

## **Diagnóstico molecular en pacientes venezolanos con Distrofia Muscular de Duchenne/Becker mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa.**

*Wülmer Delgado Luengo<sup>1</sup>, Lennie Pineda-Del Villar<sup>1</sup>, Lisbeth Borjas<sup>1</sup>, Héctor Pons<sup>2</sup>, A. Morales-M.<sup>1</sup> María Caridad Martínez Basalo<sup>1</sup> y H. Barrera Saldaña<sup>3</sup>.*

<sup>1</sup>Unidad de Genética Médica, <sup>2</sup>Centro de Cirugía Experimental Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

<sup>3</sup>Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genética, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México.

**Palabras claves:** Distrofia muscular de Duchenne, deleciones intragénicas, reacción en cadena de la polimerasa.

**Resumen.** Las distrofias musculares de Duchenne y Becker (DMD/BMD) son enfermedades neuromusculares recesivas ligadas a X producidas por mutaciones alélicas en el gen de la distrofina humana. Este estudio presenta los primeros resultados venezolanos en los que se realiza diagnóstico molecular de DMD/DMB mediante amplificación múltiple de los 14 exones más propensos a deleción dentro del gen. En 24 pacientes venezolanos, no relacionados, se encontró un 37,5 % de deleciones intragénicas y el 77,7% de ellas estuvo localizado en la región "caliente" comprendida desde el exón 44 al 55. Nuestra frecuencia de deleción es menor a la reportada en estudios en poblaciones europeas y norteamericanas y semejante a la de algunas poblaciones asiáticas. La baja frecuencia detectada en nuestros pacientes podría estar relacionada a la existencia de diferentes mutaciones en otras regiones del gen de la distrofina que determinan una heterogeneidad molecular en la etiología de la DMD/DMB en Venezuela.

*Recibido: 20-09-94. Aceptado: 24-01-95.*

## INTRODUCCION

La Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X, caracterizada por degeneración muscular progresiva, pérdida de la deambulación entre los 10 - 12 años y muerte, generalmente antes de los 20 años; su frecuencia es de 1:3500 varones nacidos vivos (14). La Distrofia Muscular de Becker (DMB) es una forma alélica menos severa y mucho más heterogénea en su fenotipo, con pérdida de la deambulación después de los 16 años y una frecuencia de 1:30.000 varones nacidos vivos (22). Algunos pacientes presentan un curso clínico entre DMD y DMB, con pérdida de la deambulación entre los 12 - 16 años, clasificada como forma Intermedia (7). En éste trabajo será designada con las siglas DMI.

Inicialmente el locus del gen de la DMD fué ubicado en el brazo corto (p) del cromosoma X (22,34) y posteriormente en la región Xp21 (1,15). Es el gen humano más largo conocido (2,5 Mb) (10,25), contiene más de 75 exones (24) y codifica para la proteína "Distrofina" (20, 29), cuya función precisa en el mantenimiento de la integridad del músculo es desconocida (17, 36). Hasta ahora, el análisis de transferencia de Southern utilizando sondas genómicas y de ADNc de 14 Kb, ha determinado que la mayoría de las mutaciones detectadas en este locus corresponden a deleciones intragénicas en el 43-70% de los casos

(4, 16, 18, 19, 23, 24, 31), y duplicaciones parciales en el 6 - 10%(21).

Recientemente, Chamberlain y col. (11), desarrollaron un método alternativo al procedimiento complejo de hibridización, mediante el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (R.C.P.) para detectar deleciones dentro del gen de la Distrofina. La detección del defecto molecular en DMD/DMB es de suma importancia para la identificación de mujeres portadoras y facilitar el diagnóstico prenatal en familias con ésta enfermedad.

El objetivo del presente estudio es presentar los primeros resultados venezolanos de la aplicación de la R.C.P. para el diagnóstico molecular de los pacientes con DMD atendidos en la Unidad de Genética Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

## MATERIAL Y METODOS

De 27 familias que consultaron a la Unidad de Genética Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia, en el lapso comprendido entre enero de 1983 hasta febrero de 1994, sólo se localizaron 24, no relacionadas y a través de un propósito. El diagnóstico de DMD/DMB/DMI, se hizo en base a: (a) Exámen Físico, (b) Edad a la cual dependieron de sillas de ruedas, (c) Niveles séricos de creatinquinasa (CK), y en los casos donde fué posible se practicó el estudio electromiográfico y biopsia muscular. El diag-

nóstico molecular se realizó utilizando los estuches de reacción de R.C.P. múltiple 9-plex y 5-plex, obtenidos del "Institute for Molecular Genetics" del Baylor College of Medicine, Houston-Texas, USA. Estos estuches contienen 9 y 5 pares de iniciadores respectivamente para la amplificación de los exones 4-8-12-17-19-44-45-48-50 y 13-43-50-52 y la región promotora muscular (PmF), los cuales corresponden a los exones más frecuentemente deletionados localizados a 500 y 1200 Kb a partir del extremo 5'(12). La amplificación de estos exones en el gen de la Distrofina por R.C.P. múltiple se realizó en dos fases: la primera fase con 9-plex, y la segunda con 5-plex. Esta última se aplicó a aquellos casos en los cuales no se detectaron deletiones por 9-plex o cuando se intentó determinar la extensión de la deletión identificada en la primera fase. A cada individuo se le tomaron 5 ml de sangre periférica, anticoagulada con EDTA, para la extracción de ADN por el método de Fenol-Sevag (3). A cada estuche de reacción se le añadieron 200 ng de ADN genómico y 5 unidades de Taq polimerasa, y el volumen de la reacción fue ajustado a 25  $\mu$ l con agua. El contenido del tubo fue mezclado suavemente y cubierto con una gota de aceite mineral; seguidamente se colocó en un Controlador Térmico programable PTC-100 de la MJ Research, Inc., con la programación sugerida por los proveedores para los estuches de 9-plex y 5-plex; finalmente se tomaron 10  $\mu$ l

del producto de la reacción y se colocaron en un gel de Agarosa que contenía 0,5 g/ml de bromuro de etidio y se procedió a la electroforesis a 3,7 V/cm por 3 horas en solución TBE 1x. Terminada la electroforesis se procedió al fotografiado y al análisis los resultados.

## RESULTADOS

De los 24 varones afectados, 21 fueron DMD, 2 DMB y 1 DMI. Entre los 24 afectados a 9 se les detectó deletiones intragénicas (37,5%) y de éstos, a 4, tanto con 9 como con 5-plex; 4 únicamente con 9-plex y 1 con 5-plex; no se detectaron deletiones en 15 pacientes (62,5%) (Tabla I). Todos los casos que presentaron deletión correspondieron a DMD. En la Fig. 1, se muestra en detalle la ubicación y probable extensión de las deletiones detectadas; dos casos mostraron deletión de un único exón (JV y AM) y dos deletiones de al menos cinco exones (RC y DZ). En el resto, las deletiones fueron de menor extensión. La Fig. 2, muestra los productos de amplificación con 9-plex: el paciente de la línea RC presentó deletión de los exones 45, 48 y 51; el de la línea JV del exón 44, el de la línea ET del exón 45 y el de la línea DZ de los exones 8-12-17-19; el resto de los pacientes no mostraron deletiones. La Fig. 3, muestra los productos de amplificación con 5-plex de los mismos pacientes: en la línea RC se aprecian deletiones de los exones 50-52; el paciente de la línea JV no exhibió

TABLA I

DELECCIONES DEL GEN DE LA DISTROFINA DETECTADAS CON 9 Y 5 PLEX EN PACIENTES CON DMD/DMB/DMI\*.  
UNIDAD DE GENETICA MEDICA, UNIVERSIDAD DEL ZULIA.  
MARACAIBO - VENEZUELA.

Caso	Fenotipo	9-PLEX	5-PLEX	No detectó
R.C.	DMD	45-48-51	50-52	-
J.V.	DMD	44	-	-
E.D.	DMD	-	-	*
A.A.	DMD	-	-	*
N.P.	DMD	-	-	*
E.T.	DMD	45	-	-
L.CH.	DMI	-	-	*
E.A.	DMD	-	-	*
D.Z.	DMD	8-12-17-	13	-
N.Q.	DMD	19	-	-
A.F.	DMD	4-8	-	*
Y.S.	DMD	-	50-52	-
G.S.	DMD	48-51	-	*
L.A.	DMD	-	-	*
N.C.	DMD	-	-	*
A.L.	DMD	-	50-52	-
R.M.	DMD	51	50	-
C.S.	DMD	-	-	*
J.C.	DMD	-	-	*
A.M.	DMD	-	-	-
R.S.	DMB	51	-	*
E.C.	DMD	-	-	*
D.D.	DMD	-	-	*
K.U.	DMB	-	-	*
Detección (%)		37,5		62,5

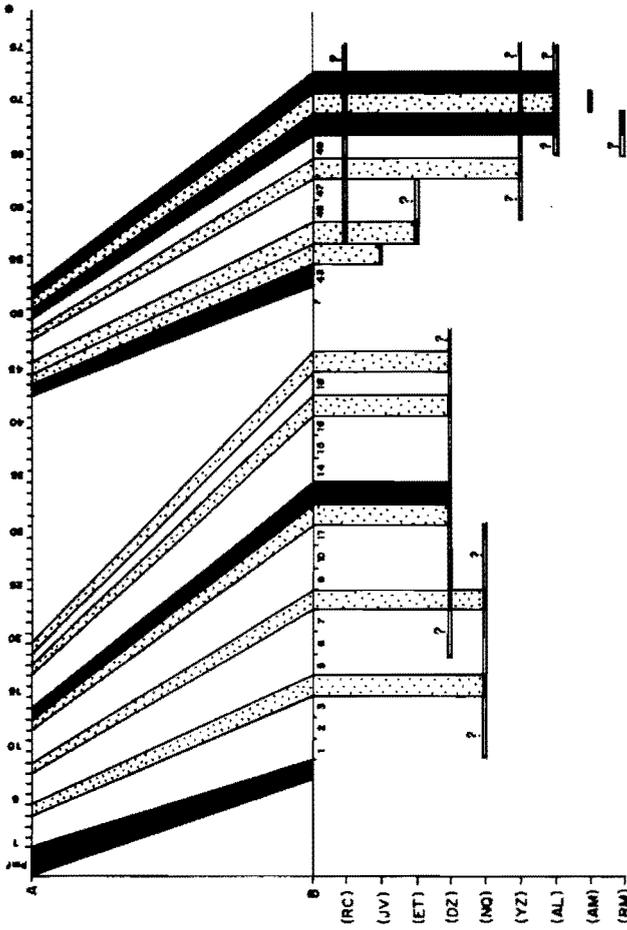
\*DMD = Distrofia Muscular de Duchenne.

DMB = Distrofia Muscular de Becker.

DMI = Distrofia Muscular Intermedia.

delección, el de la línea DZ mostró delección del exon 13 y el de la línea YS de los exones 50 y 52. Los pacientes restantes no presentaron delecciones con 5-plex. De las 9 dele-

ciones encontradas, 7(77,8%) se ubican en la región a 1200 Kb del extremo 5' del gen y 2(22,2%) se ubican a 500 Kb del extremo 5'.



Chamberlain, J.S., y col.

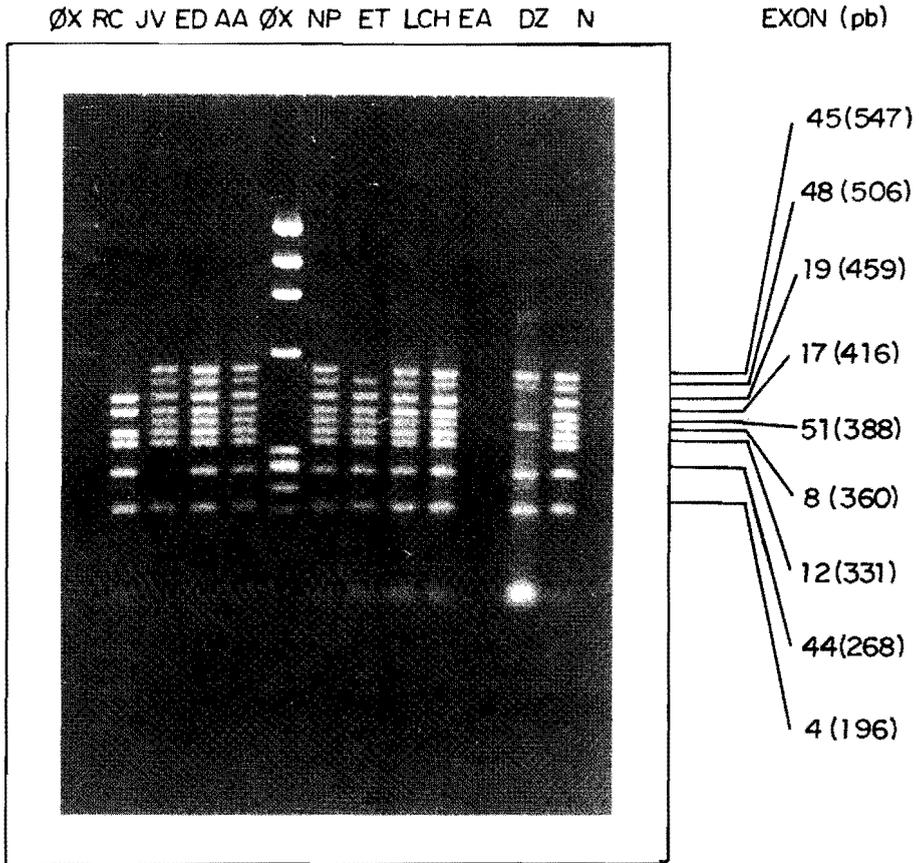
Exones estudiados con 5-Plex (Oscuro) y 9-Plex (Punteado).

A = Exones del gen de la distrofia y su promotor muscular (Pmf).

B = Exones deletados se indican con barras oscuras y punteadas.

Los espacios entre las deletaciones se suponen deletadas y las de los extremos se desconocen.

**Fig. 1.** Distribución de las deletaciones del Gen de la Distrofia en pacientes con Distrofia Muscular de Duchenne (DMD). Unidad de Genética Médica. LUZ. Maracaibo, Venezuela.



Productos de amplificación múltiple (9-Plex) del ADN genómico de 8 pacientes varones con DMD (RC, JV, ED, AA, NP, ET, LCH, EA).

Control varón normal (N).  $\phi$ X{Marcador de Peso Molecular, ADN  $\phi$ X 174 Hae III}.

Control varón afectado (DZ).

Los pacientes ED, AA, NP, LCH, EA no mostraron delección con 9-Plex.

Línea RC: exones 45-48-51 deleccionados.

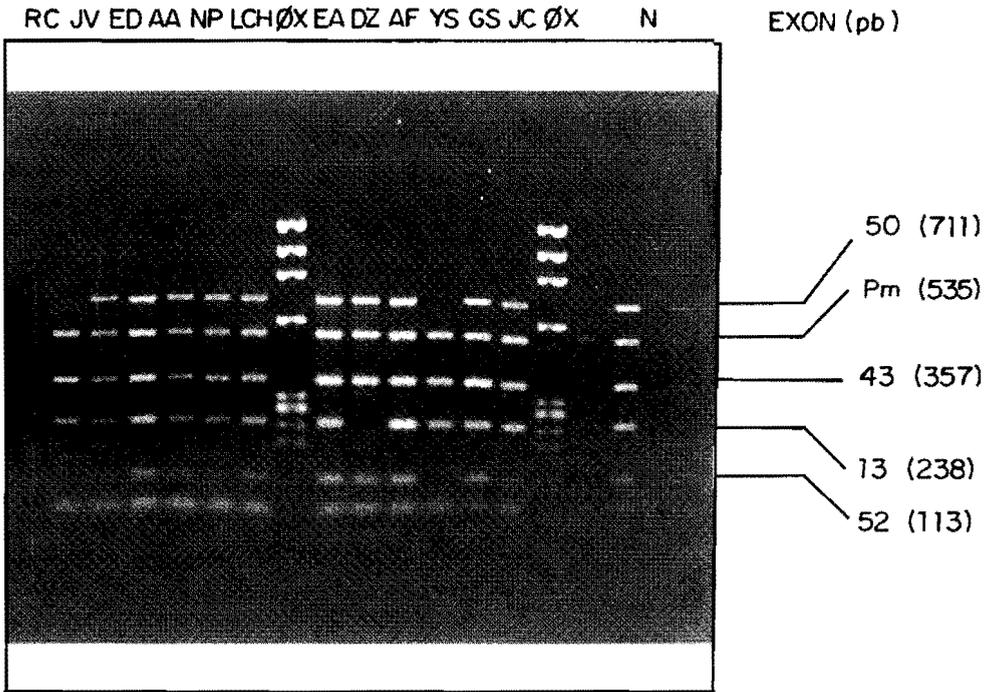
Línea JV: exón 44 deleccionado.

Línea ET: exón 45 deleccionado.

Línea DZ: exones 8-12-17-19 deleccionados.

DMD = Distrofia Muscular de Duchenne.

**Fig. 2.** Productos de amplificación con 9 Plex del gen de la Distrofina en pacientes con DMD. Unidad de Genética Médica. L.U.Z. Maracaibo, Venezuela.



Productos de amplificación múltiple (5-Plex) del ADN genómico de 12 pacientes varones con DMD (RC, JV, ED, AA, NP, LCH, EA, DZ, AF, YS, GS, JC).  
 Control varón normal (N).  $\phi$ X (Marcador de Peso Molecular, ADN  $\phi$ X 174 Hae III).  
 Los pacientes ED, AA, NP, EA, LCH, AF, GS, JC no mostraron deleción con 5-Plex.  
 Los pacientes RC, JV y DZ fueron estudiados con 9 y 5 Plex.  
 Línea RC: exones 50-52 delecionados.  
 Línea DZ: exón 13 delecionado.  
 Línea YS: exón 50-52 delecionado.  
 DMD = Distrofia Muscular de Duchenne.

**Fig. 3.** Productos de amplificación con 5 Plex del gen de la Distrofina en pacientes con DMD. Unidad de Genética Médica, L.U.Z. Maracaibo, Venezuela.

## DISCUSION

En diversas poblaciones analizadas, utilizando la técnica de Southern, la frecuencia de deleciones detectadas en el gen de la Distrofina se sitúa entre el 43 y 70% (6, 13, 16, 19, 27, 28, 30, 33).

Las frecuencias reportadas en diferentes poblaciones, utilizando R.C.P., varían en función del número de iniciadores utilizados y de la frecuencia poblacional de las distintas mutaciones dentro del gen, situándose entre el 37 y 99 % de las detectadas por la técnica de Southern.

En éste trabajo la frecuencia de deleción fué de 37,5% y ésta se encuentra en el rango inferior de las reportadas hasta ahora, correspondiendo las mayores frecuencias a poblaciones norteamericanas y europeas occidentales en las que oscila entre el 50 y 70% (5, 8, 11, 12, 26). Entre las poblaciones de menor frecuencia de deleción se encuentran las asiáticas, tales como China (32), Japón (33), e Israel (30), que con sondas de ADNc, se ha encontrado una frecuencia de 45, 42,8 y 37%, respectivamente. En Rusia (2), mediante R.C.P. multiple y ADNc, la frecuencia de deleción fué de 41%. Así mismo, en Latinoamérica, la única frecuencia reportada de análisis molecular con los mismos estuches de 9 y 5-plex, es de 52,5 % en población mexicana (9); y en la población brasileña, con sondas genómicas, la frecuencia es 42.6% (28).

La mayor similitud de la frecuencia encontrada en este estudio con poblaciones asiáticas es de difícil interpretación dada la diversidad de la extracción étnica de las poblaciones analizadas y la diferencia, en algunos casos, en la técnica utilizada para la detección de las deleciones dentro del gen de la Distrofina con respecto a la de este trabajo.

La frecuencia de deleción encontrada en nuestros pacientes, que de acuerdo con el lugar de nacimiento y los apellidos de sus abuelos, son de origen predominantemente venezolano (86%), podría estar relacionada con una contribución mongoloidea o reflejar diferencias genéticas autóctonas en la etiología molecular de la DMD/DMB en Venezuela; es posible que en estos pacientes se encuentren alteraciones en otras regiones del gen no estudiadas aquí explicando así la baja frecuencia de detección. Sin embargo, llama la atención en algunas poblaciones que el análisis de otros exones, diferentes a los contenidos en los estuches de 9 y 5-plex, no aumentaron significativamente la tasa de detección de deleciones en las poblaciones estudiadas (5, 11, 12).

La distribución de las deleciones dentro del gen de la Distrofina estudiadas aquí, correspondieron a las reportadas mundialmente y se encontraron mayoritariamente en la región comprendida entre los exones 44 y 55 (13, 16, 29, 35).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa ha demostrado ser

hasta ahora, una técnica de análisis molecular altamente eficiente para el diagnóstico de DMD/DMB. Con ésta técnica, regiones muy específicas del gen pueden ser amplificadas hasta más de un millón de veces a partir de cantidades de nanogramos del ADN genómico. Sus ventajas son múltiples cuando ésta técnica es comparada con la de Southern, ya que puede trabajarse con muestras parcialmente degradadas, no necesita de marcaje radioactivo ni de un entrenamiento riguroso del personal de laboratorio (11) y requiere aproximadamente de cinco horas desde su montaje hasta el fotografiado de los resultados. Un aspecto crítico que debe tenerse en cuenta para evitar la contaminación de las muestras de ADN genómico con productos amplificados, es el manejo cuidadoso de las mismas y una definición precisa de las áreas de trabajo. Por otra parte, en algunos casos, puede definirse con buena precisión la delección presentada por el paciente. Con los exones que se amplifican en ésta muestra pudo detectarse, en dos casos, JV y ET, que la delección comprendió un único exon sin el compromiso de los exones vecinos, mientras que en RC y DZ, si se supone la delección de los exones e intrones intercalados entre aquellos detectados como ausentes, estos pacientes presentaron delección de grandes segmentos en el gen de la Distrofina, que abarcarían entre 8 y 12 exones.

Las ventajas señaladas permiten proponer que la R.C.P. sea apli-

cada como estrategia de rutina en centros de Genética Médica, superando la necesidad de aplicar otra técnica analítica para la detección de delecciones dentro del gen de la Distrofina; además, como la secuencia de éste es conocida, nuevos juegos de iniciadores pueden ser añadidos a la reacción aumentando las posibilidades de detección de las delecciones. La técnica de transferencia de Southern se ejecutaría en aquellos casos en los cuales no se detecte mutaciones mediante la vía de R.C.P.

Finalmente, los exones incluidos en los estuches de 9 y 5-plex, fueron diseñados en base a la frecuencia de delecciones detectadas en poblaciones norteamericanas y europeas occidentales, por lo que debe incrementarse los estudios en otras poblaciones, con éstos y nuevos exones, con el fin de determinar con precisión su frecuencia de delección y patrón de distribución geográfica mundial. Particularmente en Venezuela, se requeriría el estudio de un mayor número de casos a fin de corroborar los resultados encontrados en éste trabajo.

#### AGRADECIMIENTO

Esta investigación fue subvencionada por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia. (Proyecto 1022-93).

## ABSTRACT

**Molecular diagnosis in venezuelan patients with Duchenne/Becker muscular dystrophies using the polymerase chain reaction.** Delgado, W. (Unidad de Genética Médica, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Apartado 15066, Maracaibo, Venezuela), Pineda-Del Villar, L., Borjas, L., Pons, H., Morales-M., A., Martínez-Basallo, M.C., Barrera-Saldaña, H. *Invest Clin* 35(4): 195- 207 1994.

**Key words:** Duchenne muscular dystrophy, intragenic deletions, polymerase chain reaction.

Duchenne and Becker muscular dystrophy (DMD/BMD) are recessive X-linked neuromuscular diseases produced by allelic mutations in the human dystrophin gen. In the present study we determined the 14-deletion prone exons by multiplex PCR in 24 no related venezuelan patients with clinical diagnosis of DMD/BMD. We found 37 % of intragenic deletions of which 77% were located at the "hot spot" deletion region that includes exons 44 to 55. The present study show that deletion frequency observed in venezuelan patients resembles some Asian populations and is lower than that observed in Europe and North America. The explanation of the low frequency detected in our patients is beyond the present study, but it is likely that different mutations, occurring at other regions of the gene is determining a molecular heteroge-

neity of the DMD/BMD disease in Venezuela.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- BAKKER E., HOFKER M.J., GOOR N., MANDEL J.L., WROGEMANN K., DAVIES K.E., KUNKEL L.M., WILLARD H.F., FENTON W.A., SANDKULY L., MAJOOR-KRAKAUR D., ESSEN A.J.V., JAHODA M.G.J., SACHS E.S., OMMEN G.J.B., PEARSON P.L.: Prenatal diagnosis and carrier detection of Duchenne Muscular Dystrophy with closely linked RFLPs. *Lancet* I:655-658, 1985.
- 2- BARANOV V.S., GORBUNOVA V.N., ARTEMYEVA O.V., KASCHEEVA T.K., EVGRAFOV O.V., POLYAKOV A.V., LEBEDEV V.M., KUZNETZOVA T.V., SHLYKOVA S.N., MIKHAILOV A.V., VAKHARLOVSKY V.G.: Dystrophin Gene Analysis and Prenatal Diagnosis of Duchenne Muscular Dystrophy in Russia. *Prenatal Diagnosis* 13:323-333, 1993.
- 3- BARRERA-SALDAÑA H.: Aislamiento del ADN genómico por la Técnica de la Proteinasa K-Fenol Sevag. En: *Reacción en Cadena de la Polimerasa en el Diagnóstico de las Enfermedades Hereditarias*, Manual del Curso Teórico-Práctico, Universidad Autónoma de Nuevo León, pp:10-12, 1993.
- 4- BAUMBACH L.L., CHAMBERLAIN J.S., WARD M.S., FARWELL N.J., CASKEY C.T.: Molecular and Clinical Correlations of deletions

- leading to Duchenne and Becker muscular Dystrophies. *Neurology* 39:465-474, 1989.
- 5- BEGGS A.H., KOENIG M., BOYCE F.M., KUNKEL L.M.: Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet* 86:45-48, 1990.
  - 6- BING-WEN S., TING-FEN T., CHUME-HWAE S., KO-PEI K., KWANG-JEN H., TSUNG-SHENG S.: DNA Polymorphisms and Deletion Analysis of the Duchenne-Becker Muscular Dystrophy Gene in the Chinese. *Am J Med Genet* 38:593-600, 1991.
  - 7- BROOK M.H., FENICHEL G., GRIGGS R.C., *et al*: Clinical Investigation in Duchenne Dystrophy. II: determination of the power of Therapeutic trials based in the natural history. *Muscle Nerve* 6:91-103, 1983.
  - 8- CLAUSTRES M., TUFFERY S., CHEVRON M.P., JOZELON M.P., MARTINEZ P., ECHENNE B., DEMAILE J.: Molecular deletion patterns families from southern France with Duchenne/Becker muscular dystrophies. *Hum Genet* 88:179-184, 1991.
  - 9- CORAL-VAZQUEZR., ARENASD., 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* 24(1):1-6, 1993.
  - 10- CHAMBERLAIN J.S., CASKEY C.T.: Duchenne Muscular Dystrophy. In: Appel SA [ed] *Current neurology* vol. 10 Year Book Medical Publishers, Chicago, pp. 65-103, 1990.
  - 11- CHAMBERLAIN J.S., GIBBS R.A., RANIER J.E., NGUYEN P.N., CASKEY C.T.: Deletion screening of the Duchenne Muscular Dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research* 16(23):11141-11156, 1988.
  - 12- COVONE A.E., CAROLIF., ROMEO G.: Screening Duchenne and Becker muscular dystrophy patients for deletions in 30 exons of the dystrophin gene by three-multiplex PCR. *Am J Hum Genet* 51: 675:677, 1992.
  - 13- DARRAS B.T., BLATTNER P., HARPER J.F., SPIRO A.J., ALTER S., FRANCKE U.: Intragenic deletions in 21 Duchenne Muscular Dystrophy (DMD)/Becker Muscular Dystrophy (BMD) families studied with the Dystrophin cDNA: Location of Break-points on HindIII and BgIII exon containing fragment maps, Meiotic and Mitotic origin of the mutations. *Am J Hum Genet* 43:620-629, 1988.
  - 14- DARRAS B.T.: Molecular Genetics of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *J Pediat* 117:1-15, 1990.
  - 15- DAVIES K.E., PEARSON P.L., HARPER P.S.: Linkage analysis of two cloned DNA sequences flanking the Duchenne muscular dystrophy locus on the short arm of the human X chromosome. *Nucleic Acids Research* 11:2303-2312, 1983.
  - 16- DEN-DUNNEN J.T., GROOTSCHOLTEN P.M., BAKKER E., BLONDEN L.A.J., GINJAAR H.B., WAPENAAR Mc., VAN PAASSEN H.M.B., VAN BROECKHOVEN C., PEWARSON P.L.: Topography of the

- Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *Am J Hum Genet* 45:835-847, 1989.
- 17- DUNCAN C.J.: Dystrophin and the integrity of the sarcolemm in Duchenne Muscular Dystrophy. *Experientia* 45:175-177, 189.
- 18- FORREST S.M., CROSS G.S., FLINT T., SPEER A., ROBSON K.J.H., DAVIES K.E.: Further studies of gene deletions that cause Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Genomics* 2:109-114, 1988.
- 19- GILLARD E.F., CHAMBERLAIN L.S., MURPHY E.G., DUFF C.L., SMITH B., BURGHESE A.H.M., THOMPSON M.W., SUTHERLAND J., OSS I., BODRUG S.E., KLAMUT H.J., RAY P.N., WORTON R.G.: Molecular and phenotypic analysis of patients with deletions within the deletion-rich region of the Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) gene. *Am J Hum Genet* 45:507-520, 1989.
- 20- HOFFMAN E.P., BROWN R.H., KUNKEL L.M.: Dystrophin: The protein product of the Duchenne Muscular Dystrophy locus. *Cell* 51:919-928, 1987.
- 21- HU X., RAY P.N., MURPHY E.G., THOMPSON M.W., WORTON R.G.: Duplicational mutation at the Duchenne Muscular Dystrophy locus: Its frequency, distribution, origin, and phenotype-genotype correlation. *Am J Hum Genet* 46:682-695, 1990.
- 22- KINGSTON H.M., SARFARAZI M., THOMAS N.S.T., HARPER P.S.: Localization of the Becker muscular dystrophy gene on the short arm of the X chromosome by linkage to cloned DNA sequences. *Hum Genet* 67:6-17, 1984.
- 23- KOENIG M., HOFFMANN P.E., BERTELSON C.J., MONACO A.P., FEENER C., KUNKEL M.: Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the MD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50:509-517, 1987.
- 24- KOENIG M., BEGGS A.H., MOYER M., SCHERPF S., HEINDRICH K., BETTECKEN T., MENG G., MULLER C.R., LINDLOF M., KAARIANEN H., DELACAPPELLE A., KIURU A., SAVONTAUS M.L., GILGENKRANTZ H., RECAN D., CHELLY J., KAPLAN J.C., COVONE A.E., ARCHIDIACONO N., ROMEO G., LIECHTI-GALLATI S., SCHENEIDER V., BRAGA S., MOSER H., DARRAS B.T., WROGEMANN K., BLONDEN L.A.J., VAN PAASSEN H.M.B., VAN OMMEN G.J.B., KUNKEL L.M.: The molecular basis for Duchenne versus Becker Muscular Dystrophy: Correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet* 45:498-506, 1988.
- 25- MOSER H.: Duchenne Muscular Dystrophy: Pathogenic aspects and genetic prevention. *Hum Genet* 66:17-40, 1988.
- 26- MULTICENTER STUDY GROUP. Diagnosis of Duchenne and Becker Muscular Dystrophies by Polymerase Chain Reaction. A Multicenter Study. *JAMA*, 267(19):2609-2615, 1992.
- 27- NORMAN A.M., UPADHYAYA M., THOMAS N.S.T., ROBERTS K.: Duchenne Muscular Dystrophy in

- Wales: impact of DNA linkage analysis and cDNA deletion screening. *J Med Genet* 26: 565-571, 1989.
- 28- PASSOS-BUENO M.R., RAPAPORT D., LOVED., FLINTT., BORTOLINI E.R., ZATZ M., DAVIES K.E.: Screening of deletions in the dystrophin gene with the cDNA probes Cf23a, Cf56a and Cf115. *J Med Genet* 27:145-150, 1990.
- 29- PRIOR T.W., PAPP A.C., SNYDER P.J., BURGHESE A.H.M., WALLACE B.H.: A HindIII/BglII dystrophin gene polymorphism in the African-American population. *Hum Genet* 89:687-688, 1992.
- 30- SIMARD L.R., GINGRAS F., DELVOYEN., VANASSE M., MELANCON S.B., LABUDA D.: Deletions in the dystrophin gene: analysis of Duchenne and Becker muscular dystrophy patients in Quebec. *Hum Genet* 89:419-424, 1992.
- 31- SHOMRAT R., GLUCK E., LEGUM C., SHILOH Y.: Relatively Low Proportion of Dystrophin Gene Deletions in Israeli Duchenne and Becker Dystrophy Patients. *Am J Med Genet* 49:369-373, 1994.
- 32- SOONG B., TSAI T., SU Ch., KAO K., HSIAO K., SU T.: Dna polymorphisms and deletion analysis of the Duchenne-Becker Muscular Dystrophy gene in the Chinese. *Am J Med Genet* 38:593-600, 1991.
- 33- SUGINO S., FUJISHITA S., KAMIMURA N., MATSUMOTO T., WAPENAAR M.C., DENG H.X., SHIBUYA N., MIKE T., NIKAWA N.: Molecular-Genetic Study of Duchenne and Becker Muscular Dystrophies: Deletion Analyses of 45 Japanese Patients and Segregation Analyses in their Families with RFLPs Based on the Data From Normal Japanese Females. *Am J Med Genet* 34: 555-561, 1989.
- 34- VERELLEN-DUMOLIN C., FREUND M., MEYER M. de, LATERRE C.T., FREDERIC J., THOMPSON M.W., MARKOVIC V.D., WATSON R.G.: Expression of an X-Linked muscular dystrophy in a female due to translocation involving Xp21 and non-random X-inactivation. *Hum Genet* 67:115-119, 1984.
- 35- VITIELLO L., MOSTACCIUOLO M.L., OLIVIERO S., SCHIAVON F., NICOLETTI L., AGELINI C., DANIELI G.A.: Screening for mutations in the muscle promoter region and for exonic deletions in a series of 115 DMD and BMD patients. *J Med Genet* 29:127-130, 1992.
- 35- WROGEMANK K., PENA S.D.: Mitochondrial calcium overload: A general mechanism for cell-necrosis in muscle diseases. *Lancet* 1:672, 1976.