

ARTÍCULO ORIGINAL

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y MOLECULARES DE PACIENTES CON DISTROFIA MUSCULAR DUCHENNE Y BECKER EN EL HOSPITAL NACIONAL GUILLERMO ALMENARA IRIGOYEN, 1997-2007.

Hugo Hernán Abarca-Barriga¹

Filiación

¹Servicio de Genética & Errores Innatos del Metabolismo, Instituto Nacional de Salud del Niño-Breña, Lima, Perú²Instituto de Investigaciones en Ciencias Biomedicas, Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú³Médico Genetista

ORCID

Hugo Hernán Abarca-Barriga: <https://orcid.org/0000-0002-0276-2557> 

RESUMEN

Introducción: Las distrofias musculares de Duchenne (DMD) y Becker (DMB) son enfermedades de herencia recesiva ligada al cromosoma X, por variantes en el gen de la distrofina. En Perú, existen estudios en población pediátrica sobre DMD/DMB. **Objetivo:** Describir las características clínicas y moleculares de pacientes con distrofia muscular de Duchenne y de Becker en el Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, 1997-2007. **Metodología:** Estudio observacional, descriptivo y transversal. Se revisaron historias clínicas de pacientes admitidos en el servicio de Citogenética y Citopatología. Se diseñó una ficha de recolección para recoger información de datos sociodemográficos edad y sexo, y la segunda sección de datos clínicos y moleculares. Para los análisis estadísticos se usó el paquete SPSS v.13. **Resultados:** De las 93 historias clínicas de pacientes con sospecha diagnóstica de distrofias musculares. Se encontró que 40 pacientes (43%) tenían diagnóstico clínico de DMD. De los cuales, 18 pacientes tenían un estudio molecular de mPCR positivo de delección en uno o más exones del gen de la distrofina. En los pacientes con delección de distrofina, casi todos fueron del sexo masculino y la edad promedio de diagnóstico fue de $6,5 \pm 1,63$ años. **Conclusion:** Se encontro que aproximadamente cuatro de cada diez de los pacientes con distrofias tuvieron diagnostico clinico de DMD. En el estudio molecular por mPCR, casi la mitad tuvieron resultado positivo de delección de uno o más exones del gen DMD.

Palabras clave: Distrofias Musculares; Enfermedades Raras; niños (Fuente: DeCS BIREME)

CLINICAL AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH DUCHENNE AND BECKER MUSCULAR DYSTROPHY OF THE GUILLERMO ALMENARA IRIGOYEN NATIONAL HOSPITAL, 1997-2007

ABSTRACT

Background: Duchenne (DMD) and Becker (BMD) muscular dystrophies are recessively inherited diseases linked to the X chromosome due to mutations in the dystrophin gene. In Peru, there are studies in the pediatric population on DMD/DMB. **Objective:** To describe the clinical and molecular characteristics of patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy at the Guillermo Almenara Irigoyen National Hospital, 1997-2007. **Methodology:** Observational, descriptive and cross-sectional study. Medical records of patients admitted to the Cytogenetics and Cytopathology service were reviewed. A collection sheet was designed to collect information on sociodemographic data, age and sex, and the second section of clinical and molecular data. For statistical analysis, the SPSS v.13 package was used. **Results:** Of the 93 clinical histories of patients with suspected diagnosis of muscular dystrophies. It was found that 40 patients (43%) had a clinical diagnosis of DMD. Of these, 18 patients had a positive molecular mPCR study of a deletion in one or more exons of the dystrophin gene. In patients with dystrophin deletion, almost all were male, and the average age of diagnosis was 6.5 ± 1.63 years. **Conclusion:** It was found that approximately four out of ten of the patients with dystrophies had a clinical diagnosis of DMD. In the molecular study by mPCR, almost half had a positive result for the deletion of one or more exons of the DMD gene.

Keywords: Muscular Dystrophies; Rare Diseases; Children (Source: MeSH NLM)

Citar como:

Abarca-Barriga HH. Características clínicas y moleculares de pacientes con distrofia muscular Duchenne y Becker en el Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, 1997-2007. Rev Pediatr Espec. 2022; 1(1): 34-39.

Correspondencia:

Hugo Hernán Abarca Barriga
hernanabar@yahoo.es;
móvil: +51979301132

Recibido:27/11/2022

Aprobado:23/12/2022

Publicado:27/12/2022



Esta es una publicación con licencia de Creative Commons Atribución 4.0 Internacional.

INTRODUCCIÓN

Las distrofias musculares son enfermedades neuromusculares de causa hereditaria, entre las más comunes son las distrofias musculares Duchenne (DMD) y Becker (DMB) de herencia recesiva ligada al cromosoma X por variantes en el gen de la distrofina (1). Estas variantes pueden generar deficiencia o ausencia de dicha proteína afectando principalmente a los músculos esqueléticos y cardíacos, dando lugar a un compromiso funcional de las fibras musculares durante la contracción y la relajación (2). En general, estas enfermedades se diagnostican entre los 2 y 6 años de edad; los signos y síntomas se presentan de forma progresiva e incluyen debilidad, caídas, disminución de la fuerza, dificultad para subir escaleras, dificultad para ponerse de pie (signo de Gowers) y caminar en puntas (3). La distrofina también se expresa en algunas células cerebrales de manera que los pacientes podrían presentar un deterioro cognitivo, por ejemplo; coeficiente intelectual bajo, dificultades de aprendizaje, entre otros (4). En pacientes con DMD, es frecuente que presenten niveles altos de creatina quinasa (CK) sérica esto debido al daño de las membranas plasmáticas de las células musculares (5).

A nivel mundial, se estima que la prevalencia de distrofias musculares es de aproximadamente 3,6 casos por cada 100 000 personas (6). Asimismo, se ha reportado que el promedio de casos de DMD y DMB es de 4,8 y 1,5 por cada 100 000 personas, respectivamente (6). La DMD es la distrofia muscular más frecuente, se estima una incidencia de 1 por cada 5136 varones nacidos vivos (7). Las personas afectadas suelen tener una esperanza de vida corta de 20 a 30 años (8). Por otro lado, la ascendencia podría jugar un papel importante, al respecto aún hace falta estudios que profundicen las características de DMD/DMB en poblaciones sudamericanas (6).

En Perú, son escasos los estudios epidemiológicos en población pediátrica sobre DMD/DMB. Sin embargo, un reporte que evaluó datos de 7829 pacientes con enfermedades genéticas entre el 2014 al 2018 del Instituto Nacional de Salud del Niño (INSN) identificó que el 0.49% tenían diagnóstico de DMD (9). Las distrofias musculares pueden afectar negativamente la calidad de vida de los pacientes, y a la vez generar dificultades emocionales, laborales y económicas en sus familias (10). En nuestro país, desde hace algunos años se viene tomando importancia de este problema, es así que en el 2011 se publicó la Ley N.º 29698 que declara de interés nacional la prevención, el diagnóstico, atención y rehabilitación de este tipo de enfermedades dentro del grupo de enfermedades raras y huérfanas (11). Asimismo, el INSN incluye a las enfermedades raras y genéticas como una de sus líneas de investigación del 2022-2025. Por otro lado, la Sociedad Peruana de Neurología publicó en el 2022 la guía de práctica clínica para el diagnóstico y tratamiento de la DMD. Algunos estudios realizados en pacientes con DMD han reportado entre el 37,5% y 57,6% presentaron deleciones de uno o más exones del gen DMD (12, 13).

Se necesita información precisa sobre el fenotipo clínico y diagnóstico molecular de las distrofias musculares en población peruana para abordar las necesidades comunes y específicas de estas enfermedades. Por ello, el objetivo del presente estudio fue describir las características clínicas y moleculares de pacientes con distrofia muscular Duchenne y Becker en el Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen (HNGAI), 1997-2007.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de estudio

Estudio observacional, descriptivo y transversal. El presente estudio se desarrolló en el servicio de genética del HNGAI desde enero de 1997 a marzo de 2007. El HNGAI es un establecimiento de nivel III-2 que pertenece al Seguro Social del Perú y es un centro de referencia nacional para todas las especialidades médicas, incluyendo la genética. El servicio de Citogenética y Citopatología cuenta con tecnología para realizar algunos diagnósticos moleculares a través del multiplex-PCR (mPCR). Entre las enfermedades que se evalúan, es el estudio de 18 deleciones del gen DMD.

Población y muestra

Se revisaron historias clínicas de pacientes admitidos en el servicio de Citogenética y Citopatología entre enero de 1997 a marzo del 2007. Se considero incluir aquellos que contaran con un estudio molecular de deleciones del gen de la distrofina y diagnóstico clínico de DMD y DMB. Se excluyeron casos con datos faltantes o incompletos de las variables de interés. El tipo de muestreo fue censal, es decir, se incluyeron a todas las historias clínicas que cumplieran los criterios de inclusión. En total se atendieron 93 pacientes en el periodo del estudio, luego de la selección de acuerdo criterios planteados la muestra final quedó conformada por 40 casos de DMD y DMB.

Variables

En la primera sección se consideraron datos sociodemográficos como: la edad y sexo. En la segunda sección datos clínicos y moleculares: edad de inicio de cuadro clínico, signo de Gowers, pseudohipertrofia de gemelos, marcha anadeante, desarrollo psicomotor, control espinal, enzimas musculares, cariotipo y deleciones del gen de la distrofina.

Procedimientos

Se diseñó una ficha de recolección para recoger información de las historias clínicas. Luego, se revisaron todas las historias clínicas, luego procedió a llenar las fichas de recolección de datos las variables de interés del presente estudio. Asimismo, se registró la información con las tomas de muestra del cariotipo en sangre periférica, enzimas musculares y gen de la distrofina. Posteriormente, los datos fueron tabulados a una base en Microsoft Excel para los análisis correspondientes.

Análisis de datos

Para los análisis estadísticos se usó el paquete SPSS v.13. Para las variables cuantitativas se calcularon medidas de tendencia central y dispersión, como medias y desviaciones estándar. En cuanto a las variables categóricas fueron presentadas en frecuencias absolutas y relativas. Asimismo, para la presentación de los resultados se usaron tablas y gráficos de acuerdo al tipo de variable.

Aspectos éticos

En el presente estudio se cumplieron con los principios éticos de la Declaración de Helsinki. Se mantuvo la confidencialidad de la información de las historias clínicas, reemplazando los nombres y apellidos por un código de esta manera conservando el anonimato y seguridad de los datos utilizados para fines de la investigación. Previamente, se tuvo autorización del servicio de Citogenética y Citopatología, así como del comité de ética del HNGAI.

RESULTADOS

De las 93 historias clínicas revisadas de pacientes con sospecha diagnóstica de distrofias musculares del HNGAI entre el 1997 al 2007, el 73,6% eran del sexo masculino y la edad promedio fue 13,8 ± 4,0 años. Se encontró que 40 pacientes (43% del total) tenían diagnóstico clínico de DMD y ninguno de DMB. De los cuales, 18 pacientes tenían un estudio molecular mPCR positivo de delección en uno o más exones del gen de la distrofina.

Tabla 1. Características generales de pacientes con sospecha clínica de distrofia muscular, HNGAI, 1997-2007.

Características	n (%)
Sexo	
Masculino	68 (73,6)
Femenino	25 (26,4)
Edad* (en años)	13,8 ± 4,0
Procedencia	
Lima metropolitana	47 (50,0)
Callao	8 (9,0)
Otros	38 (41,0)
Diagnóstico clínico de DMD/DMB	
Si	40 (43,0)
No	53 (57,0)
Estudio molecular mPCR (n=40)	
Negativo	22 (55,0)
Positivo	18 (45,0)

En los pacientes con delección de distrofina, la edad promedio de diagnóstico fue de 6,5 ± 1,63 años y tenían un promedio de la CPK total de 14037 ± 2070 (UI/ml). En el grupo sin delección de distrofina, el promedio de desarrollo psicomotor de control espinal fue a los 8,4 ± 2,02 meses.

Tabla 2. Características clínicas de pacientes diagnóstico de distrofia muscular Duchenne y Becker. HNGAI. 1997-2007.

Características	Con delección de distrofina N = 18 (45%)	Sin delección de distrofina N = 22 (55,0)
	Media (DS)	Media (DS)
Edad de diagnóstico* (años)	6,5 ± 1,63	5,2 ± 1,91
Edad de inicio de síntomas* (años)	2,95 ± 1,47	3,1 ± 1,09
Peso al nacer* (kg)	3,47 ± 0,47	3,32 ± 0,72
Edad del desarrollo psicomotor* (meses)		
Control espinal	6,8 ± 2,09	8,4 ± 2,02
Primeros pasos	17,44 ± 3,41	19,85 ± 4,54
Primeras palabras	19 ± 12,92	25 ± 22,6
Enzimas*		
CPK TOTAL (UI/ml)	14037 ± 2070	6270 ± 4567
CPK-MB (UI/ml)	3170 ± 2088	144 ± 207,1
DHL (UI/ml)	5238 ± 1626	1108 ± 727,1

En el análisis subgrupo de 18 pacientes con resultado positivo mPCR de delecciones del gen DMD, la mayoría 94,4% eran del sexo femenino. En relación a las características moleculares, el 77,8% tenían como diagnóstico molecular DMD, el 58,8% tenían delecciones en la región central y la mitad tenían una sola delección. Asimismo, los signos y síntomas más frecuentes fueron presencia pseudohipertrofia de gemelos y signo de Gowers.

Tabla 3. Características moleculares y sintomatología de pacientes con delección de distrofina. HNGAI. 1997-2007.

Características	n (%)
Sexo	
Masculino	17 (94,4)
Femenino	1 (5,6)
Diagnóstico molecular	
DMD	14 (77,8)
DMB	4 (22,2)
Tipo de mutación	
<i>in frame</i>	4 (22,2)
<i>out of frame</i>	14 (77,8)
Delecciones según región	
Proximal (exones 1 - 19)	7 (41,2)
Central (exones 43 - 60)	11 (58,8)
Numero de delecciones	
1	9 (50,0)
2	3 (16,7)
3	3 (16,7)
4	1 (5,6)
6	2 (11,1)
Presencia de signos y síntomas	
Pseudohipertrofia de gemelos	9 (50,0)
Signo de Gowers	8 (44,4)
Camina de puntas	4 (22,2)
Marcha anadeante	2 (11,1)
Discapacidad intelectual	2 (11,1)
Hipotonía	1 (5,5)
Escoliosis	0 (0)

De los 18 pacientes con delección de distrofina. El tipo de variante más frecuente fue de *out of frame*. La mayoría tenían un fenotipo observado como DMD. Solo un paciente (p74) tuvo una alteración cromosómica (síndrome Klinefelter) con delecciones en los exones 48 y 50. El paciente 26 y otra paciente de 4 años (p58) presentó taquicardia sinusal.

Tabla 4. Resultados de los 18 pacientes con estudio molecular positivo mPCR. HNGAI. 1997-2007.

Código de Paciente	Diagnóstico Molecular (Delección de exones)	N° Delecciones Encontradas	Fenotipo observado	Tipo de Variante	Fenotipo esperado
p13	51	1	DMD	<i>Out of frame</i>	DMD
p31	13-43	2	DMD	<i>In frame</i>	DMB
p32	8	1	DMD	<i>Out of frame</i>	DMD
p48	43	1	DMD	<i>Out of frame</i>	DMD
p50	43	1	DMB	<i>Out of frame</i>	DMD
p51	43	1	DMD	<i>Out of frame</i>	DMD
p55	48-50	3	DMD	<i>In frame</i>	DMB
p56	48-50	3	DMD	<i>In frame</i>	DMB
p58	43	1	DMD	<i>Out of frame</i>	DMD
p61	3-19	6	DMD	<i>Out of frame</i>	DMD
p69	60	1	DMD	<i>Out of frame</i>	DMD
p74	48-50	2	DMD	<i>In frame</i>	DMB
p75	3-19	6	DMD	<i>Out of frame</i>	DMD
p79	3	1	DMD	<i>Out of frame</i>	DMD
p82	45-50	4	DMD	<i>Out of frame</i>	DMD
p83	48-50	2	DMD	<i>Out of frame</i>	DMD
p86	3	1	DMD	<i>Out of frame</i>	DMD
p93	8-12	3	DMD	<i>Out of frame</i>	DMD

DISCUSIÓN

De los 40 pacientes con diagnóstico presuntivo de DMD/DMB, se encontró que el 45% presentó alguna delección del gen DMD de la distrofina. Un estudio realizado en el 2019 en 40 pacientes con diagnóstico presuntivo de DMD/DMB encontró que el 37.5% presentaron una o más delecciones de exones del gen DMD (12). Otro estudio en el 2021 realizado en 152 pacientes con sospecha de distrofia muscular encontraron que 125 tuvieron alguna mutación del gen DMD, de los cuales 41.6% presentaron delecciones, 16% duplicaciones y el 42,4% mutaciones puntuales (13). Sin embargo, estos dos estudios peruanos a diferencia del nuestro fueron realizados usando la técnica de amplificación múltiple dependiente de ligación por sondas (MLPA), esta técnica es basada en sondas genéticas que detecta delecciones y duplicaciones de todos los exones, especialmente para aquellas delecciones de tamaño mediano que no pueden ser detectadas por el mPCR(14, 15).

En la literatura se ha descrito que aproximadamente el 65% de los casos de la DMD son asociados con delecciones, y un 5 a 10% de duplicaciones y el resto a una variedad de variantes puntuales, delecciones intrónicas puras, inserciones exónicas de secuencias repetitivas (16). Aunque las delecciones pueden ocurrir en cualquier lugar, la mayoría ocurre en dos regiones (hotspots), alrededor de los primeros 20 exones y alrededor de los exones 45 y 55(17). Estos dos hotspots, representan la base para el uso del mPCR con sólo 19 exones, identificando así el 98% de todas las delecciones. En relación a esto, la Sociedad Peruana de Neurología desarrollo una guía de práctica clínica que formula una recomendación fuerte a favor y con certeza baja del uso de la prueba de MLPA para el diagnóstico de pacientes con DMD.

En aquellos pacientes con diagnóstico clínico de DMD/DMB, más estudio molecular positivo de mPCR, se hallaron diferencias en el peso al nacer, desarrollo psicomotor y las enzimas esto se podría deber a que las delecciones encontradas (en los pacientes con fenotipo severo) se estarían comportando como variantes tipo out-of-frame, evitando así la producción de la proteína de la distrofina. En nuestro estudio, la edad promedio en el momento de evaluación molecular fue 6,5 años en pacientes con DMD/DMB. Esta cifra es relativamente superior a estudios realizados en Italia, Irán y Noruega que han informado edades promedios de 3,90, 4,00 y 5,05 años, respectivamente (18-20). Además, un estudio peruano realizado en cuatro establecimientos de referencia nacional entre el 2015 al 2018 reportaron una edad promedio de 9,8 años para la evaluación molecular. Estas diferencias podrían estar reflejando que han está pendiente realizar avances tecnológicos en el análisis genético, así como una mayor importancia en la práctica clínica en los profesionales de salud. En Perú, las distrofinopatías son enfermedades raras que no tienen una suficiente relevancia en el sistema público para destinarse recursos económicos y humanos en la prevención, diagnóstico y tratamiento(21). Además, no todas las personas tienen acceso al diagnóstico molecular debido a los altos costos y sobretodo de la falta de interés en la implementación de las pruebas genéticas como MLPA, más aun de forma particular en laboratorios comerciales(22).

En Australia, se reportó el caso de un paciente con distrofia muscular de Becker y con síndrome de Klinefelter, con un fenotipo más leve comparando con lo que tenían su primos, explicado por una compensación de dosis por el cromosoma X "extra"(23). Por nuestro lado, evaluamos a un paciente de 7 años (p74) con delecciones en los exones 48 y 50, con estudio citogenético de 47,XXY (Síndrome Klinefelter), este paciente presentó el siguiente fenotipo de DMD: edad de inicio desde los

primeros meses de vida, con retraso psicomotor, hipertrofia de gemelos, signo de Gowers, con CPK sanguíneo de 21 246 UI/ml y DHL de 7648 UI/ml. Esto difiere a lo publicado por GK. Suthers, et al (23), infiriendo que también en este paciente se presentó una inactivación del cromosoma X "extra" por un mecanismo de impronta(23).

Si bien, los padres de familia suelen ser los primeros en notar los síntomas de sus hijos con probable DMD, motivo por el cual acuden a un profesional de la salud. Es importante fortalecer la educación médica en estas enfermedades genéticas (24), desde su sintomatología hasta las posibilidades terapéuticas disponibles, con el fin de que al momento de solicitar los estudios auxiliares (bioquímicos, electromiográficos, moleculares, etc) sean los más concordantes con la clínica del paciente, para que el diagnóstico de la enfermedad sea más temprana; el cual además repercutirá en un asesoramiento genético exacto, permitiendo la búsqueda de pacientes precozmente, así como la detección de portadoras (25). La prueba de creatina fosfoquinasa (CPK) podría enfatizarse en la atención primaria como una prueba de rutina en los exámenes de los niños con sospecha de esta enfermedad (26,27).

Entre las limitaciones del estudio, el presente estudio su recolección fue retrospectiva de manera que podría existir un sesgo de información ya que la información ha sido registrada por terceros en historias clínicas. Por otro lado, sesgo de selección ya que el estudio comprende un solo establecimiento de salud, aunque es un centro de referencia nacional en el tercer nivel del seguro social. Si bien, el diseño fue descriptivo se espera que los aportes sirvan para el de planteamiento futuros estudios prospectivos o analíticos. En este sentido, sería recomendable se realicen futuros estudios multicéntricos de manera más representativa e incluya en la evaluación más variables clínicas, moleculares y epidemiológicas

CONCLUSIÓN

En conclusión, se encontro que aproximadamente cuatro de cada diez de los pacientes con distrofias tuvieron diagnóstico clínico de DMD. En el estudio molecular por mPCR, casi la mitad tuvieron resultado positivo de delección de uno o más exones del gen DMD. Asimismo, la edad al momento del diagnóstico molecular fue ligeramente superior a lo reportado por otros estudios.

Agradecimientos

A la Unidad de Diseño y Elaboración de Proyectos de Investigación de la Oficina Ejecutiva de Apoyo a la Investigación y Docencia Especializada (OEAIDE), por el apoyo en la búsqueda bibliográfica para el presente manuscrito.

Conflictos de interés: El autor declara no presentar ningún conflicto de interés.

Financiamiento: Autofinanciado por los investigadores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mercuri E, Muntoni F. Muscular dystrophies. *Lancet*. 2013;381(9869):845-60. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61897-2.
2. Hegde MR, Chin EL, Mülle JG, Okou DT, Warren ST, Zwick ME. Microarray-based mutation detection in the dystrophin gene. *Hum Mutat*. 2008;29(9):1091-9. doi: 10.1002/

- humu.20831.
3. Birnkrant DJ, Bushby K, Bann CM, Apkon SD, Blackwell A, Brumbaugh D, Case LE, Clemens PR, Hadjiyannakis S, Pandya S, Street N, Tomezsko J, Wagner KR, Ward LM, Weber DR; DMD Care Considerations Working Group. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management. *Lancet Neurol.* 2018;17(3):251-267. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30024-3.
 4. Turner C, Hilton-Jones D. The myotonic dystrophies: diagnosis and management. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2010; 81(4):358-67. doi: 10.1136/jnnp.2008.158261.
 5. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, Kaul A, Kinnett K, McDonald C, Pandya S, Poysky J, Shapiro F, Tomezsko J, Constantin C; DMD Care Considerations Working Group. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.* 2010;9(1):77-93. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70271-6.
 6. Salari N, Fatahi B, Valipour E, Kazeminia M, Fatahian R, Kiaei A, Shohaimi S, Mohammadi M. Global prevalence of Duchenne and Becker muscular dystrophy: a systematic review and meta-analysis. *J Orthop Surg Res.* 2022;17(1):96. doi: 10.1186/s13018-022-02996-8.
 7. Stark AE. Determinants of the incidence of Duchenne muscular dystrophy. *Ann Transl Med.* 2015 ;3(19):287. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.10.45.
 8. Broomfield J, Hill M, Guglieri M, Crowther M, Abrams K. Life Expectancy in Duchenne Muscular Dystrophy: Reproduced Individual Patient Data Meta-analysis. *Neurology.* 2021;97(23):e2304-e2314. doi: 10.1212/WNL.00000000000012910.
 9. Guio H, Poterico JA, Levano KS, Cornejo-Olivas M, Mazzetti P, Manassero-Morales G, Ugarte-Gil MF, Acevedo-Vásquez E, Dueñas-Roque M, Piscocoya A, Fujita R, Sanchez C, Casavilca-Zambrano S, Jaramillo-Valverde L, Sulcahuaman-Allende Y, Iglesias-Pedraz JM, Abarca-Barriga H. Genetics and genomics in Peru: Clinical and research perspective. *Mol Genet Genomic Med.* 2018;6(6):873-886. doi: 10.1002/mgg3.533.
 10. Theadom A, Rodrigues M, Roxburgh R, Balalla S, Higgins C, Bhattacharjee R, Jones K, Krishnamurthi R, Feigin V. Prevalence of muscular dystrophies: a systematic literature review. *Neuroepidemiology.* 2014;43(3-4):259-68. doi: 10.1159/000369343.
 11. Ley N° 29698, Ley que declara de Interés Nacional y Preferente Atención el Tratamiento de personas que padecen Enfermedades Raras o Huérfanas. Lima, Peru. 2011.
 12. Huamán-Dianderas Francia DP., Guevara-Fujita María Luisa, Málaga Diana Rojas, Estrada-Cuzcano Alejandro, Fujita Ricardo. Detección de mutaciones causantes de distrofia muscular de Duchenne/Becker: reacción en cadena de la polimerasa Multiplex vs. Amplificación múltiple dependiente de ligación por sondas. *Rev. perú. med. exp. salud pública.* 2019;36(3):475-480. DOI <http://dx.doi.org/10.17843/rpmpesp.2019.363.4085>.
 13. Guevara-Fujita ML, Huaman-Dianderas F, Obispo D, Sánchez R, Barrenechea V, Rojas-Málaga D, Estrada-Cuzcano A, Trubnykova M, Cornejo-Olivas M, Marca V, Gallardo B, Dueñas-Roque M, Protzel A, Castañeda C, Abarca H, Celis L, La Serna-Infantes J, Fujita R. MLPA followed by target-NGS to detect mutations in the dystrophin gene of Peruvian patients suspected of DMD/DMB. *Mol Genet Genomic Med.* 2021 Sep;9(9):e1759. doi: 10.1002/mgg3.1759.
 14. Murugan S, Chandramohan A, Lakshmi BR. Use of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) for Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene mutation analysis. *Indian J Med Res.* 2010;132:303-11.
 15. Verma PK, Dalal A, Mittal B, Phadke SR. Utility of MLPA in mutation analysis and carrier detection for Duchenne muscular dystrophy. *Indian J Hum Genet.* 2012;18(1):91-4. doi: 10.4103/0971-6866.96667.
 16. Camacho Salas A. Distrofia muscular de Duchenne. *An Pediatr Contin.* 2014;12(2):47-54.
 17. Vieitez I, Gallano P, González-Quereda L, Borrego S, Marcos I, Millán JM, Jairo T, Prior C, Molano J, Trujillo-Tiebas MJ, Gallego-Merlo J, García-Barcina M, Fenollar M, Navarro C. Mutational spectrum of Duchenne muscular dystrophy in Spain: Study of 284 cases. *Neurologia.* 2017;32(6):377-385. English, Spanish. doi: 10.1016/j.nrl.2015.12.009. .
 18. Magri F, Govoni A, D'Angelo MG, Del Bo R, Ghezzi S, Sandra G, Turconi AC, Sciacco M, Ciscato P, Bordoni A, Tedeschi S, Fortunato F, Lucchini V, Bonato S, Lamperti C, Coviello D, Torrente Y, Corti S, Moggio M, Bresolin N, Comi GP. Genotype and phenotype characterization in a large dystrophinopathic cohort with extended follow-up. *J Neurol.* 2011;258(9):1610-23. doi: 10.1007/s00415-011-5979-z.
 19. Zamani G, Hosseinpour S, Ashrafi MR, Mohammadi M, Badv RS, Tavasoli AR, Akbari MG, Bereshneh AH, Malamiri RA, Heidari M. Characteristics of disease progression and genetic correlation in ambulatory Iranian boys with Duchenne muscular dystrophy. *BMC Neurol.* 2022;22(1):162. doi: 10.1186/s12883-022-02687-1.
 20. Annexstad EJ, Fagerheim T, Holm I, Rasmussen M. Molecular and Clinical Characteristics of a National Cohort of Paediatric Duchenne Muscular Dystrophy Patients in Norway. *J Neuromuscul Dis.* 2019;6(3):349-359. doi: 10.3233/JND-190402.
 21. Lizaraso Caparó Frank, Fujita Ricardo. Rare or orphan diseases: more orphan than rare in Peru. *Horiz. Med.* 2018; 18(2): 4-5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.24265/horizmed.2018.v18n2.01>.
 22. Claussen-Portocarrero Grecia, Gutierrez-Aguado Alfonso. Características socioeconómicas y costos de enfermedades raras y huérfanas en el Perú, 2019. *Rev. Fac. Med. Hum;* 21(4): 732-740. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.25176/rfmh.v21i4.3936>.
 23. Suthers GK, Manson JI, Stern LM, Haan EA, Mulley JC. Becker muscular dystrophy (BMD) and Klinefelter's syndrome: a possible cause of variable expression of BMD

- within a pedigree. *J Med Genet.* 1989;26(4):251-4. doi: 10.1136/jmg.26.4.251.
24. Flores A, Burgos S, Abarca-Barriga H. Knowledge level of medical students and physicians about rare diseases in Lima, Peru. *Intractable & Rare Diseases Research.* 2022; 11(4):180-188.
25. Bello L, Pegoraro E. Genetic diagnosis as a tool for personalized treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol.* 2016;35(3):122-127.
26. De Freitas Nakata KC, da Silva Pereira PP, Salgado Riveros B. Creatine kinase test diagnostic accuracy in neonatal screening for Duchenne Muscular Dystrophy: A systematic review. *Clin Biochem.* 2021;98:1-9. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2021.09.010.
27. Cardon MW. 50 Years Ago in The Journal of Pediatrics: An Assessment of the Creatine Kinase Test in the Detection of Carriers of Duchenne Muscular Dystrophy. *J Pediatr.* 2017;186:63. doi: 10.1016/j.jpeds.2017.01.027