

# Implementación de la Prueba del Multiplex PCR para el Gen DMD en Pacientes con sospecha de Distrofia Muscular de Duchenne/Becker y la identificación de una delección de los exones 48-51

Establishment of the Multiplex PCR test for the DMD gene in patients with suspicion of Duchenne/Becker muscular dystrophy and the identification of a deletion of exons 48-51

Diana Rojas<sup>1</sup>, María Elizabeth Narvaja<sup>2</sup>, Luis Rivas<sup>3</sup>, Maria Luisa Guevara-Fujita<sup>4</sup>, Carlos Castañeda<sup>5</sup> y Ricardo Fujita<sup>6</sup>

## RESUMEN

**Objetivo:** Estandarizar la prueba del Multiplex PCR para identificar las delecciones más frecuentes que incluye nueve exones: 45, 48, 19, 17, 51, 8, 12, 44 y 4 del gen DMD cuyas mutaciones producen las distrofias musculares de Duchenne y de Becker.

**Material y método:** La prueba fue realizada con 9 individuos, usando DNA obtenido de sangre periférica. De ellos, incluyendo 2 hermanos, tenían diagnóstico clínico de distrofia muscular compatible con DMD. Nueve pares de primers de los exones mencionados se usaron simultáneamente en una amplificación PCR y analizados por geles de agarosa y acrilamida. Uno de los pacientes (DMD-1) tenía diagnóstico molecular de delección del exón 45 (control positivo) y 5 controles sanos (controles negativos).

**Resultados:** Los controles normales mostraron segmentos normales del tamaño esperado de los 9 exones luego de la amplificación PCR. El paciente DMD-1, evidenció la delección del exón 45 (control positivo). Uno de los pacientes (DMD-3) presentó una nueva delección que incluyó los exones 48 a 51, el resultado fue replicado en su hermano (también afectado con DMD).

**Conclusiones:** Se optimizó la prueba de Multiplex-PCR del gen DMD. Esto nos permite contar con una prueba para discernir gran número de pacientes con distrofia y determinar si tienen DMD/DMB. Uno de los pacientes mostró una mutación consistente en la delección de los exones 48 a 51 que fué corroborada en su hermano afectado con distrofia. (Rev Horiz Med 2012; 12(3): 6-13)

**Palabras clave:** Distrofia Muscular, Duchenne, Becker, Multiplex PCR, delección, exón.

## ABSTRACT

**Objective:** To establish the Multiplex PCR test to identify the most frequent mutations caused by deletions that include DMD gene exons 45, 48, 19, 17, 51, 8, 12, 44 and 4 causing Duchenne and Becker dystrophies (DMD/BMD).

**Material and methods:** The test was performed in DNA obtained from peripheral blood of 9 individuals, four of them (including 2 brothers) patients clinically diagnosed with muscular dystrophies compatible DMD. Nine pair of primers corresponding to the above mentioned exons were used simultaneously for PCR amplification and analyzed in agarose and polyacrilamide gel electrophoresis. One of the patients (DMD-1) used as positive control, had a previous molecular diagnosis with a deletion of exon 45.

**Results:** Normal controls showed the expected size for the 9 segments amplified by PCR. The study of the sample of patient DMD-1 with previous molecular diagnosis corroborated the lack of the band corresponding to exon 45. One of the patients (DMD-3) evidenced a new deletion spanning exons 48 to 51, that mutation was also replicated in his dystrophic brother.

**Conclusions:** We have established the Multiplex-PCR test for the DMD gene. This will enable us to have a system for the serial screening of patients suspected of Duchenne or Becker muscular dystrophy. One of the patients showed a deletion comprising exons 48 to 51, mutation corroborated in his afflicted dystrophic brother. (Rev Horiz Med 2012; 12(3): 6-13)

**Key Words:** Muscular Dystrophy, Duchenne, Becker, Multiplex PCR, deletion, exon.

<sup>1</sup> Bióloga Genetista, Asistente, Centro de Genética y Biología Molecular (CGBM). FMH-USMP.

<sup>2</sup> Estudiante de Medicina USMP (Internado).

<sup>3</sup> Médico Cirujano, egresado de la FMH-USMP.

<sup>4</sup> Doctor en Ciencias, Docente Investigador, CGBM, FMH, USMP.

<sup>5</sup> Doctor en Medicina, Neurólogo, Clínica El Golf, Lima. Presidente Consejo Científico Asociación de Distrofia Muscular del Perú

<sup>6</sup> Ph.D., Docente Investigador, Director del CGBM, FMH-USMP. Vice-presidente Consejo Científico Asociación de Distrofia Muscular del Perú.

## INTRODUCCIÓN

Las distrofias musculares (DM) son enfermedades hereditarias caracterizadas por la debilidad muscular progresiva y pérdida del tejido muscular. Afectan a 1 de cada 600 personas.

Constituyen alrededor de 30 patologías distinguibles por los patrones de distribución corporal, tipo de herencia, evolución, pronóstico, síndromes asociados y, principalmente, determinadas por el gen mutado responsable de la enfermedad. Es necesario identificar la distrofia porque, además de su diferente evolución, cada una de estas enfermedades responden de manera distinta a los tratamientos. Conocer el gen y las mutaciones permiten diseñar estrategias para corregir o sobrelevar la enfermedad.

Hay distrofias que producen cardiomiopatías y necesitarán marcapasos como la de Emery-Dreifuss; otras necesitarán vigilancia por el riesgo de cataratas, como en la distrofia miotónica. Conocer el pronóstico, prepara a la familia para implementar estrategias que optimicen la calidad de vida de los pacientes, con seguimiento fisioterapéutico y cirugías correctivas necesarias en diferentes etapas del desarrollo de la enfermedad.

Las DM, también se diferencian en respuestas a fármacos como algunos corticoesteroides que disminuyen la progresión y promueven la estabilización de la función muscular en la distrofia de Duchenne, que no tienen ese efecto en otras distrofias.

Los avances científicos han permitido otros tratamientos derivados del estudio molecular de estas enfermedades, incluyendo las terapias basadas en la genética: terapia génica de reemplazo, RNA antisentido, *exon skipping*, gentamicina en codones de pare, células madre entre otras, revisado por Goyenville et al (1).

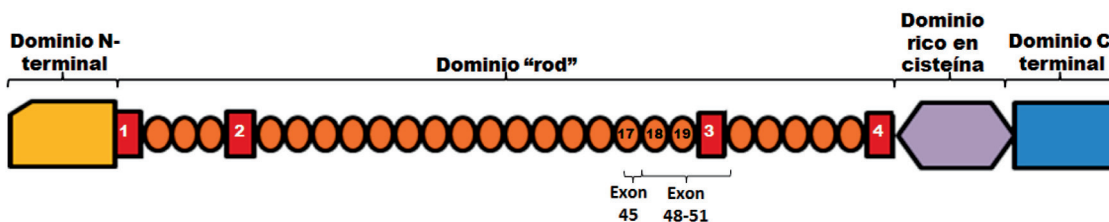
De todas las distrofias musculares, la de Duchenne (DMD) es la más común; afecta a uno de cada 3,500 varones nacidos vivos (2,3).

Se caracteriza por debilidad y adelgazamiento muscular progresivos en la infancia, pérdida de la capacidad de caminar

al final de la primera década de vida y muerte en el transcurso de la segunda década relacionada con cardiomiopatía y complicaciones respiratorias (3-6). La distrofia muscular de Becker (DMB), menos frecuente, afecta a uno de cada 18,000 varones nacidos vivos (7) y se caracteriza por una progresión más lenta y mayor supervivencia de 5 ó 6 décadas (8,9). Estos dos tipos clínicamente distintos de DM, son causados por mutaciones en el mismo gen *DMD* (*nomenclatura del gen en itálicas*), localizado en el brazo corto del cromosoma X (en la región Xp21). *DMD* es uno de los genes más grandes del genoma, con una secuencia codificante en músculo de 13,993 nucleótidos de sus 79 exones distribuidos en 2'220, 223 nucleótidos de DNA genómico (10).

Además de la forma muscular, hay varias isoformas de transcritos con diferentes exones, promotores y sitios poliA, que son específicos de tejidos del cerebro, cerebelo, retina, riñón, etc, aunque también hay transcritos que son ubicuos (4,10). *DMD* codifica la proteína distrofina, que en la fibra muscular (específicamente forma M-distrofina) enlaza físicamente la actina del sarcoplasma a proteínas asociadas al sarcolema y a la matriz extracelular. Esto tiene por objeto proteger las células musculares del daño mecánico en la contracción (11).

En los vertebrados, la distrofina se encuentra principalmente en músculos esqueléticos, cardíaco y liso (12,13). Esta proteína está constituida por 3,685 aminoácidos y presenta cuatro dominios: El dominio N-terminal, que se une a la F-actina; el segundo dominio "rod", consta de una serie de 24 repeticiones de 109 aminoácidos, las cuales adquieren una conformación de estructura helicoidal triple, que se asocian a la actina. Las repeticiones están interrumpidas por regiones ricas en prolina (región H o hinge/bisagra), que le añaden flexibilidad a la molécula, actuando como bisagras moleculares. El tercer dominio es rico en cisteína y se asocia a distroglicano, proteína anclada que atraviesa la membrana celular. El último dominio, C-terminal, consta de 400 aminoácidos y tiene por función formar un complejo con glicoproteínas del lado sarcoplásmico o que atraviesan la membrana (14,15) (Figura 1).



**Figura 1:**

Esquema de la proteína distrofina, indicando los 4 dominios y las regiones H (bisagra).

Cabe mencionar que una mutación en alguna de estas proteínas que interactúan con la distrofina, son también causa de diferentes tipos de distrofias musculares aunque de menor frecuencia en la población.

La mayoría de las mutaciones en *DMD*, son intragénicas: deleciones (~60%), duplicaciones (~20%) y otras que incluyen las mutaciones puntuales (~10%) (16).

Estas mutaciones alteran principalmente la estructura y también la expresión de la proteína distrofina y, dependiendo de su tipo y posición, determinan la capacidad funcional remanente, dando lugar a diferentes rangos de severidad en el fenotipo de DMD o DMB. Así, la deleción de una base puede producir una severa DMD, mientras que la eliminación de varios exones puede producir una DMB leve.

A pesar de que la DMD afecta principalmente a varones, por tener carácter recesivo y ser ligada al cromosoma X, también se ha descrito el fenotipo DMD grave en mujeres, originado por diferentes mecanismos (17-22). Entre los más probables, una translocación del cromosoma X con un autosoma, o la pérdida de uno de los cromosomas X en algunos tejidos (monosomía en mosaicismo) (23). Por ello, la sospecha de DMD en una mujer, debe confirmarse con pruebas citogenéticas.

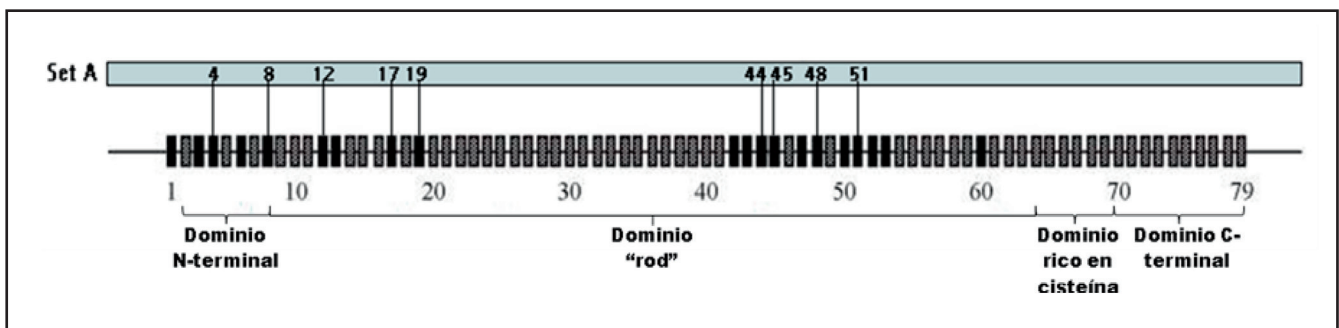
La mayoría de mutaciones en el gen *DMD*, no están distribuidas aleatoriamente y proporcionadamente a lo largo del gen. La literatura indica, más bien, que la mayor parte de casos de mutaciones que causan DMD y DMB, recurren en unas pocas regiones de alta mutabilidad, conocidas también como "puntos

calientes de mutación" (*hot-spots*) (10,24). La recurrencia se da por deleciones o duplicaciones, en un número pequeño de exones involucrados de estos hotspots, que ha permitido plantear la estrategia de la amplificación "multiplex PCR". Esta estrategia implica la observación simultánea de los exones más comúnmente deletados en pacientes varones (por su hemigiosis) con DMD/DMB (23,24). La variante de PCR multiplex más utilizada, es la de Chamberlain-1990, que amplifica nueve exones 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 48 y 51 (ver Fig.2) y detecta aproximadamente 80% de las deleciones en los pacientes (23).

Un segundo set para amplificar otros nueve exones (set de Beggs), fue propuesto con el set de Chamberlain, que detectan juntos hasta el 98% de deleciones (24). Por su relativa facilidad y eficiencia, la técnica del múltiplex PCR sigue teniendo un gran uso en el diagnóstico, y los resultados varían según las poblaciones estudiadas. En Latinoamérica: México (25), Colombia (26), Brasil (27), Argentina (28), Venezuela (29), entre otros, reportan las deleciones en las poblaciones estudiadas y se observa una variación entre las poblaciones, siendo de 87.5, 37, 32 y 31% para Brasil, Venezuela, Argentina y Colombia, respectivamente.

En el presente trabajo, presentamos los avances para establecer, en nuestro laboratorio la amplificación multiplex del set de Chamberlain, teniendo como finalidad realizar screenings en pacientes con distrofias musculares.

Modificado de *Multiplex PCR for Identifying DMD Gene Deletions*. Current Protocols in Human Genetics (2006).



**Figura 2:**

Diagrama esquemático del gen *DMD* mostrando las localizaciones relativas de los exones amplificados por el Set A (Chamberlain, 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 48 y 51) considerados los más comunes en deleciones. Los corchetes indican los exones involucrados en la expresión de los diferentes dominios de la proteína distrofina. Las líneas verticales señalan su localización relativa (no está a escala).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Participantes

La prueba fue realizada en 5 individuos sanos (controles negativos), y 4 pacientes diagnosticados clínicamente con distrofia muscular, con síntomas y signos compatibles con DM, uno de ellos (paciente DMD-1) con un diagnóstico previo de delección del exón 45 del gen DMD (control positivo). Uno de los pacientes, tiene un hermano afectado también con DM (DMD-3 y DMD-5).

A cada paciente se le extrajo 3mL de sangre periférica en tubos con anticoagulante EDTA y previa firma de un Consentimiento Informado aprobado por el Comité de Ética de la USMP.

### Análisis Molecular

El ADN genómico fue extraído de las muestras sanguíneas y procesado según el método de "salting-out" (30) con algunas modificaciones: las células son lisadas y tratadas

con proteinasa K (20mg/ml) a 55°C por 12 horas. Luego, se amplificó por multiplex-PCR, utilizando el termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems), 9 exones con los pares de cebadores diseñados por Chamberlain et al. (23). Las regiones amplificadas corresponden a los exones 45, 48, 19, 17, 51, 8, 12, 44 y 4. La secuencia de los cebadores empleados se detalla en la Tabla N°1 y en la Figura 2.

Las condiciones finales de amplificación fueron: 1X Buffer PCR, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.8mM de cada dNTPs, 0.5mm de cada cebador, 250ng de ADN, 0.05U Taq polimerasa.

El perfil térmico utilizado fue: 94°C por 6 minutos, 25 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos y 65°C por 4 minutos, con una extensión final de 65°C por 7 minutos.

Los productos amplificados se verificaron en un minigel de agarosa al 2.5% (Amplisize Agarosa BIORAD) que se tiñó con bromuro de etidio. Los resultados se analizaron sobre un transiluminador y se obtuvo una impresión fotográfica.

**Tabla 1:**  
Set de cebadores PCR utilizados para el diagnóstico

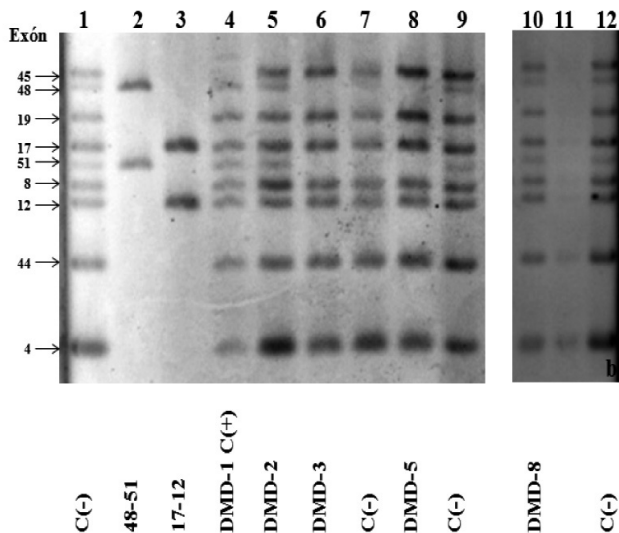
Exón	Secuencia cebador	Tamaño producto (pb)
<b>45</b>	F: 5'AAACATGGAACATCCTTGTGGGGAC3' R:3'CATTCTATTAGATCTGTCGCCCTAC5'	547
<b>48</b>	F:5'TTGAATACQTTGGTTAAATCCCAACATG3' R:3'CCTGAATAAAGTCTTCCTTACCACAC5'	506
<b>19</b>	F:5'GATGGCAAAAGTGTTGAGAAAAAGTC3' R:3'TTCTACCACATCCCATTTCTTCCA5	459
<b>17</b>	F:5'GACTTTCGATGTTGAGATTACTTTCCC3' R:3'AAGCTTGAGATGCTCTCACCTTTCC5'	416
<b>51</b>	F:5'GAAATTGGCTCTTAGCTTGTGTTTC3' R:3'GGAGAGTAAAGTGATTGGTGGAAAATC5'	388
<b>8</b>	F:5'GTCCTTTACACACTTTACCTGTTGAG3' R:3'GTCCTTTACACACTTTACCTGTTGAG5'	360
<b>12</b>	F:5'GATAGTGGGCTTTACTTACATCCTTC3' R:3'GAAAGCACGCAACATAAGATACACCT5'	331
<b>44</b>	F:5'CTTGATCCATATGCTTTTACCTGCA3' R:3'TCCATCACCTTCAGAACCTGATCT5	268
<b>4</b>	F:5'TTGTCGGTCTCTGCTGGTCAGTG3' R:3'CAAAGCCCTCACTCAAACATGAAGC5'	196

## RESULTADOS

Los 5 individuos controles negativos (sanos) presentaron las 9 bandas, correspondientes a los 9 exones, que normalmente amplifican en ausencia de delección.

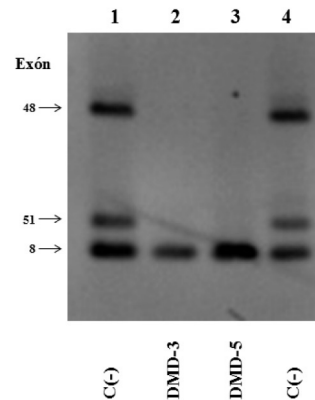
De los 4 pacientes diagnosticados clínicamente con DMD, se confirmó en el paciente DMD-1 (control positivo) la delección del exón 45. En los pacientes DMD-3 y DMD-5 (hermanos), se detecta delección del exón 48 y el 51, por lo que se infiere una pérdida de una región del gen que incluye al menos estos exones (Tabla 2).

En DMD-2 no se presentó alguna delección en los exones estudiados, figura 3 y 4, respectivamente.



**Figura 3:**

Amplificación multiplex PCR según protocolo de Chamberlain et al, 1990 (9 exones simultáneamente) en controles y pacientes. Gel de agarosa 2.5%. Carril 1-7-9: Controles normales. Carril 2: amplificados del exón 48 y 51 en individuos normales. Carril 3: amplificados del exón 17 y 12 en individuos normales. Carril 4: Control positivo (DMD-1) paciente con DMD previamente diagnosticado molecularmente con delección del exón 45. Carril 5-6-8: pacientes varones diagnosticados clínicamente con DMD, pacientes en carriles 6 (DMD-3) y 8 (DMD-5); hermanos con delección de exones 48 y 51; paciente en carril 5 (DMD-2) no presenta delección aparente con este protocolo.



**Figura 4:**

Corroboración de delección de exones 48 y 51 en pacientes DMD-3 y DMD-5 (hermanos) en carriles 2 y 3. Carril 1 y 4: Controles normales.

Para confirmar la delección de los pacientes DMD-3 y DMD-5, se amplificaron sólo los exones 48 y 50, junto con una banda control, correspondiente al exón 8 (Figura 4).

**Tabla N°2 Resultados de la detección de delecciones en el gen de la distrofina en pacientes con DMD**

Paciente	Sexo	Delección de exón
DMD-1	M	45*
DMD-2	M	s/d
DMD-3	M	48-51
DMD-5	M	48-51

M: masculina, s/d: sin delección, \*: confirmación de la delección.

## DISCUSIÓN

Las distintas formas de distrofias musculares, muestran gran variabilidad en severidad, edad de inicio, progresión de los signos y síntomas, e incluso edad de sobrevivencia. Es importante saber que el pronóstico, tratamiento y seguimiento del paciente también será específico, de acuerdo al gen involucrado y a la mutación. La identificación de mutaciones, mediante la biología molecular, permitirá asignar inequívocamente el estatus de la DMD, diferenciándola de otras distrofias y enfermedades neuromusculares de evolución semejante, sobre todo en sus etapas iniciales. Debido a la comparación entre la severidad de la enfermedad con relación a las mutaciones del gen DMD, se han confeccionado paneles genotipo-fenotipo, donde se puede pronosticar la evolución de la enfermedad de acuerdo a una mutación particular. Por ese motivo, proponemos la optimización de la técnica Multiplex

PCR, para la detección de delecciones en el gen DMD, a fin de realizar un diagnóstico genético-molecular, importante no sólo para el paciente, sino que involucra también a la familia.

Debido a la escasa información sobre las enfermedades neuromusculares en nuestro país, el neurólogo usualmente observa la evolución del cuadro por mucho tiempo, antes de tentar un diagnóstico definitivo. Las pruebas genéticas son de suma importancia para la gestión y asesoramiento de estas enfermedades, debido a que los pronósticos y tratamientos varían según su origen. A falta del examen genético que corrobore la causa primaria de la enfermedad, generalmente se evalúan enzimas musculares, electromiograma y se hace una biopsia muscular, quedando en el diagnóstico indeterminado de distrofia muscular. Este lapso retrasa o impide tratamientos, mejoras en calidad de vida a tiempo y, frecuentemente, el paciente queda sin enfermedad identificada o, contrariamente, vive con un diagnóstico equivocado.

Las distrofinopatías son trastornos genéticos causados por mutaciones en el gen *DMD*. Globalmente, hay un individuo con distrofia muscular por cada 600 personas, por lo que en un país de 30 millones debe haber alrededor de 50,000 personas afectadas. Sin embargo, el tamizaje molecular de los genes responsables de estas enfermedades, no se realiza en la gran mayoría de casos por desconocimiento. La distrofia de Duchenne y la de Becker (DMD/DMB) es la enfermedad neuromuscular más común, con una frecuencia de 1 en 4000 personas (cerca de 7500 personas en Perú). Por ello, es importante contar con tecnologías que permitan discriminar enfermedades para ayudar en el diagnóstico y pronóstico de los pacientes. Además, se pueden sugerir las terapias más adecuadas para los pacientes y el apoyo psicológico necesario tanto a los pacientes como a sus familias. Debido a su patrón de herencia ligado al X, es mucho más frecuente en varones, aunque también se han descrito casos de niñas afectadas (17-22).

Debido a la alta variedad de tipos de distrofias, y las distintas estrategias que dependen de identificar exactamente la enfermedad, es importante establecer técnicas de diagnóstico molecular para determinar, inequívocamente, estas enfermedades neuromusculares de origen genético. Cabe notar que, como la mutación es la misma desde la concepción hasta el final de la vida, el estudio genético se realiza una sola vez, a diferencia de otros análisis de laboratorio, que varían según la edad y metabolismo. Además, la obtención de muestra es relativamente accesible en comparación con las biopsias, ya que cualquier tejido servirá para el análisis, generalmente sangre periférica o incluso frotis bucal.

La optimización de la prueba de multiplex PCR se realizó sa-

tisfactoriamente en nuestro Centro. La estrategia de Multiplex PCR del gen *DMD*, se realiza por la amplificación vía PCR de dos regiones *hot spots* de delecciones recurrentes en el gen, y que corresponden a los exones 2 al 20 y 44 al 53 (24,32). El análisis por esta técnica tiene muchas ventajas sobre otras técnicas tradicionalmente usadas en el diagnóstico genético de DMD como las basadas en la técnica del Southern Blot en relación al tiempo y costo principalmente. La detección de delecciones provee información para asesoramiento genético para el 65% de los pacientes DMD/DMB con delecciones y la probabilidad se puede aumentar dependiendo del set de iniciadores usados. Para otros casos, es necesario un análisis de ligamiento usando marcadores polimórficos, MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) o secuenciamiento directo.

El Multiplex-PCR, tiene como ventajas la rapidez y confiabilidad de los resultados. Además, permite el asesoramiento apropiado a los pacientes, que en conjunto con los estudios clínicos, bioquímicos y electromiográficos, establecen un diagnóstico específico. Una limitación del Multiplex-PCR, es que no puede ser utilizada para la detección en heterocigosis (mujeres portadoras), en duplicaciones que son relativamente frecuentes, o mutaciones pequeñas de uno o pocos nucleótidos. Para heterocigosis y duplicaciones se usa la MLPA, que también detecta delecciones. Para mutaciones pequeñas de uno o pocos nucleótidos se usa el secuenciamiento.

A veces, la búsqueda de mutaciones en *DMD* falla posiblemente porque el gen es inmenso (2.2 MB genómico y 14 kb transcrito). Entonces, hay zonas no cubiertas por las técnicas de Multiplex-PCR (solo algunos exones), MLPA o secuenciación directa (generalmente sólo los exones) es necesario hacer un análisis de ligamiento para corroborar que el gen mutado es DMD cuando se dispone de varias personas afectadas y portadoras.

En nuestro laboratorio, el ensayo Multiplex-PCR ha resultado en la detección de mutaciones, como era esperado en el control positivo, como es el caso del paciente DMD-1 que tiene una delección del exón 45. De 2 probandos, cuya mutación no conocemos previamente, hemos detectado una mutación en el paciente DMD-3, que es una gran mutación que involucra la pérdida desde el exón 48 hasta el exón 51. Esta delección dio lugar a una proteína de menor tamaño (376-377kDa) en comparación con la expresada normalmente, 400kDa. Esta mutación debe eliminar los aminoácidos correspondientes a las repeticiones 18 y 19 así como la bisagra #3 del dominio proteico "rod" de la distrofina. Este paciente tiene un hermano (DMD-5) también con diagnóstico clínico de distrofia muscular compatible con DMD y la mutación estaba también presente.

La mutación que involucra los exones 48-51 fue reportada en Egipto en siete pacientes con DMD y dos pacientes con fenotipo intermedio menos severo DMD/DMB (31). En el caso del paciente DMD-1 el estado de avance de su distrofia es bastante severo correspondiendo más bien a fenotipo DMD que al fenotipo intermedio DMD/DMB.

Un paciente: DMD-2, compatible clínicamente con DMD, no tuvo un resultado positivo, es decir; no se le detectó mutación. Ello puede deberse a varias causas: 1) que no sea una mutación en el gen *DMD*, 2) que no sea una delección detectada en este set, y que involucre otros exones, 3) que sea una duplicación que no es detectada por esta técnica o que sea una mutación muy pequeña que involucre uno o pocos nucleótidos.

Conociendo estos aspectos, estamos pendientes de desarrollar e implementar en nuestro Centro más alternativas que complementen la detección de alteraciones en el gen a estudiar (ej: MLPA y secuenciación directa). Aquí, reportamos la implementación del Multiplex-PCR para ayudar a la comunidad en la detección de casos de enfermedades neuromusculares, permitiendo un diagnóstico más certero y orientando la terapia y tratamiento más adecuados. Es importante recalcar, que es nuestra intención caracterizar exactamente la mutación específica de cada paciente para preparar a la población peruana para la transferencia de tecnología de las terapias basadas en genética.

En conclusión, hemos estandarizado la técnica de Multiplex PCR para el diagnóstico de DMD/DMB, utilizando un set de cebadores que permite detectar la delección de 9 de los 79 exones que conforman este gen (65% de casos de delección). En una prueba con 4 pacientes de distrofia muscular, nos ha permitido identificar un nuevo caso que corresponde a la delección de los exones 48-51.

### Agradecimiento

A las familias que permitieron obtener las muestras usadas en este trabajo. Igualmente, agradecemos la participación y coordinación de la Asociación de Distrofia Muscular del Perú (ADM Perú) en especial al Sr. Luis Miguel del Águila Umeres. Al Decano, Dr. Frank Lizaraso Caparó y al Director de Investigación Dr. Benjamín Castañeda Castañeda, de la Facultad de Medicina de la USMP, por su constante apoyo.

### Correspondencia:

Ricardo Fujita  
Dirección: Av. Alameda Del Corregidor cuadra 15  
La Molina, Lima-Perú  
Teléfono: 3652300  
Correo electrónico: rfujita@usmp.edu.pe

Recibido: 4 de junio 2012  
Aceptado: 2 de agosto 2012

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Goyenvalle A, Seto JT, Davies KE and Chamberlain J. Therapeutic approaches to muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 2011: R1-R10. doi:10.1093/hmg/ddr105
2. Maheshwari M, Vijaya R, Kabra M, Arora S, Shastri, SS, Deka D, Kripiani A. and Menon P. Prenatal diagnosis of duchenne muscular dystrophy. *Natl. Med. J. India* 2000; 13 (3): 129-131.
3. Emery AEH. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases: a world survey. *Neuromuscul. Disord* 1991; 1: 19-29.
4. Kenneth L. Origins and early description of Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 2003; 28: 402-422.
5. Darras BT. Molecular genetics of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *J Pediatr* 1990; 117: 1-15.
6. Lai PS, Takeshima Y, Adachi K, et al. Comparative studies on deletions of the dystrophin gene in three Asian populations. *J Hum Genet* 2002; 47: 552-555.
7. Bushby KM, Thambyayah M and Gardner-Medwin, D. Prevalence and incidence of Becker muscular dystrophy. *Lancet* 1991; 337: 1022-1024.
8. Becker PE, Kiener F. Eine neue x-chromosomale Muskeldystrophie. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten Berlin* 1995; 193: 427-448.
9. Becker PE. Neue Ergebnisse der Genetik der Muskeldystrophien. *Acta Gen Stat Med* 1957; 7: 303-310.
10. Den Dunnen JT, GrootScholten PM, Bakker E, Blonden LAJ, Ginjaar HB, Wapenaar MC, Paassen H, Broeckhoven C, Pearson P and Ommen G. Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and eDNA analysis

- pf 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *Am. J. Hum. Genet* 1989; 45: 835-847.
11. Lapidos K, Kakkar R, McNally E. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res* 2004; 94: 1023-31.
  12. Boland B, Silbert P, Groover R, Wollan P, Silverstein M. Skeletal, cardiac, and smooth muscle failure in Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Neurol* 1996; 14 (1): 7-12.
  13. Tennynson CN, Klamut HJ, Worton RG. The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is co-transcriptionally spliced. *Nat Genet* 1995; 9 (2):184-190.
  14. Anderson MS, Kunkel LM. The molecular and biochemical basis of Duchenne muscular dystrophy. *Trends Biochem Sci* 1992; 17:289-92.
  15. Sciandra F, Bozzi M, Bianchi M, Pavoni E, Giardina B, Brancaccio A. Dystroglycan and muscular dystrophies related to the dystrophin-glycoprotein Complex. *Ann Ist Super Sanita* 2003; 39:173-81.
  16. DMD Genetic Therapy Group, Leiden muscular dystrophy pages. Consultado en: <http://www.dmd.nl>.
  17. Azofeifa J, Voit T, Hubner C, Cremer M. 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* 1995; 96: 167-76.
  18. Verellen-Dumoulin C, Freund M, De Meyer R, Laterre C, Frederic J, Thompson, M.W., et al. Expression of an X-linked muscular dystrophy in a female due to translocation involving Xp21 and non-random inactivation of the normal X chromosome. *Hum Genet* 1984; 67: 115-9.
  19. Chelly J, Marlhens F, Le Marec B, Jeanpierre M, Lambert M, Hamard G, et al. De novo DNA microdeletion in a girl with Turner Syndrome and Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet* 1986; 74: 193-6.
  20. Quan F, Janas J, Toth-Fejel S, Johnson DB, Wolford JK, Popovich BW. Uniparental disomy of the entire X chromosome in a female with Duchenne muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 1997; 69: 160-5.
  21. Katayama Y, Tran VK, Hoan NT, Zhang Z, Goji K, Yagi M, et al. Co-occurrence of mutations in both dystrophin and androgen-receptor genes is a novel cause of female Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet* 2006; 119: 516-9.
  22. Fujii K, Minami N, Hayashi Y, Nishino I, Nonaka I, Tanabe Y, et al. Homozygous female Becker muscular dystrophy. *Am J Med Genet* 2009; 149(A): 1052-5.
  23. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Caskev CT. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press. New York London 1990, pp 272-281.
  24. Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel L. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1990; 86: 45-48.
  25. González-Huerta NC, Hernández E, Arenas ML, Escobar RE, Miranda A, Leyva N. Identificación de las delecciones en el gen DMD mediante PCR múltiple en pacientes mexicanos con distrofia muscular de Duchenne/Becker. *Revista Médica del Hospital General de México* 2004; 67 (4): 196-202.
  26. Silva CT, Fonseca D, Restrepo CM, Contreras N, Mateu H. Delecciones en el gen de la distrofina en 62 familias colombianas: correlación genotipo-fenotipo para la distrofia muscular de Duchenne y Becker. *Colombia Médica* 2004; 35 (4): 191-198.
  27. Werneck LC, Scola RH, Maegawa GH, et al. Comparative analysis of PCR-deletion detection and immunohistochemistry in Brazilian Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. *Am J Med Genet* 2001; 103: 115-120.
  28. Baranzini SE, Giliberto F, Herrera M, et al. Deletion patterns in Argentine patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neurol Res* 1998; 20: 409-414.
  29. Delgado LW, Pineda-Del VL, Borjas L, et al. Molecular diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy in Venezuelan patients with the polymerase chain reaction. *Clin Invest* 1994; 35: 195-207.
  30. Miller S, Dykes D, Polesky F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Acid Nucl Res* 1988; 16(3): 1915.
  31. Elhawary N, Rabah Mohamad Shawky and Nemat Hashem. Frameshift Deletion Mechanism in Egyptian Duchenne and Becker Muscular Dystrophy Families. *Molecules and Cells* 2004, 18(2): 141-149.
  32. Marzece DM, Mampel A, Gomez LC, et al. Detection of deletions and duplications in the Duchenne muscular dystrophy gene by the molecular method MLPA in the first Argentine affected families. *Genetics and Molecular Research* 2008, 7(1):223-233.