidd KK, Willard HF.** Report of the committee on human gene mapping by recombinant DNA techniques. Human gene mapping), Ninth International workshop on human gene Mapping. *Cytogenet Cell Genet* 1987; 46:390-555.
43. **Emery AEH.** Duchenne Muscular Dystrophy. In: Oxford University Press; Oxford Monographs on Medical Genetics, 1987. N° 15; Oxford.
44. **Koenig M, Hoffman PE, Bertleson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel M.** Complete cloning of the Duchenne Muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987; 50: 509-517.
45. **Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T, Meng G, Muller CR, Lindlof M, Kaariainen H.** The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet* 1989; 45:498-506.
46. **Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM.** Detection 98% of DMD/DMB gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1990; 86:45-48.
47. **Chamberlain JS, Gibbs Ra, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT.** Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucl Acid Res* 1988; 16(23):11141-11156.
48. **Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Caskey CT.** Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne Muscular Dystrophy. In: *PCR Protocols. A guide to methods and application* (ed. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ). 1990. p. 272-281. Academic Press Inc. San Diego.
49. **Conceio DNF, Pimentel MMG, Moreira CP, Kneppers ALJ, Bakker E.** Use of two multiplex (PCR) reactions as initial deletion screening method for DMD and DMB patients. *Rev Bras Genet* 1992; 15(3):657-666.
50. **Coral-Vázquez R, Arenas D, Cisneros B, Peñaloza L, Kofman S, Salamanca F Montañez C.** Analysis of Dystrophin gene deletions in patients from the Mexican population with Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Arch Med Res* 1993; 24(11):1-6.
51. **Covone AE, Caroli F, Romeo G.** Screening Duchenne and Becker muscular Dystrophy patients for deletions in 30 exones of the

- dystrophin gene by three-multiplex PCR. *Am J Hum Genet* 1992; 51:675-677.
52. **Kruyer H, Miranda Merce, Valpini V, Estivill X.** Carrier detection and microsatellite analysis of Duchenne and Becker muscular dystrophy in Spanish families. *Prenat Diagn* 1994; 14:123-130.
 53. **Multicenter Study Group.** Diagnosis of Duchenne and Becker Muscular Dystrophies by Polymerase Chain Reaction. A Multicenter Study. *J Am Med Assoc*, 1992. 297(19): 2609-2615.
 54. **Niemann-Seyde S, Slomsky R, Rininsland F, Ellermeyer U, Kwiatkowska J, Reiss J.** Molecular Genetic analysis of 67 patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Hum Genet* 1992; 90:65-70.
 55. **Shomart R, Gluck E, Legum C, Shiloh Y.** Relatively low proportion of dystrophin gene deletions in Israel Duchenne and Becker Muscular Dystrophy patients. *Am J Med Genet* 1994; 49:369-373.
 56. **Yang RC, Yang SL, Jin SH, Chen HW, Jong YJ, Chen SS, Suzuki Y.** Detection of dystrophin of dystrophin gene deletions in chinese Duchenne/Becker muscular dystrophy patients utilizing multiplex polymerase chain reaction. *Kao-Hsing-I-Hsueh-ko-Hsueh-Tsa-Chin* 1994; 10(1):1-8.
 57. **Delgado-Luengo W, Pineda-Del Villar L, Borjas L, Pons H, Morales-Machin A, Martínez-Basalo MC, Barrera-Saldaña H.** Diagnóstico Molecular en pacientes venezolanos con Distrofia Muscular de Duchenne/Becker mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa. *Invest Clín* 1994; 35(4):195-207.
 58. **Oudet C, Heilig R, Mandel JL.** An informative polymorphism detectable by polymerase chain reaction at the 3' end of the dystrophin gene. *Hum Genet* 1990; 84:283-285.
 59. **Beggs AH, Kunkel LM.** A polymorphic CACA repeat in the 3' untranslated region of dystrophin. *Nucl Acid Res* 1990; 8(7):1931.
 60. **Feener CA, Boyce FM, Kunkel LM.** Rapid detection of CA polymorphisms in cloned DNA: Application to the 5' region of the dystrophin gene. *Am J Hum Genet* 1991; 48:621-627.
 61. **Hamada H, Petrino MG, Kakunaga T, Seidman M, Stollar BD.** Characterization of genomic poly (dT.dG) poly (dC.dA) sequences, structure, organization, and conformation. *Mol Cell Biol* 1984; 4:2610-2621.
 62. **Weber JL, May P.** Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 1989; 44:388-396.
 63. **Clemens PR, Fenwick RG, Chamberlain JS, Gibbs RA, Andrade M de, Chakraborty R Caskey CT.** Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy families, using dinucleotide repeat polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1991; 49:951-960.
 64. **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(4): 391-397.
 65. **Miller M, Boehm C, Cotton M, Kazazian H.** Usefulness of a CACA repeat polymorphism in genotype assignments in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Am J Med Gen* 1992; 44:473-476
 66. **Baranzini SE, Giliberto F, Dalamon V, Barreiro V, García Erro M, Grippo J, Szijan I.** Carrier detection in Duchenne and Becker muscular dystrophy in argentine families. *Clin Genet* 1998; 54(6):503-511.
 67. **Christodoulou K, Ioannou P, Middleton L.** Molecular Genetic detection of Xp21 muscular dystrophy carriers in Cyprus. *Biomed Pharmacother* 1994; 48(8-9):355-358.
 68. **Ausubel FM, Brent R, Kingston R, Moore DD, Seidman JG, Smith J, Struhl K.** Preparation of genomic DNA. Phenol extraction and concentration of DNA from aqueous solutions. In: *Short protocols in Molecular Biology. A compendium of methods from current protocols in molecular biology.* Ed. Reene Publishing associates and Willey-Interscience. 1989.
 69. **Miller A, Dykes DD, Polesky HF.** A simple salting out procedure+- for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acid Res* 1988; 16(3):1215.

-
70. **Santos FR, Pena SD, Epplen JT.** Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum Genet* 1993; 90(6):655-656
71. **González-Ferrer S, Pineda-Del Villar L, Brito-Brito J, Prieto-Carrasquero M, Rojas-Atencio A, Angarita-Ávila L, Mena-González JC, Mena-González R, Bermúdez J, Martínez-Basalo MC.** Enfermedades hereditarias y malformaciones congénitas en la Unidad de Genética Médica de la Universidad del Zulia. Años: 1983-1992. *Invest Clín* 1995; 36(2):47-60.
72. **Hu X, Ray PN, Murphy EG, Thompson MW, Worton RG.** Duplicational mutation at the Duchenne Muscular Dystrophy locus: Its frequency, distribution, origin and phenotype-genotype correlation. *Am J Hum Genet* 1990; 46: 682-695.