

Distrofias musculares en México: un enfoque clínico, bioquímico y molecular

Ramón Mauricio Coral Vázquez,^{*,**} Luz Berenice López Hernández,^{*,**,***} Luis Ángel Ruano Calderón,^{****} Benjamín Gómez Díaz,¹ Francisca Fernández Valverde,² Eliganty Bahena Martínez^{*,**}

RESUMEN

Las distrofias musculares son un conjunto de enfermedades que se distinguen por debilidad progresiva y desgaste muscular que generalmente provocan discapacidad. En conjunto, se originan por defectos en genes que codifican para proteínas sumamente importantes para el funcionamiento de las células musculares, las cuales se pueden dividir en proteínas de matriz extracelular, de membrana y de citoesqueleto. El estudio de caracterización molecular y funcional de estas proteínas ha inducido múltiples avances en el diagnóstico y tratamiento de las distrofias musculares; de igual manera, ha contribuido al conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares que intervienen en el origen de estas enfermedades.

Palabras clave: distrofia muscular, genes, mecanismos moleculares y celulares, diagnóstico.

ABSTRACT

Muscular dystrophies are a group of diseases characterized by progressive weakness and muscle waste that in most cases induce disability in patients. Muscular dystrophies considered as a group, are caused by defects in genes that encode critical proteins for muscle cells, which can be divided in extracellular matrix, membrane and cytoskeleton proteins. Molecular and functional characterization of these proteins has led to the advent of several advances in muscular dystrophy diagnosis and treatment. Besides, it has contributed to a better understanding of cellular and molecular mechanisms involved in the development of these diseases.

Key words: muscular dystrophy, genes, molecular and cellular mechanisms, diagnosis.

* División de Medicina Genómica, Subdirección de Enseñanza e Investigación, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE, México, DF.

** Laboratorio Multidisciplinario, sección de posgrado, Escuela Superior de Medicina, IPN, México, DF.

*** Doctorado en Genética Humana, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.

**** Jefatura de Enseñanza, Hospital General de Durango, SSA, Durango, Durango, México.

¹ Departamento de Morfología Celular y Molecular, Instituto Nacional de Rehabilitación, SSA, México, DF.

² Laboratorio de Patología Experimental, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, SSA, México, DF.

Correspondencia: Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez. División de Medicina Genómica, Subdirección de Enseñanza e Investigación, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre. San Lorenzo 502, 2º piso, colonia Del Valle, CP 03010, México, DF.
Recibido: febrero, 2010. Aceptado: agosto, 2010.

Este artículo debe citarse como: Coral-Vázquez RM, López-Hernández LB, Ruano-Calderón LA, Gómez-Díaz B y col. Distrofias musculares en México: un enfoque clínico, bioquímico y molecular. Rev Esp Med Quir 2010;15(3):152-160.

Las distrofias musculares son un grupo diverso de enfermedades de origen genético. Habitualmente la clasificación de estas enfermedades se ha realizado tomando en cuenta las características genéticas, los músculos afectados, la gravedad y la distrofia muscular; sin embargo, con el uso de nuevas estrategias biológicas, genéticas y bioquímicas se han identificado varios genes y proteínas que están implicados en el origen de distintos tipos de distrofia muscular. Las nuevas clasificaciones toman en cuenta la proteína causante de la enfermedad (Cuadro 1),¹⁻⁵ lo que ha sido un detonante para ampliar el conocimiento sobre sus aspectos moleculares. En la actualidad se han identificado más de 40 genes cuyas mutaciones causan distrofia muscular (Cuadro 1); esto ha propiciado la realización de estudios encaminados a entender la función de dichas proteínas en un músculo esquelético normal y su relación en una condición patológica. Así mismo, se han desarrollado métodos de diagnóstico

Cuadro 1. Genes y proteínas relacionadas con distrofia muscular (continúa en la siguiente página)

<i>Enfermedad</i>	<i>Modo de herencia</i>	<i>Locus</i>	<i>Gen</i>	<i>Proteína</i>
Duchenne (DMD); Becker (DMB)	XR	Xp21.2	DMD	Distrofina
Emery-Dreifuss ligada a X, tipo 1 (EDMD)	XR	Xq28	EMD	Emerina
Emery-Dreifuss ligada a X, tipo 2	XR	Xq26.3	FHL1	Cuatro dominios y medio LIM 1
Emery-Dreifuss autosómica dominante (EDMD2)	AD	1q21.2	LMNA	Lamina A/C
Emery-Dreifuss autosómica recesiva (EDMD3)	AR	1q21.2	LMNA	Lamina A/C
Emery-Dreifuss con defecto en nesprina-1	AD	6q25	SYNE1	Proteína con repetidos de espectrina, envoltura nuclear 1 (nesprina-1)
Emery-Dreifuss con defecto en nesprina-2	AD	4q23	SYNE2	Proteína con repetidos de espectrina, envoltura nuclear 2 (nesprina-2)
Facio-escápulo-humeral (FSHD)	AD	4q35	?	?
Distrofia muscular con lipodistrofia generalizada	AR	17q21-q23	PTRF	Factor liberador de transcripción y polimerasa I (cavina-1)
Distrofias de cinturas con modo de herencia dominante				
LGMD1A	AD	5q31	MYOT	Miotilina
LGMD1B	AD	1q11-q21	LMNA	Lamina A/C
LGMD1C	AD	3p25	CAV3	Caveolina-3
LGMD1D	AD	7q	?	?
LGMD1E	AD	6q23	?	?
LGMD1F	AD	7q32	?	?
LGMD1G	AD	4p21	?	?
Distrofias de cinturas con modo de herencia recesiva				
LGMD2A	AR	15q15.1	CAPN3	Calpaina-3
LGMD2B	AR	2p13	DYSF	Disferlina
LGMD2C	AR	13q12	SGCG	γ -Sarcoglicano
LGMD2D	AR	17q12-q21.33	SGCB	α -Sarcoglicano
LGMD2E	AR	4q12	SGCC	β -Sarcoglicano
LGMD2F	AR	5q33	SGCD	δ -Sarcoglicano
LGMD2G	AR	17q12	TCAP	Teletonina
LGMD2H	AR	9q31-q34	TRIM32	Proteína de región tripartita 32 (ubiquitina ligase)
LGMD2I	AR	19q13.3	FKRP	Proteína relacionada con fukutina
LGMD2J	AR	2q31	TTN	Titina
LGMD2K	AR	9q34	POMT1	O-manosil-transferasa 1
LGMD2L	AR	11p14.3	ANO5	Anoctamina 5
LGMD2M	AR	9q31	FKTN	Fukutina
LGMD2N	AR	14q24	POMT2	O-manosil-transferasa 2
LGMD2O	AR	1p34	POMGNT1	O-manosa β -1,2-N-acetilglucosaminil-transferasa 1
Distrofias musculares congénitas con modo de herencia dominante				
Miopatía de Bethlem	AD	21q22.3	COL6A1	Colágena tipo VI subunidad alfa 1
Miopatía de Bethlem	AD	21q22.3	COL6A2	Colágena tipo VI subunidad alfa 2
Miopatía de Bethlem	AD	2q37	COL6A3	Colágena tipo VI subunidad alfa 3
Distrofia muscular congénita con dinamina	AD	19q13.2	DNM2	Dinamina 2

Cuadro 1. Genes y proteína relacionada con distrofia muscular (continuación)

<i>Enfermedad</i>	<i>Modo de herencia</i>	<i>Locus</i>	<i>Gen</i>	<i>Proteína</i>
Distrofias musculares congénitas con modo de herencia recesiva				
Distrofia muscular congénita con deficiencia de merosina	AR	6q2	LAMA2	Laminina alfa 2 cadena de merosina (α -2 laminina)
Distrofia muscular congénita	AR	1q42	?	?
Distrofia muscular congénita y anormal glucosilación de distroglicano	AR	19q13	FKRP	Proteína relacionada con fukutina
Distrofia muscular congénita y anormal glucosilación de distroglicano	AR	22q12	LARGE	Similar a glicosiltransferasa
Distrofia muscular congénita de Fukuyama	AR	9q31-q33	FCMD	Fukutina
Síndrome de Walker-Warburg	AR	9q31-q33	FCMD	Fukutina
Síndrome de Walker-Warburg	AR	9q34	POMT1	Proteína-O-manosil transferasa 1
Síndrome de Walker-Warburg	AR	14q24.3	POMT2	Proteína-O-manosil transferasa 2
Síndrome de Walker-Warburg	AR	19q13	FKRP	Proteína relacionada con fukutina
Síndrome de Walker-Warburg	AR	1p3	POMGNT1	O-manosa beta 1,2-N-acetil-glucosaminil transferasa
Síndrome de Walker-Warburg	AR	22q12	LARGE	Similar a glicosiltransferasa
Enfermedad músculo-ojo-cerebro	AR	1p3	POMGNT1	O-manosa beta 1,2-N-acetil-glucosaminil transferasa
Enfermedad músculo-ojo-cerebro	AR	19q13	FKRP	Proteína relacionada con fukutina
Enfermedad músculo-ojo-cerebro	AR	14q24.3	POMT2	Proteína-O-manosil transferasa 2
Síndrome de espina rígida	AR	1p36	SEPN1	Selenoproteína N1
Síndrome de Ullrich	AR	21q22.3	COL6A1	Colágena tipo VI subunidad alfa 1
Síndrome de Ullrich	AR	21q22.3	COL6A2	Colágena tipo VI subunidad alfa 2
Síndrome de Ullrich	AR	2q37	COL6A3	Colágena tipo VI subunidad alfa 3
Miopatía de Bethlem (recesiva)	AR	2q37	COL6A3	Colágena tipo VI subunidad alfa 3
Distrofia muscular congénita con defecto de integrina	AR	12q13	ITGA7	Integrina α 7
Distrofia muscular congénita con articulaciones hiperlaxas	AR	3p23-21	?	?

XR: ligada a X; AD: autosómico dominante; AR: autosómico recesivo.

y se están explorando nuevas estrategias terapéuticas basadas en la “medicina genética” en combinación con terapias farmacológicas. Aunado a lo anterior, y con el advenimiento de los estudios de genómica, se están llevando a cabo investigaciones que pretenden abordar estas enfermedades con un enfoque más integral. Esto es relevante, ya que se ha observado que pacientes con la misma mutación en un gen pueden sufrir diferentes formas de la enfermedad; además, algunas distrofias musculares con evolución clínica semejante pueden ser causadas por mutaciones en genes distintos y mostrar un patrón de herencia disímil, lo cual dificulta la identificación de casos esporádicos. Por esta razón, es

importante considerar que el panorama en el diagnóstico de las distrofias musculares es cambiante, y que a medida que se conoce más sobre los genes y proteínas que intervienen en estas enfermedades, los algoritmos diagnósticos irán evolucionando.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y PATOLÓGICAS DE LAS DISTROFIAS MUSCULARES

Las distrofias musculares son enfermedades del músculo esquelético originadas por defectos genéticos y vinculadas con la deficiencia o ausencia de determinadas proteínas estructurales y con otras funciones de las fibras

musculares. Desde el punto de vista clínico, se caracterizan por debilidad progresiva debida a atrofia muscular por sustitución del músculo por tejido fibro-adiposo. La manifestación clínica más importante y frecuente es la debilidad, y según su localización, las distrofias musculares pueden clasificarse en: distrofia de cinturas, distrofias o miopatías distales, distrofia oculofaríngea, distrofia facio-escapulo-humeral, etc. Otro tipo de distrofias se distinguen por fenómenos clínicos concomitantes, como la distrofia miotónica o enfermedad de Steinert (relacionada con la miotonía) o las alteraciones cardíacas predominantes en el caso de la enfermedad de Emery-Dreifuss. La distrofia muscular más frecuente es la de Duchenne-Becker, consecuencia de la ausencia o deficiencia de distrofina, que provoca debilidad de cintura e hipertrofia de gemelos y cardiomiopatía; otras se relacionan con escápulas aladas, retracciones articulares tempranas o atrofia distal de extremidades. En la actualidad, las distrofias se clasifican según el defecto genético identificado, la proteína asociada o el modo de transmisión genética, que puede ser autosómico recesivo, dominante o ligado a X. Por tanto, el abordaje debe ser siempre clínico, y de acuerdo con las características de presentación, debe confirmarse elevación de CPK, cambios miopáticos en la electromiografía (EMG) y

alteraciones distróficas en la biopsia muscular; en este último estudio se determina la deficiencia o defecto específicos (Figura 1).

GENES Y PROTEÍNAS

Una vez que se demostró que los pacientes con distrofia muscular de Duchenne-Becker (DMD/DMB) y que los ratones distróficos *mdx* (modelo animal para estudiar esta enfermedad) tienen alteraciones en el gen DMD que ocasionan la deficiencia de la proteína distrofina,⁶⁻⁹ se iniciaron estudios bioquímicos encaminados a elucidar la función biológica de esta proteína. Varios de estos estudios pusieron en evidencia que la distrofina interactúa con una serie de proteínas del sarcolema (Figura 2), llamadas proteínas asociadas a distrofina, DAP (*dystrophin-associated proteins*).^{10,11} Las DAP forman un grupo de proteínas periféricas e integrales presentes en la membrana de las células del músculo estriado y liso que conectan a la matriz extracelular con el citoesqueleto.¹²

Si bien no se conoce con precisión su función, se piensa que el complejo protege a la célula muscular del daño inducido por el proceso de contracción y transducción de señales.

Las DAP se pueden dividir en tres subcomplejos de acuerdo con sus características bioquímicas:¹⁰ a) el componente citoplasmático consiste en un grupo de proteínas periféricas a la membrana intracelular: la distrofina, las sintrofinas y la distrobrevina. b) El segundo subcomplejo, el distroglicano, está compuesto de dos proteínas muy relacionadas, el distroglicano α y el distroglicano β . La subunidad α se une a la laminina en la matriz extracelular, mientras que la β se une a la distrofina/utrofina en la cara intracelular de la membrana citoplasmática (Figura 2). c) El tercer complejo está formado por un grupo de proteínas transmembranales llamadas sarcoglicanos (SG) α , β , γ y δ y dos proteínas descubiertas recientemente: el sarcoglicano ϵ ,^{13,14} y el sarcospan.¹⁵ Estas proteínas, en conjunto, conforman el subcomplejo sarcoglicano-sarcospan (SG-SSPN).

A partir de estos hallazgos se incrementaron los estudios orientados a identificar nuevos genes causantes de este padecimiento, y hasta la fecha, se ha logrado descubrir 50 genes y diversas proteínas cuyas mutacio-

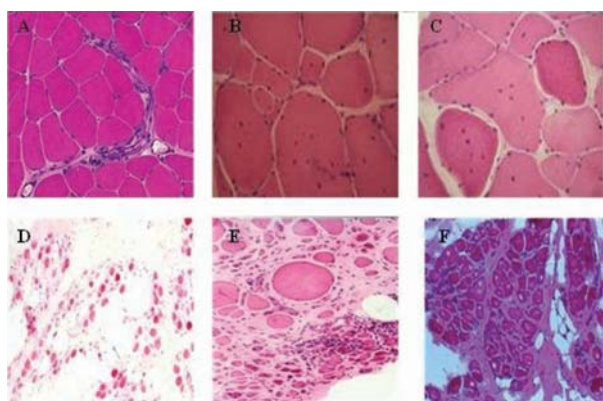


Figura 1. Distrofias musculares, hallazgos histopatológicos: A) músculo normal; B) músculo distrófico con diferencia de tamaño de fibras y centralización de núcleos; C) músculo distrófico, fibras hipertrofikas y núcleos centrales; D), E) y F) cambios distróficos severos con alteración del tamaño de las fibras, fibras hipertrofikas y sustitución de las fibras musculares por tejido fibro-adiposo en diferente grado.

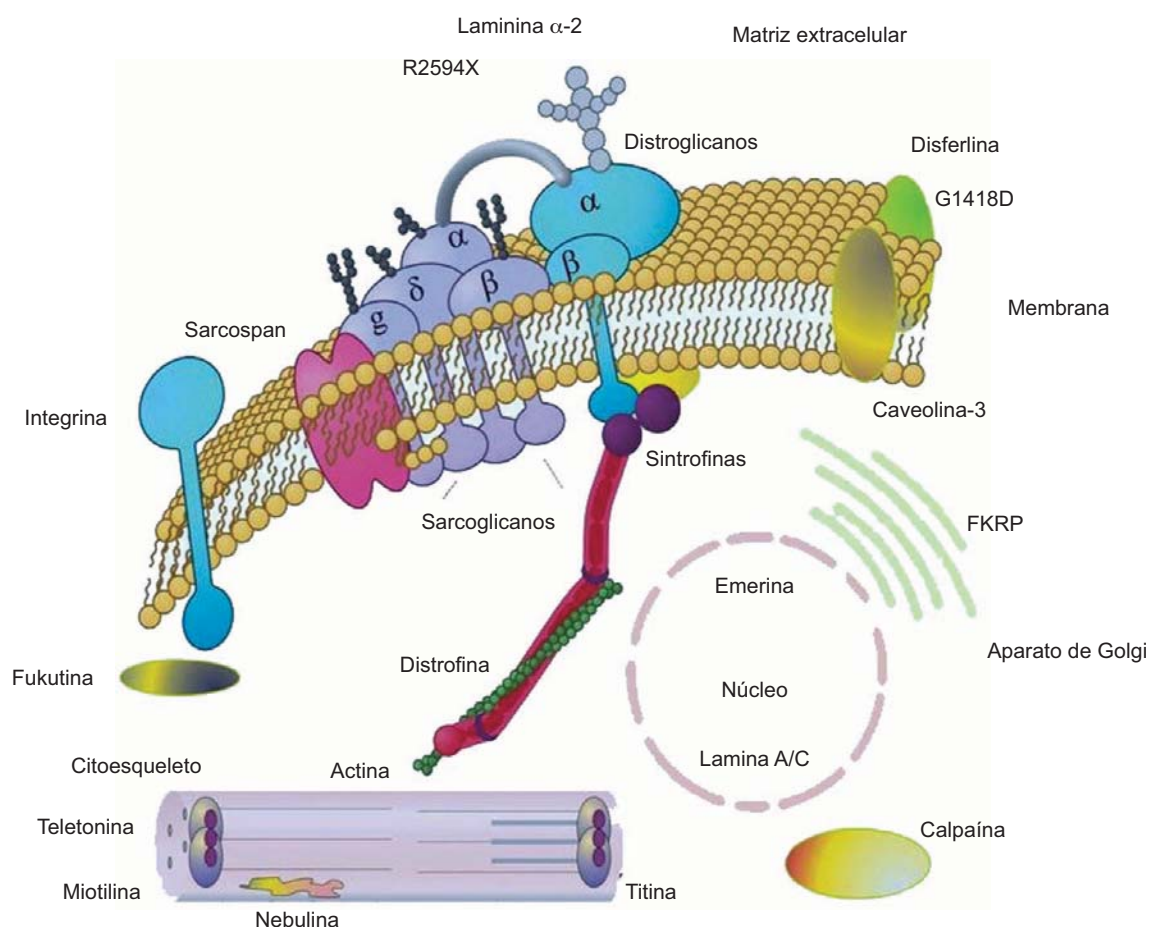


Figura 2. Esquema de una fibra muscular que muestra distintos compartimentos y proteínas asociadas con la distrofia: el citoplasmático, el transmembranal y la matriz extracelular. Dentro de los componentes de citoplasma se aprecian las proteínas distrofina y actina citoesquelética, sintrofinas, calpaína, emerina, fukutina, nebulina, miotilina y titina (proteína más grande en el humano). De las proteínas transmembranales, se ven α , β , γ y δ sarcoglicanos, así como β distroglicano, disferlina, caveolina-3 e integrina; y α distroglicano y α -2 laminina en la matriz extracelular. Las alteraciones en estas proteínas se relacionan con diversos tipos de distrofias musculares.

nes inducen algún tipo de distrofia muscular (Cuadro 1). Las proteínas implicadas en estas enfermedades están presentes en los distintos compartimentos de la fibra muscular (Figura 2): 1) entre las proteínas del sarcolema están los sarcoglicanos α , β , γ y δ ; α y β distroglicano, disferlina, caveolina (membrana plasmática) y la proteína subsarcolemal distrofina. 2) En el retículo sarcoplásmico están las proteínas POMT1, DMPK y selenoproteína. 3) Con respecto a la sarcomera, se puede mencionar a miotilina, ZASP y teletonina. 4) Algunas proteínas como fukutina, proteína relacio-

nada con fukutina, LARGE y POMGnT1 actúan en el aparato de Golgi. 5) También están incluidas algunas proteínas relacionadas con el núcleo, como emerina, laminas A y C y PABPN1. 6) Las proteínas de la matriz extracelular, entre las que se incluyen la colágena y la laminina α -2 (merosina).

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

El diagnóstico molecular de las distrofias musculares inició a partir de la identificación del gen de distrofina

causante de la enfermedad de Duchenne-Becker. Esto permitió saber que 50% de los pacientes con este padecimiento tiene grandes eliminaciones que incluyen varios exones e intrones¹⁶ localizados en dos regiones principales: “punto caliente menor (exones 1 a 12) y mayor (exones 44 a 52)”.¹⁷ A partir de esta información, Chamberlain y col.¹⁸ y Beggs y col.¹⁹ diseñaron una prueba de reacción en cadena de la polimerasa múltiple (PCR múltiple) que hace posible identificar estas mutaciones. En México, en 1997, Coral-Vázquez y col.,^{20,21} tomando en cuenta los diseños anteriores, elaboraron pruebas de PCR múltiple para el “punto caliente mayor” (Figura 3 B), y encontraron que 52% de los pacientes con Duchenne-Becker tenía eliminaciones en dicha región. Esta técnica demostró ser muy eficiente para identificar este tipo de mutaciones; sin embargo, tiene la desventaja de que sólo cubre aproximadamente 30% del gen y por tanto, no detecta otras mutaciones. Esto motivó la búsqueda de otras alternativas. En 2005, Lalic y col.²² propusieron el uso de la técnica de amplificación múltiple de sondas dependiente de ligadura (MLPA:

multiplex ligation-dependent probe amplification) para el análisis inicial del ADN de pacientes con enfermedad de Duchenne-Becker. Este método permite la identificación de eliminaciones y duplicaciones en todo el gen (Figura 3 A) y la detección de algunas mutaciones puntuales. Recientemente se detectó por MLPA, en un paciente mexicano con distrofia muscular de Duchenne, una eliminación de los exones 24 a 41 que no hubiese sido reconocida con los estudios de PCR múltiple normalmente usados.²³

Además de las pruebas de ADN para el diagnóstico de las distrofias musculares, también se utiliza la inmunofluorescencia indirecta. Mediante esta técnica se observa deficiencia de algunas proteínas causantes de distrofia muscular, y en el caso de la enfermedad de Duchenne-Becker, se recomienda que se realice en conjunto con las pruebas moleculares de ADN para identificar mutaciones. Se ha postulado que los pacientes con distrofia muscular de Duchenne normalmente no tienen proteína, y que los sujetos con distrofia de Becker muestran formas truncadas de la distrofina que son

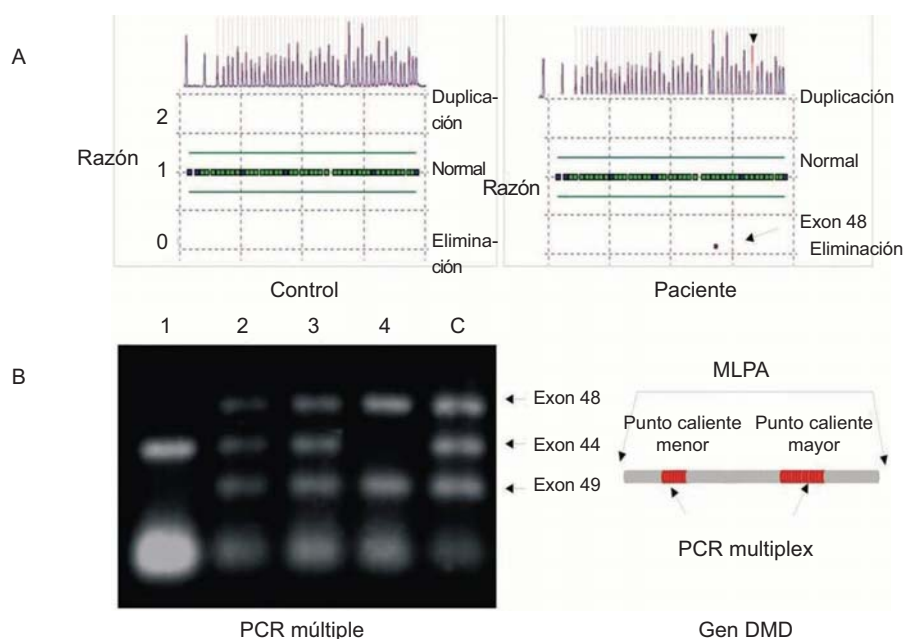


Figura 3. Detección de mutaciones en el gen DMD por PCR múltiple y MLPA. En el panel A se observa la amplificación simultánea de la mitad de los exones del gen DMD (se requieren dos reacciones de MLPA para cubrir todo el gen); cada pico representa un exón. En el individuo control, la amplificación de todos los exones se observa como fluorescencia en las regiones analizadas, mientras que en este sujeto se aprecia la eliminación del exón 48 como ausencia de un pico (flecha). En el panel B se muestra una PCR múltiple en donde se notan eliminaciones en el exón 44 y 48 de diferentes pacientes. El análisis por MLPA cubre todos los exones del gen, mientras que la PCR múltiple únicamente analiza las regiones principalmente afectadas por eliminaciones.

parcialmente funcionales; esto último se debe a que la mayor parte de las mutaciones no interrumpe el marco de lectura para la traducción, mientras que los sujetos con distrofia de Duchenne que sufren una enfermedad más severa carecen de la proteína, ya que las mutaciones sí interrumpen este marco. Este fenómeno se conoce como “hipótesis del marco de lectura” y explica alrededor de 90% de los casos,^{24,25} aunque se han reportado excepciones a esta regla.²⁶ En las Figuras 3 y 4 se registran los resultados de la inmunofluorescencia en biopsias de pacientes con distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de cinturas y distrofia congénita. En el caso del sujeto con Duchenne, se puede notar una ausencia casi total de la proteína (Figura 4 A y B), y por lo mismo se manifiesta el fenotipo grave. En la muestra del individuo con distrofia muscular de cintura (Figura 3 C y D) se determinó una disminución marcada de la proteína disferlina, la cual se ha asociado con distrofia muscular de cintura y distal. En el sujeto con distrofia muscular congénita, se percibe la ausencia total de la

proteína merosina (Figura 5 A y B).²⁷ En este último caso, se secuenciaron todos los exones del gen de la merosina y se identificó la mutación en citocina por timina (C7781T) en el codón 2578, cambiando el aminoácido arginina por un codón de terminación (Arg2578Stop). Esto provocó la ausencia de la parte final de la proteína que hace puente con proteínas de la membrana celular (Figura 5 C).²⁷

Debido a la diversidad genética y fenotípica de las distrofias musculares, en ocasiones se pueden cometer errores en el diagnóstico a pesar de que las pruebas se realicen correctamente. Un ejemplo de esto es el estudio de Schwartz y col.,²⁸ quienes inicialmente diagnosticaron a varios pacientes con distrofia muscular de Duchenne-Becker, ya que las características clínicas lo sugerían y la proteína distrofina era deficiente. Por esta razón, se buscaron infructuosamente mutaciones en el gen de distrofina. Años después se determinó que la distrofia muscular era causada por el gen relacionado con fukutina, que daba un fenotipo DMD y deficiencia secundaria de

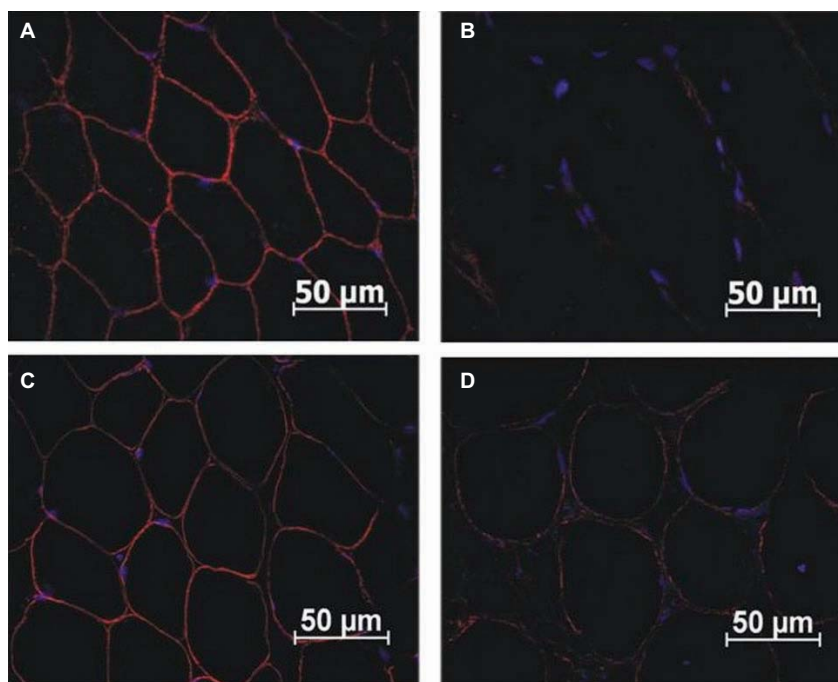


Figura 4. Detección de deficiencia de proteínas por inmunofluorescencia indirecta en biopsias musculoesqueléticas. En las figuras A y B se realizó inmunofluorescencia para distrofina y en las figuras C y D, inmunofluorescencia para disferlina. A) Se observa adecuada señal de fluorescencia en la membrana del músculo (tinción con CY3 que da señal roja y los núcleos en azul con DAPI). B) Inmunofluorescencia de paciente con distrofinopatía; se aprecia ausencia de distrofina (no hay inmunofluorescencia roja, sólo se ven los núcleos en azul). C) Control sano para la expresión de disferlina. D) Paciente con disminución en la expresión de disferlina y núcleos centrales (en azul).

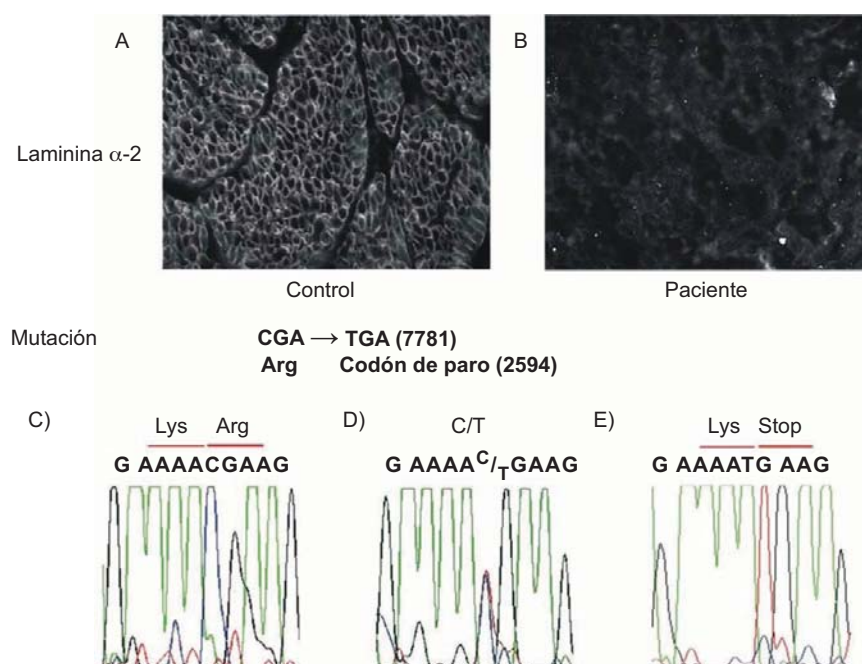


Figura 5. Deficiencia de laminina α -2. En el panel superior se pueden observar microfotografías de secciones de músculo teñido con anticuerpos específicos para laminina α -2: A) músculo de control sano; y B) paciente con distrofia muscular congénita por deficiencia de laminina α -2, se aprecia la ausencia total de la proteína en el paciente. En el panel inferior (C, D, E) se nota el cambio en el ADN del paciente mediante secuenciación. La mutación causa un codón de paro que imposibilita la producción de la proteína.

distrofina. Lo anterior pone de manifiesto que es necesario ser cuidadosos en el diagnóstico y tomar en cuenta que la investigación básica requiere amplio conocimiento sobre estas enfermedades.

CONCLUSIÓN

En la actualidad se ha generado una gran cantidad de información sobre las proteínas que tienen distintas funciones en el músculo esquelético e intervienen en la aparición de la distrofia muscular. Esto ha ocasionado que exista un nuevo panorama a explorar en cuanto a los mecanismos moleculares que originan dichas enfermedades. Dada esta complejidad genética, molecular y bioquímica, es claro que deben integrarse la investigación clínica y la investigación básica. Esto permitiría entender los mecanismos moleculares que causan estas enfermedades, así como la función del músculo normal. En conjunto, estos conocimientos podrían ser el fundamento del desarrollo de medidas terapéuticas genéticas y farmacológicas más eficientes.

REFERENCIAS

1. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 1988;53(2):219-228.
2. Monaco AP, Bertelson CJ, Colletti-Feener C, Kunkel LM. Localization and cloning of Xp21 deletion breakpoints involved in muscular dystrophy. *Hum Genet* 1987;75(3):221-227.
3. Ray PN, Belfall B, Duff C, Logan C, et al. Cloning of the breakpoint of an X;21 translocation associated with Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 1985;318(6047):672-675.
4. Thompson MW, Ray PN, Belfall B, Duff C, et al. Linkage analysis of polymorphisms within the DNA fragment XJ cloned from the breakpoint of an X;21 translocation associated with X linked muscular dystrophy. *J Med Genet* 1986;23(6):548-555.
5. Worton RG, Duff C, Sylvester JE, Schmickel RD, Willard HF. Duchenne muscular dystrophy involving translocation of the dmd gene next to ribosomal RNA genes. *Science* 1984;224(4656):1447-1449.
6. Cox GA, Phelps SF, Chapman VM, Chamberlain JS. New mdx mutation disrupts expression of muscle and nonmuscle isoforms of dystrophin. *Nat Genet* 1993;4(1):87-93.
7. Der Dunnen JT, Bakker E, Breteler EG, Pearson PL, van Ommen GJ. Direct detection of more than 50% of the Duchenne muscular dystrophy mutations by field inversion gels. *Nature* 1987;329(6140):640-642.

8. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, et al. 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(3):509-517.
9. Kunkel LM, Monaco AP, Middlesworth W, Ochs HD, Latt SA. Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X chromosome deletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82(14):4778-4782.
10. Campbell KP. Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 1995;80(5):675-679.
11. Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, Gaver MG, Campbell KP. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* 1990;345(6273):315-319.
12. Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 1992;355(6362):696-702.
13. Ettinger AJ, Feng G, Sanes JR. epsilon-Sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutated in limb-girdle muscular dystrophy 2D. *J Biol Chem* 1997;272(51):32534-32538.
14. Straub V, Ettinger AJ, Durbéej M, Venzke DP, et al. epsilon-sarcoglycan replaces alpha-sarcoglycan in smooth muscle to form a unique dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem* 1999;274(39):27989-27996.
15. Crosbie RH, Heighway J, Venzke DP, Lee JC, Campbell KP. Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem* 1997;272(50):31221-31224.
16. Forrest SM, Cross GS, Speer A, Gardner-Medwin D, et al. Preferential deletion of exons in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Nature* 1987;329(6140):638-640.
17. Wapennar MC, Klevits T, Hart KA. A deletion hot spot in the Duchenne muscular dystrophy gene. *Genomics* 1988;2(2):10-18.
18. 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.
19. Beggs AH, Hoffman EP, Snyder JR, Arahata K, et al. Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy: dystrophin gene and protein studies. *Am J Hum Genet* 1991;49(1):54-67.
20. Coral-Vazquez R, Arenas D, Cisneros B, Peñaloza L, et al. 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.
21. Coral-Vazquez R, Arenas D, Cisneros B, Peñaloza L, et al. Analysis of dystrophin gene deletions in patients from the Mexican population with Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Arch Med Res* 1993;24(1):1-6.
22. Lalic T, Vossen RH, Coffa J, Schouten JP, et al. Deletion and duplication screening in the DMD gene using MLPA. *Eur J Hum Genet* 2005;13(11):1231-1234.
23. López-Hernández LB, van Heusden D, Soriano-Ursúa MA, Figueroa-Villanueva L, et al. Genotype-phenotype discordance in Duchenne muscular dystrophy patient due to a novel mutation: insights on to the shock absorber function of dystrophin. *J Appl Genetics* 2010 (enviado).
24. Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 1988;2(1):90-95.
25. Aartsma-Rus A, van Deutekom JC, Fokkema IF, van Ommen GJ, den Dunnen JT. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve* 2006;34(2):135-144.
26. Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol* 2003;2(12):731-740.
27. Coral-Vazquez RM, Rosas-Vargas H, Meza-Espinosa P, Mendoza I, et al. Severe congenital muscular dystrophy in a Mexican family with a new nonsense mutation (R2578X) in the laminin alpha-2 gene. *J Hum Genet* 2003;48(2):91-95.
28. Schwartz M, Hertz JM, Sveen ML, Vissing J. LGMD2I presenting with a characteristic Duchenne or Becker muscular dystrophy phenotype. *Neurology* 2005;64(9):1635-1637.