

Revista Médica del Hospital General de México

Volumen
Volume 67

Número
Number 4

Octubre-Diciembre
October-December 2004

Artículo:

Identificación de deleciones en el gen
DMD mediante PCR múltiple en
pacientes mexicanos con distrofia
muscular de Duchenne/Becker

Derechos reservados, Copyright © 2004:
Sociedad Médica del Hospital General de México, AC

**Otras secciones de
este sitio:**

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

***Others sections in
this web site:***

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)



[Medigraphic.com](http://www.Medigraphic.com)



Identificación de deleciones en el gen DMD mediante PCR múltiple en pacientes mexicanos con distrofia muscular de Duchenne/Becker

Norma Celia González-Huerta,* Edgar Hernández-Zamora,*
María de la Luz Arenas-Sordo,* Rosa Elena Escobar-Cedillo,**
Antonio Miranda-Duarte,* Norberto Leyva-García*

RESUMEN

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) presenta una frecuencia de 1:3,500 varones vivos; el gen está localizado en Xp21.2, con un tamaño de 2.5 Mb y 79 exones. La distrofia muscular tipo Becker (BMD) es una variante alélica y es menos frecuente. Las mutaciones más frecuentes son deleciones que se presentan en 50 a 65% de los casos, y se localizan en regiones específicas denominadas *hot spots*. El objetivo de este trabajo fue identificar deleciones en el gen DMD mediante la amplificación de 17 exones y un promotor (Pm) en 17 pacientes con diagnóstico clínico de DMD/BMD, mediante reacción en cadena de la polimerasa múltiple de Chamberlain y Beggs, que detecta 98% de las deleciones, nueve de las cuales se asocian al *hot spot* menor y nueve al mayor. Se encontró que 10 casos presentaron deleción, el 30% en el *hot spot* menor en los exones 8, 12 y 13; 60% en el *hot spot* mayor en los exones 48 y 50; y 10% en ambos. Los resultados moleculares en conjunto con los bioquímicos, electromiográficos y la historia familiar en cada uno de estos pacientes permiten realizar un diagnóstico específico, así como establecer criterios para la detección de portadoras con otras metodologías.

Palabras clave: Distrofia muscular, gen DMD, distrofina, reacción en cadena de la polimerasa, PCR múltiple, Duchenne, Becker.

ABSTRACT

Duchenne's muscular dystrophy (DMD) presents a frequency of 1:3500 male live births. The gene is located in Xp21.2. It's has 2.5 Mb and 79 exons. Becker's muscular dystrophy (BMD) is a less frequent, allelic variant. The most frequent mutations are deletions that are present in 50 to 65% and are located in specific regions called hot spots. The purpose of this work was to identify deletions by amplifying 18 exons in 17 patients with clinical diagnosis of DMD/BMD by means of Chamberlain and Beggs multiple PCR that detects 98% of the deletions, nine of which are associated with the minor hot spot and 9 with the major. Ten cases presented deletion, 30% in the minor hot spot in the 8, 12 and 13 exons and 60% in the major in the 48 and 50 exons. The molecular results as a group with the biochemistic, electromyographic exams and family history of each patient allows us to make a specific diagnosis and establish criteria for the detection of carriers with other methodology.

Key words: Muscular dystrophy, DMD gene, dystrophin, multiplex PCR, Duchenne, Becker.

INTRODUCCIÓN

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad neuromuscular determinada genética-

mente con un patrón de herencia recesivo ligado al cromosoma X. Se estima que afecta 1 en 3,500 varones nacidos vivos y se caracteriza por debilidad muscular. Las manifestaciones clínicas de la enfer-

* Servicio de Genética, Centro Nacional de Rehabilitación (CNR), Secretaría de Salud (SS).

** Servicio de Electrodiagnóstico, CNR, SS.

medad se observan entre los tres y cinco años de edad, y los pacientes quedan confinados a usar silla de ruedas alrededor de los 12 años. Usualmente la muerte ocurre en la segunda década de su vida, por complicaciones cardiorrespiratorias.¹⁻³

La distrofia muscular tipo Becker (BMD) es una variante alélica con una prevalencia de 1 en 30,000.¹⁻⁴ La BMD tiene un curso menos severo y una supervivencia más larga. Mantienen una capacidad ambulatoria a la edad de 16 años o mayores.⁵

El gen responsable para DMD y BMD se localiza en el brazo corto del cromosoma X en la banda p21.2 (Xp21.2) y tiene un tamaño estimado de ~2.5 Mb. Está constituido por 79 exones y seis promotores (Pm).^{4,6} El transcrito es de 14 Kb y codifica para una proteína denominada distrofina, por lo que también se conoce como gen de la distrofina, que se encuentra principalmente en músculos esquelético, cardíaco y liso en el ser humano.^{2,6}

Entre el 50 y 65% de los pacientes presentan delección de uno o más exones del gen DMD, el 6% tienen duplicación y el resto tienen otra variedad de mutaciones, incluyendo las puntuales.^{1,7-9} Las delecciones son diferentes en extensión y posición, sin embargo existen al menos dos regiones que presentan mayor probabilidad de presentar delecciones, denominadas *hot spot* ("puntos calientes").^{3,9} El *hot spot* menor se encuentra dentro de los primeros veinte exones y el *hot spot* mayor abarca una zona intermedia del gen aproximadamente desde el exón 44 hasta el 52, en dirección 5' → 3' (Figura 1).^{3,9-11} Las delecciones pueden ser fácilmente detectadas en varones afectados por la ausencia de señal de hibridación mediante la técnica de *Southern blot* con sondas cADN¹²⁻¹⁴ o por ausencia de producto de amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Chamberlain y colaboradores aplicaron la PCR como un método

rápido y eficiente para la detección de delecciones, analizaron seis exones (8, 17, 19, 44, 45 y 48) en una reacción de amplificación múltiple.¹⁵ Posteriormente, adicionaron tres exones (4, 12 y 51) dentro de la reacción, incrementando la detección de las delecciones hasta el 80%.¹⁶ Una amplificación de otros nueve exones (Pm, 3, 6, 13, 43, 47, 50, 52 y 60) fue desarrollada por Beggs y asociados como una reacción complementaria, incrementando la detección de las delecciones hasta el 98%.^{17,18}

El estudio del gen DMD en conjunto con los exámenes bioquímicos, electromiográficos y los antecedentes familiares de cada paciente, permiten realizar un diagnóstico integral y específico. El objetivo de este trabajo fue identificar las delecciones más frecuentes en el gen DMD mediante la amplificación de 17 exones y un promotor en pacientes con diagnóstico clínico de DMD/BMD.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 17 pacientes de la Clínica de Enfermedades Neuromusculares y el Servicio de Genética del Centro Nacional de Rehabilitación, que presentaron manifestaciones clínicas, bioquímicas y electromiográficas probables de DMD/BMD.

Se solicitó el consentimiento informado de los padres y a cada paciente se le extrajeron 5 mL de sangre mediante punción venosa directa de la vena mediana o la cefálica. La recolección de la muestra se realizó en tubos de vidrio con EDTA, para la extracción de ADN, la cual se realizó con el método salino.¹⁹

Una vez obtenido y cuantificado el ADN, se realizó la amplificación con 18 pares de iniciadores descritos previamente por Chamberlain y Beggs,¹⁵⁻¹⁸ en un termociclador (Gene Amp PCR System 9700, PE Applied Biosystems). Para la amplificación de los

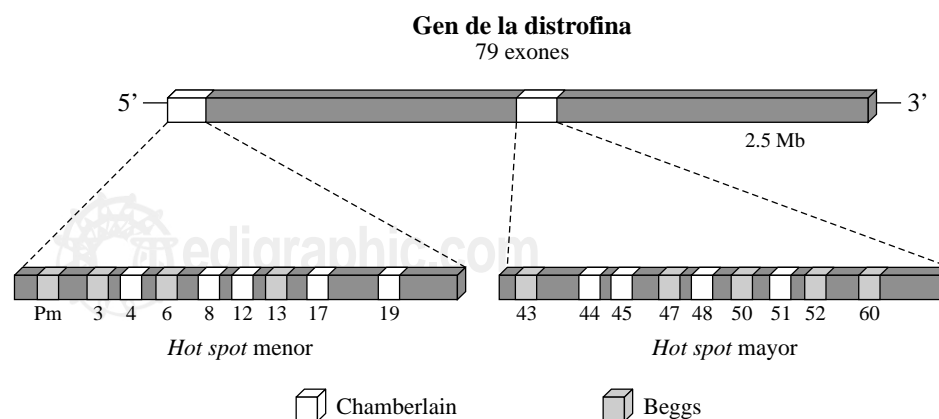


Figura 1.

Representación de los sitios *hot spot* menor y mayor del gen de la distrofina.

exones descritos por Chamberlain se utilizó solución amortiguadora 1X (KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8.4), 1.5 mM de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs), 0.1 pM de cada iniciador, 6.7 mM de $MgCl_2$, 5 U de Taq polimerasa, y 250 ng de ADN en un volumen final de reacción de 50 μ L. El programa de amplificación fue una desnaturalización inicial a 94° C cinco minutos, seguido por 26 ciclos, un minuto de desnaturalización a 94° C, un minuto de alineamiento a 55° C, cuatro minutos de extensión a 68° C y una extensión final de cinco minutos a 68° C.^{15,16}

Para la amplificación de los exones descritos por Beggs, se utilizó solución amortiguadora 1X, 1.5 mM de

dNTPs, 0.1 pM de cada iniciador, 6.7 mM de $MgCl_2$, 5 U de Taq polimerasa y 250 ng de ADN en un volumen final de reacción de 50 μ L. El programa de amplificación fue una desnaturalización inicial a 94° C cinco min, seguido por 25 ciclos, 35 segundos a 94° C, 30 segundos a 64° C, cuatro minutos de extensión a 65° C y una extensión final de siete minutos a 65° C.^{17,18}

Los productos de PCR fueron almacenados a 4° C. Posteriormente, 5 μ L de cada uno, 5 μ L de un producto amplificado de un individuo control negativo, 5 μ L del control positivo, 5 μ L de un blanco de reactivos y 2 μ L de marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder Life Technologies) se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 3%, teñidos con bromuro de etidio.

RESULTADOS

La edad promedio de los pacientes fue de 6.88 ± 2.34 años, el resto de las características clínicas, así como los exones que presentaron deleción, se muestran en el *cuadro I*. De los 17 pacientes estudiados, 10 (59%) presentaron una o más deleciones y, de éstos, 30% se presentaron en el *hot spot* menor, 60% en el mayor y 10% en ambos (*Figuras 2A y 2B*). Las deleciones encontradas se presentaron con mayor frecuencia en el *hot spot* mayor (*Figura 3*).

Los exones que se encontraron con deleción fueron: 3, 4, 6, 8, 12, 13, 17, 47, 48, 50, 51 y 52. De éstos, los que con mayor frecuencia presentaron deleción fueron el 48 y el 50, seguidos del 8, 12 y 13. Los primeros estuvieron ausentes en siete pacientes (41%) y los segundos en tres sujetos (18%) (*Cuadro I, Figuras 3 y 4*).

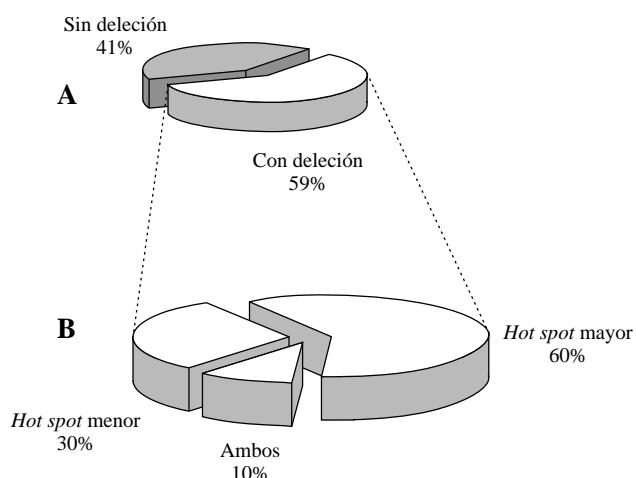


Figura 2. A: Porcentaje de deleciones en todos los pacientes estudiados con diagnóstico de DMD/DMB. **B:** Porcentaje de deleciones en los *hot spots*.

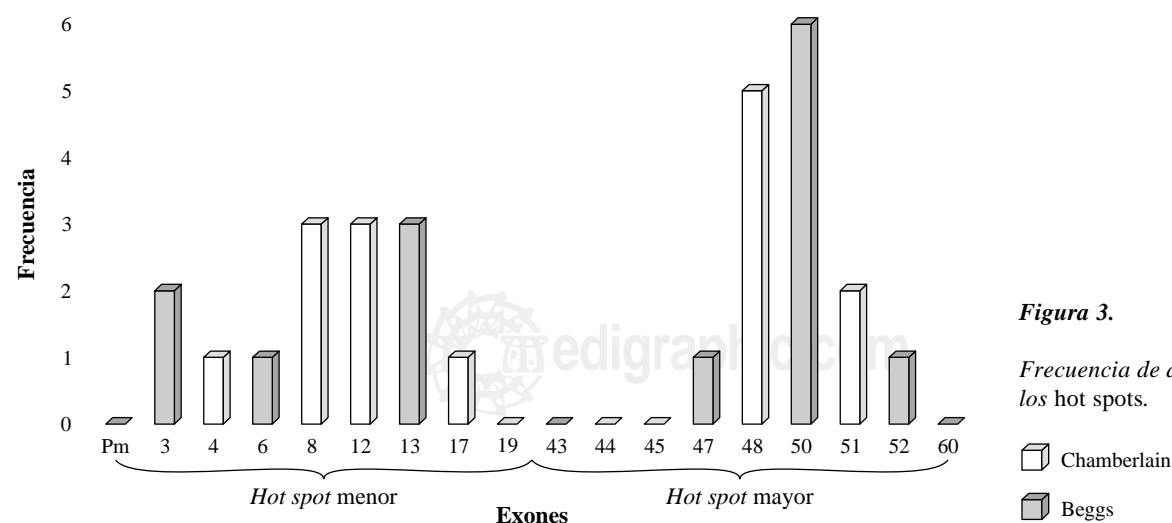


Figura 3.

Frecuencia de deleciones en los *hot spots*.

□ Chamberlain
■ Beggs

Cuadro I. Datos clínicos y resultado molecular de la detección de deleciones en el gen de la distrofina en pacientes con diagnóstico de DMD/BMD.

Número de caso	Edad (años)	AHF	RM	AA	EI (años)	G	PH	Deleción de exón	DPM	HN
1	6	–	–	–	nr	Nr	+	s/d	r	–
2	7	–	+	–	nr	Nr	+	s/d	r	+
3	12	–	nr	+	6.0	Nr	+	3, 48, 50	n	–
4	10	–	–	–	3.0	+	+	50	l	–
5	7	–	–	–	–	+	+	48, 50, 51	–	–
6	5	+	+	–	2.0	+	+	8, 12, 13	l	–
7	4	+	–	–	2.0	+	+	8, 12, 13.	r	+
8	5	–	+	+	5.0	+	+	3, 4, 6, 8, 12,13, 17	r	+
9	9	–	–	–	7.0	+	+	50	r	–
10	9	–	–	–	1.5	+	+	s/d	r	–
11	3	+	–	–	1.3	+	nr	s/d	r	–
12	6	–	+	app	2.0	+	+	47, 48	nr	nr
13	4	–	nr	–	1.0	+	nr	s/d	r	–
14	7	–	–	–	2.0	+	nr	s/d	l	–
15	7	–	+	–	1.0	+	+	s/d	r	–
16	7	–	–	pp	1.0	+	+	48, 50	n	–
17	9	–	nr	pp	1.4	+	+	48, 50,51,52.	r	–

Fuente: Archivo Clínico. *Abreviaturas:* AHF = Antecedentes heredofamiliares. RM = Retraso mental.

AA = Amenaza de aborto. app = amenaza de parto prematuro. pp = parto prematuro. EI = Edad de inicio. G = Signo de Gowers.

PH = Pseudohipertrofia. DPM = Desarrollo psicomotor. n = normal. l = ligeramente retrasado. r = retrasado. HP = Hipoxia neonatal.

+ = Positivo. – = Negativo. nr = No reportado. s/d = Sin deleción.

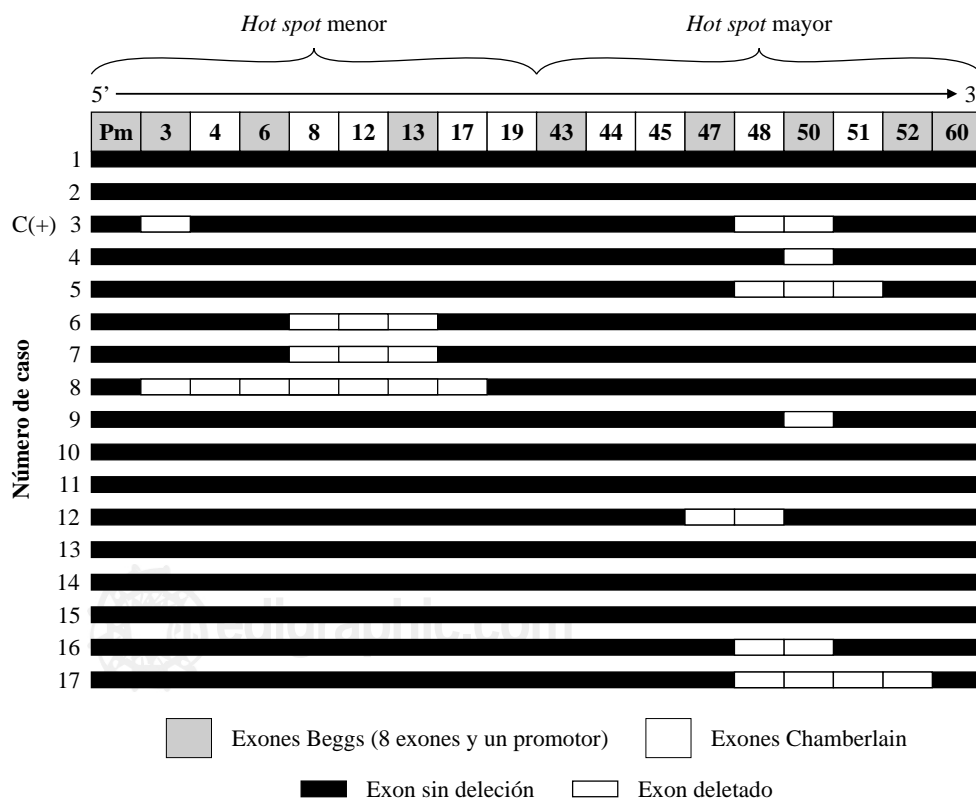


Figura 4.

Representación esquemática de las deleciones identificadas en el gen de la distrofina en pacientes con diagnóstico de DMD/BMD mediante PCR múltiple.

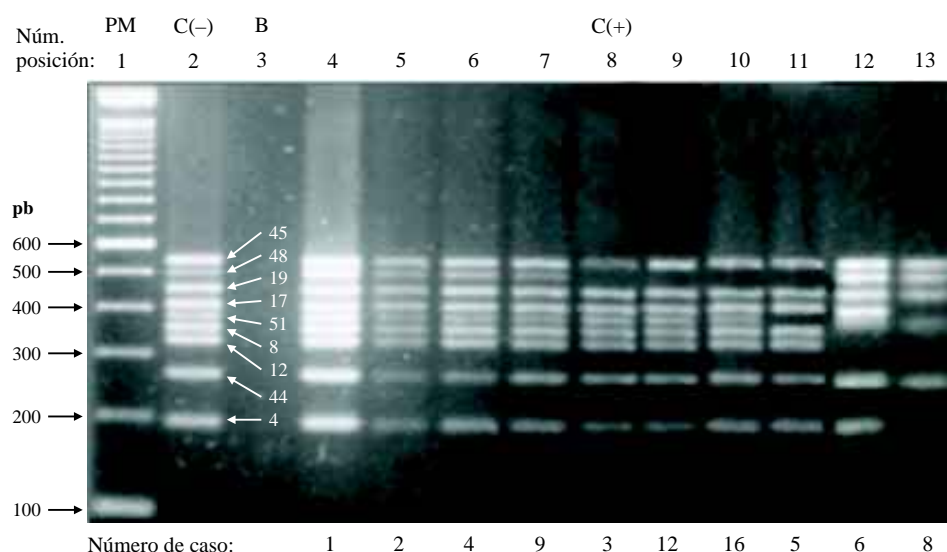


Figura 5.

Productos de amplificación con los iniciadores descritos por Chamberlain.

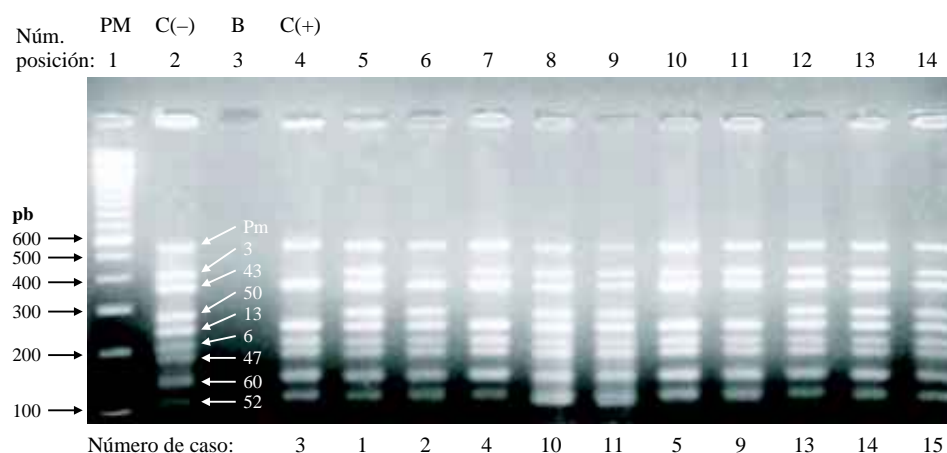


Figura 6.

Productos de amplificación utilizando los iniciadores propuestos por Beggs.

En la *figura 5* se presenta la fotografía de un gel de agarosa al 3%, con los productos de amplificación utilizando los iniciadores propuestos por Chamberlain; muestra resultados de algunos de los pacientes. De la misma manera, la *figura 6* presenta la fotografía de un gel de agarosa al 3%, con los productos de amplificación utilizando los iniciadores propuestos por Beggs, mostrando algunos de los pacientes.

DISCUSIÓN

De acuerdo con la literatura, aproximadamente el 65% de los pacientes con DMD/BMD presentan delección de uno o más exones;²⁰⁻²² de los 17 pacientes estudiados en nuestra serie, 10 presentaron delecciones, lo que corresponde al 59% (*Figura 2A*), muy cercano a lo informado.^{3,21,22} De las delecciones encontradas en

nuestra muestra, el 30% se presentaron en el *hot spot* menor, 60% en el mayor; el caso número 3, que representa el 10%, tuvo en ambos (*Figura 2B*), por lo que este paciente fue el idóneo para ser el control de ambas reacciones 9-plex (*Figura 4*). El paciente descrito en los *cuadros I y IV* como caso 8, fue el que presentó mayor número de exones ausentes en la región 5' que corresponden al *hot spot* menor.

El caso 3 presentó delecciones tanto en el exón 3 que corresponde al *hot spot* menor, como en los exones 48 y 50 del *hot spot* mayor; es un caso particular debido a que las delecciones se presentan en exones muy separados. Una posibilidad por la cual se dé este hecho podría ser que debido al tipo de herencia; es decir, que en primer lugar el paciente haya heredado una mutación de la abuela y la segunda de la madre, esto es una doble mutación, o bien que la pri-

mera sea heredada y la segunda adquirida. Finalmente, también planteamos la posibilidad de que exista una mutación en alguno de los intrones que flanquean al exón 3, y que este hecho provocara que alguno de los iniciadores no se uniera de manera adecuada al ADN y con ello no se diera la amplificación del correspondiente exón.

Se observaron pacientes que presentaron deleción sólo en los exones descritos por Chamberlain (casos 4 y 9, *Figura 4*) y no para los exones descritos por Beegs (*Figura 6*). Además, tal como se indica en las *figuras 4 a 6*; los casos 1, 2, 10, 11, 13, 14 y 15 no presentaron deleción en ninguno de los sitios *hot spots* y, sin embargo, presentaron características clínicas, bioquímicas y electromiográficas de DMD/BMD. En estos casos, debido a la metodología empleada, no se puede descartar que existan deleciones diferentes²² a las estudiadas u otras mutaciones a lo largo de todo el gen de la distrofina.²³⁻²⁵

Las deleciones que con más frecuencia encontramos en este estudio, tomando en cuenta a los 17 pacientes, se presentaron en los exones 8, 12 y 13, y en menor frecuencia en los 3, 4, 6 y 17, con respecto al *hot spot* menor. En el *hot spot* mayor las deleciones más frecuentes fueron en los exones 48 y 50, lo cual concuerda con lo informado por Coral-Vázquez y colaboradores en otro grupo de pacientes mexicanos;^{3,22,26} también encontramos que las menos frecuentes se presentaron en los exones 47, 51 y 52 (*Figura 3*).

Las manifestaciones clínicas de los pacientes estudiados mostraron lo ya referido en la literatura; el retraso mental y el retraso psicomotor, no parecen tener relación con el número o tipo de exones que presentan deleción.⁵

En cuanto a los antecedentes heredofamiliares, se encontró que el mayor número de casos podrían corresponder a mutaciones de novo (82.36%), las cuales podrían tener lugar en las gónadas del abuelo de los pacientes, condicionando así mujeres portadoras en casos no familiares. El 17.64% fueron casos familiares, no acorde a lo descrito en literatura internacional, pero sí con lo informado por Alcántara y asociados en población mexicana, los cuales describen que 62.2% fueron mutaciones de novo.²²

Un dato importante es que la amenaza de aborto sólo se presentó en dos casos, uno de los cuales fue el que mayor número de deleciones presentó (*Cuadro I*).

El uso de PCR múltiple es una herramienta que puede detectar cerca del 98% de las deleciones, de forma rápida y confiable, y además permite el asesoramiento apropiado a los pacientes, que en conjunto con los estudios clínicos, bioquímicos y electromio-

gráficos es suficiente para establecer un diagnóstico específico; sin embargo, tiene limitaciones, pues no puede ser utilizado para la detección de las portadoras, debido a que son heterocigotas. Por ello, es necesario complementar estos resultados con métodos moleculares diferentes, si se desea estudiar a las mujeres posibles portadoras y así poder ofrecer consejo genético a las familias de los pacientes afectados, haciendo hincapié en la prevención,²⁷⁻³² ya que no existe hasta el momento tratamiento para este padecimiento.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brooke MH, Fenichel GM, Griggs RC, Mendell JR, Moxley R, Florence J et al. Duchenne muscular dystrophy: patterns of clinical progression and effects of supportive therapy. *Neurology* 1989; 39 (4): 475-481.
2. Boland BJ, Silbert PL, Groover RV, Wollan PC, Silverstein MD. Skeletal, cardiac, and smooth muscle failure in Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Neurol* 1996; 14 (1): 7-12.
3. Coral-Vázquez R, Arenas D, Cisneros B, Penaloza L, Salamanca F, Kofman S, Mercado R, Montañez C. Pattern of deletions of the dystrophin gene in Mexican Duchenne/Becker muscular dystrophy patients: The use of new designed primers for the analysis of the major deletion "hot spot" region. *Am J Med Genet* 1997; 70 (3): 240-246.
4. Hoffman EP, Schwartz L. Dystrophin and disease. *Mol Aspects Med* 1991; 12 (3): 175-194.
5. Bakker E, Van-Ommen GJ. Duchenne and Becker muscular dystrophy (DMD and BMD). In: Alan EH. *Neuromuscular disorders: Clinical and molecular genetics*. USA: John Wiley & Sons, 1998.
6. Tennyson CN, Klamut HJ, Worton RG. The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced. *Nat Genet* 1995; 9 (2): 184-190.
7. Gospe SM Jr, Lazaro RP, Lava NS, Grootscholten PM, Scott MO, Fischbeck KH. Familial X-linked myalgia and cramps: A nonprogressive myopathy associated with a deletion in the dystrophin gene. *Neurology* 1989; 39 (10): 1277-1280.
8. Prior TW, Bartolo C, Papp AC, Snyder PJ, Sedra MS, Burghes AH, Kissel JT et al. Dystrophin expression in a Duchenne muscular dystrophy patient with a frame shift deletion. *Neurology* 1997; 48 (2): 486-488.
9. Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987; 51 (6): 919-928.
10. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 1988; 53 (2): 219-226.
11. Worton RG. Dystrophin: the long and short of it. *J Clin Invest* 1994; 93 (1): 4.
12. Haldane JB. The rate of spontaneous mutation of a human gene. *J Genet* 1935; 31: 317-326.
13. Haldane JB. Mutation in the sex-linked recessive type of muscular dystrophy; a possible sex difference. *Ann Hum Genet* 1956; 20 (4): 344-347.
14. Montejo-Pujadas Y, Zaldívar-Villan T, Acevedo-López AM. Técnicas diagnósticas descritas en el estudio de la distrofia muscular de Duchenne/Becker. *Rev Neurol* 2002; 34 (3): 278-281.

15. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 1988; 16 (23): 11141-11156.
16. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Caskey CT. *Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy*. EUA: Innis MA, Gelfand MH, Sninsky JJ, White TJ. Academic Press. 1990. 272-81.
17. Beggs AH, Kunkel LM. Improved diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy. *J Clin Invest* 1990; 85 (3): 613-619.
18. Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Human Genetics* 1990; 86 (1): 45-48.
19. Buffone GJ, Darlington GJ. Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol. *Clin Chem* 1985; 31 (1): 164-165.
20. Mansfield ES, Robertson JM, Lebo RV, Lucero MY, Mayrand PE, Rappaport E et al. Duchenne/Becker muscular dystrophy carrier detection using quantitative PCR and fluorescence-based strategies. *Am J Med Genet* 1993; 48 (4): 200-208.
21. Ried T, Mahler V, Vogt P, Blonden L, van Ommen GJ, Cremmer T, Cremmer M. Direct carrier detection by in situ suppression hybridization with cosmid clones of the Duchenne/Becker muscular dystrophy locus. *Hum Genet* 1990; 85 (6): 581-586.
22. Alcantara MA, Villarreal MT, Del Castillo V, Gutierrez G, Saldana Y, Maulen I, Lee R, Macias M, Orozco L. High frequency of de novo deletions in Mexican Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. Implications for genetic counseling. *Clin Genet* 1999; 55 (5): 376-380.
23. Wood S, McGillivray BC. Germinal mosaicism in Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet* 1988; 78 (3): 282-284.
24. Passos-Bueno MR, Bakker E, Kneppers AL, Takata RI, Rappaport D, den Dunnen JT et al. Different mosaicism frequencies for proximal and distal Duchenne muscular dystrophy (DMD) mutations indicate difference in etiology and recurrence risk. *Am J Hum Genet* 1992; 51 (5): 1150-1155.
25. Montejó-Pujadas Y, Zaldívar-Villanar T, Acevedo-López AM, Guerra-Badía R. Diagnóstico prenatal y de portadores en familia con distrofia muscular de Duchenne. Introducción a nuevos marcadores. *Rev Neurol* 2001; 33 (11): 1094-1095.
26. Bartlett RJ, Pericak-Vance MA, Koh J, Yamaoka LH, Chen JC, Hung WY et al. Duchenne muscular dystrophy: High frequency of deletions. *Neurology* 1988; 38: 1-4.
27. Norman A, Harper P. A survey of manifesting carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy in Wales. *Clin Genet* 1989; 36 (1): 31-37.
28. Kristjansson K, Chong SS, Van den Veyver IB, Subramanian S, Snabes MC, Hughes MR. Preimplantation single cell analyses of dystrophin gene deletions using whole genome amplification. *Nat Genet* 1994; 6 (1): 19-23.
29. Abbs S, Bobrow M. Analysis of quantitative PCR for the diagnosis of deletion and duplication carriers in the dystrophin gene. *J Med Genet* 1992; 29 (3): 191-196.
30. Pastore L, Caporaso MG, Frisso G, Orsini A, Santoro L, Sacchetti L, Salvatore F. A quantitative polymerase chain reaction (PCR) assay completely discriminates between Duchenne and Becker muscular dystrophy deletion carriers and normal females. *Mol Cell Probes* 1996; 10 (2): 129-137.
31. Ioannou P, Christopoulos G, Panayides K, Kleanthous M, Middleton L. Detection of Duchenne and Becker muscular dystrophy carriers by quantitative multiplex polymerase chain reaction analysis. *Neurology* 1992; 42 (9): 1783-1790.
32. Mirabella M, Servidei S, Manfredi G, Ricci E, Frustaci A, Bertini E, Rana M, Tonali P. Cardiomyopathy may be the only clinical manifestation in female carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 1993; 43 (11): 2342-2345.

Dirección para correspondencia:

Norma Celia González-Huerta
 Centro Nacional de Rehabilitación, SS
 Servicio de Genética
 (Torre de Investigación tercer piso)
 Calzada México-Xochimilco 289
 Col. Arenal de Guadalupe
 14389, México D.F.
 Tel: 59 99 10 00 ext. 19402
 Fax: 56 45 56 03
 E-mail: ngonzalez@cnr.gob.mx

