



O uso da PTT para Triagem de Mutações em Pacientes DMD/DMB

Identificação de Mutações de ponto pela Técnica do PTT (Teste da Proteína Truncada): o exemplo das distrofias de Duchenne e Becker

Fotos e gráficos cedidos pelas autoras

Dulci do Nascimento Fonseca Vagenas.

Doutoranda em Biotecnologia-USP-SP.
duduvagenas@botmail.com

Mayana Zatz

Profª Drª e Coordenadora do Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH).
mayazatz@ib.usp.br

1. Introdução:

○ Teste da Proteína Truncada (PTT – “Protein Truncated Test”), desenvolvido por Roest e cols.(1993), detecta mutações que causam uma parada na tradução da proteína; hoje em dia essa técnica está sendo utilizada para auxiliar no diagnóstico de várias doenças genéticas que podem ser causadas por muitas mutações, principalmente aquelas que introduzem um código de parada como os genes BRCA1 e BRCA2, responsáveis por 10% dos casos de câncer de mama, a fibrose cística, a anemia de Fanconi, a neurofibromatose e Distrofia Muscular tipo Duchenne e Becker (DMD/DMB), entre outras. Nessas doenças, o seqüenciamento automático torna-se muitas vezes, inviável, devido ao tamanho do gene. Em nosso laboratório, o diagnóstico pela técnica da PTT tem auxiliado na iden-

tificação de mutações de ponto em pacientes com DMD/DMB que não têm deleções no gene da distrofina.

A DMD é a forma mais comum e mais grave entre as várias formas da Distrofia Muscular Progressiva. Tem uma incidência de 1:3.000 recém-nascidos do sexo masculino. Os meninos afetados com DMD são aparentemente normais ao nascimento apesar de que o processo de degeneração muscular já se ter iniciado, o que pode ser comprovado pelo aumento significativo da enzima muscular creatino-quinase (CK) no soro sanguíneo.

A maioria dos casos tem início tardio da deambulação, geralmente aos 18 meses de idade. Entretanto, os primeiros sinais clínicos da doença são notados aos 3-5 anos de idade e iniciam-se com fraqueza muscular dos membros inferiores e da cintura pélvica, andar basculante, pseudo-hipertrofia das panturrilhas, dificuldades em subir escada e manobra de Gowers (ou levantar miopático, que é uma forma característica de levantar-se devido à fraqueza dos músculos proximais) ao se levantarem do chão. A perda da ambulação surge entre os 7-12 anos, com idade média de 10 anos. Após essa fase, aparecem as contraturas nos joelhos, pulsos, cotovelos e quadril, além de deformidades da coluna, decorrente da má postura. Com a progressão da doença, ocorre insuficiência cardíaca e respiratória. Os pacientes, raramente se reproduzem. Cerca de um terço dos meninos com DMD tem

algum tipo de retardo mental (fig.1).

A DMB é menos grave e tem uma incidência de 1:30.000 meninos nascidos vivos. Os pacientes com esse tipo de distrofia apresentam fraqueza muscular semelhante à da DMD, mas as manifestações clínicas são mais lentas, leves e variáveis. A idade de início dos primeiros sinais clínicos é de 5 a 15 anos, e a perda da deambulação ocorre após os 16 anos de idade, mas é muito variável, podendo ocorrer até depois da 6ª década (fig.2).

As DMD/DMB são causadas por uma mutação em um mesmo gene que está localizado no braço curto do cromossomo X, na região Xp21 e, por isso, ambas são denominadas de distrofias Xp21.

O mapeamento do gene da DMD/DMB em Xp21 foi possível a partir de estudos em mulheres com quadro clínico de DMD e translocação X/autossomo, cuja quebra era sempre em Xp21. Em 1984, verificou-se que vários marcadores genéticos da região Xp21 segregavam tanto com o fenótipo da DMD como da DMB, sugerindo pela primeira vez que as duas doenças eram alélicas.

O gene da DMD/DMB foi clonado em 1987 e verificou-se que era o maior gene humano já descoberto, com cerca de 79 exons dispersos em aproximadamente 2400 Kb de DNA. Esse gene sozinho é quase do mesmo tamanho que a bactéria “Xylella” responsável pelo “amarelinho”, a doença dos laranjais. O gene DMD/DMB codifica



Fig. 1: Pseudo-hipertrofia das panturrilhas de um menino de 5 anos com DMD, devido à substituição do tecido muscular normal por tecido conjuntivo



Fig. 2: Paciente adulto com DMB, apresentando pseudo-hipertrofia das panturrilhas

uma proteína interna do sarcolema, chamada distrofina. A taxa de mutação do gene da distrofina é alta, na ordem de 7×10^{-5} , e pode ser justificada pelo grande tamanho do gene e, conseqüentemente, à grande quantidade de processamento que ocorre no RNAm após a transcrição.

A distrofina tem peso molecular de 427Kda, sua seqüência de aminoácidos foi deduzida a partir da seqüência de nucleotídeos e permitiu o reconhecimento de quatro domínios diferentes, sendo que três deles mostram semelhanças com outras proteínas esqueléticas. Esses domínios são conhecidos como: domínio N-terminal; domínio em bastão; domínio rico em cisteína e domínio C-terminal (fig.3).

A distrofina localiza-se na superfície interna da membrana muscular, ligando-se a glicoproteínas compondo um

complexo denominado distrofina-glicoproteínas associadas (DGA). A função da proteína distrofina provavelmente está relacionada com a manutenção da integridade do citoesqueleto muscular (fig.4). Ela parece ter um papel importante na estabilização ou localização desse complexo e na sua ausência ocorre desestruturação deste e, conseqüentemente, degeneração muscular.

Estudos realizados em pacientes com DMD e DMB, mostraram que 60% das mutações intragênicas correspondem a deleções, 5-6% são duplicações e o restante são devido a mutações de ponto. Estudos moleculares constataram que as deleções podem ser encontradas ao longo do gene, porém existem duas regiões, uma no início (exons 1-20) e outra na região central do gene (exons 41-54), que concentram a maior parte das mutações. Tais regiões têm sido consideradas como "hot spots" (pontos quentes) de mutações.

Pacientes com DMD/DMB têm um aumento significativo (até 2.000 vezes os valores normais) da enzima sérica creatino-quinase (CK), que é liberada do músculo distrófico mesmo antes do aparecimento dos sinais clínicos. Os níveis da CK tendem a diminuir no sangue com a evolução do processo e chegam a níveis quase normais em estágios adiantados da doença.

Na DMD a proteína distrofina está ausente enquanto na DMB ela está reduzida em quantidade ou em tamanho. Nos pacientes com deleção, a diferença entre a DMD/DMB depende da manutenção ou não do quadro de leitura do RNA mensageiro; isto é na DMB, a deleção é em fase, o quadro de leitura é mantido e tem-se como resultado uma proteína quantitativamente reduzida ou de tamanho reduzido, mas parcialmente funcional. Na DMD, a deleção é fora de fase, o quadro de leitura do RNA mensageiro não é mantido, tem-se uma proteína truncada e que é rapidamente destruída pela célula. Além disso, o sítio da deleção também é importante, se ocorre nas regiões N ou C-terminal de ligação de outras proteínas o quadro é mais grave do que se a deleção for na região central do gene (fig.5).

Cerca de 1/3 dos casos de DMD são causados por mutações novas e os restantes 2/3 são herdados de mães portadoras. A maioria das mulheres portadoras de mutações no gene da distrofina são assintomáticas, tendo um risco de 50% de passar o gene para seus filhos e metade de suas filhas portadoras, porém clinicamente normais. Aproximadamente 10% das mães de casos isolados de DMD têm mosaïcismo gonadal, podendo ser portadoras da mutação na linhagem germinativa.

O método da PTT é importante para famílias de Duchenne/Becker onde não foram encontradas deleção ou duplicação, pois essa técnica permite identificar mutações de ponto. Por outro lado, a triagem dessas mutações no gene da distrofina é muito difícil devido ao tamanho gigantesco do gene, o que torna inviável o seu seqüenciamento. A identificação e a caracterização das mutações de ponto é muito importante para o diagnóstico de casos onde os métodos tradicionais não são informativos, para o aconselhamento genético dos casais em risco como também

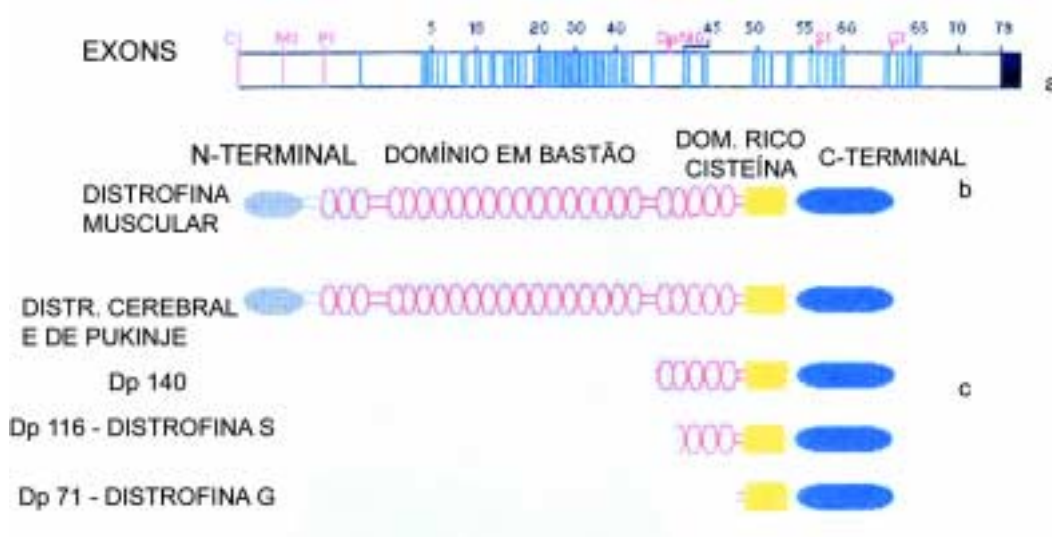


Fig. 3: a) Esquema dos 79 exons do gene da distrofina; b) e os quatro domínios: N-terminal; domínio em bastão; domínio rico em cisteína; domínio C-terminal; c) isoformas da distrofina

Tabela 1: Combinações de primers de PCR para RT-PCR e PTT*.

PCR	1º PCR primers	2º PCR primers	EXON	(bp)	(kDa)
1	1 AH	1CD	2-11	1257	47
2	1GB	1EF	10-18	1175	44
3	2AH	2CD	17-25	1243	46
4	2GB	2EF	23-32	1410	52
5	3AH	3CD	31-38	1092	41
6	3GB	3EF	36-45	1486	55
7	4 AH	4CD	44-52	1309	49
8	4GB	4EF	51-59	1429	51
9	5AH	5CD	59-68	1382	52
10	5GB	5EF	67-79	1380	52

*Roest e cols, 1993; Gardner e cols, 1995

para um melhor entendimento da função de cada região do gene.

2. Método

A vantagem da PTT é que ela pode ser empregada utilizando-se sangue periférico, que é relativamente fácil de se conseguir, e que portadoras da mutação também podem ser identificadas por esse método.

Para a realização dessa técnica, o RNA é isolado a partir de linfócitos; é feita uma transcrição reversa e a seguir, o cDNA é amplificado por PCR.

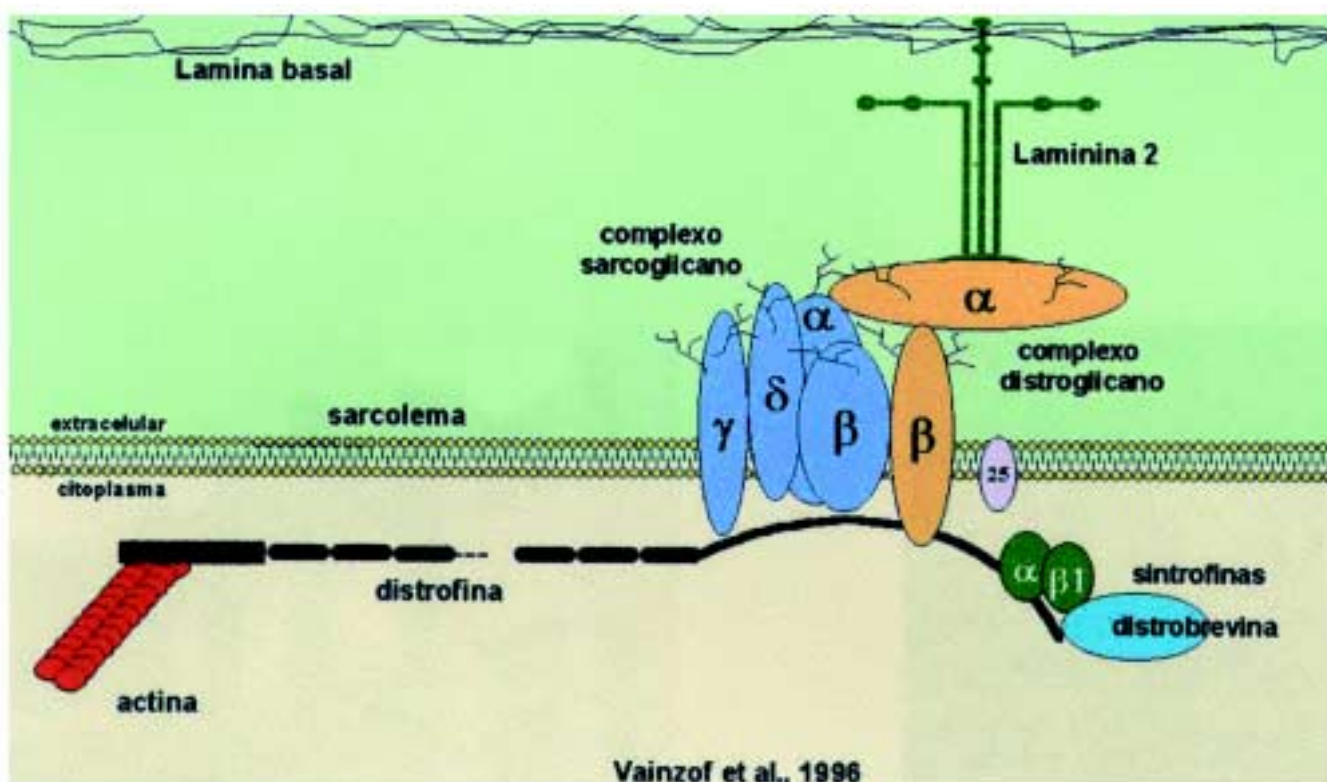


Fig. 4: Organização do Complexo distrofina-glicoproteínas associadas (adaptada de Vainzof *et al*, 1996; Gentileza da Dra. Mariz Vainzof, Centro de Estudos do Genoma Humano, IBUSP)

Tabela 2: Custo e Sensibilidade dos Métodos para Detecção de Mutações

	PTT	SSCP	Mismatch	DGGE	DHPLC	Seqüenciamento
Custo	US \$30 c/Metionina (Kit Promega)	US \$200	US \$150	US \$100	US \$190	US \$1100
	US\$40 c/biotina (Kit Promega)					
	US \$47 c/biotina (Kit Boehringer Mannhein-Roche)					
Eficiência	50-95%	60-95%	99%?	99%	99%	99%

Então um segundo PCR é realizado, utilizando um oligo modificado, contendo um promotor T7 e uma seqüência de iniciação da tradução, o que permite uma tradução *in vitro* do produto da PCR. O aparecimento de peptídeos menores que o esperado indica o local do sítio da mutação e, desse modo, apenas uma parte do gene precisa ser seqüenciada (fig.6)

2.1) Extração de RNA

A extração de RNA é realizada a partir de sangue total utilizando-se a técnica de Trizol™ (Life Technologies), coletado-se 10 ml de sangue com 0,4 ml de EDTA 5% (fig.7).

2.2) Realização da Reação Reverse Transcriptase (RT)

Reação da RT (cDNA) é feita com uma transcrição reversa, utilizado-se o Kit (Expand™ Reverse Transcriptase - Boehringer Mannheim). O cDNA é amplificado por PCR, utilizando o Kit (Expand™ Long Template PCR System - Boehringer Mannheim-Roche). Para a segunda reação da PCR, são utilizados *primers* específicos que contenham um promotor T7 e uma seqüência de iniciação da tradução do produto da PCR (tabela 1).

2.3) Gel de Agarose

Para controle da qualidade da reação da PCR, é utilizado um gel de agarose 1,5%, e como controle vai ser utilizado um marcador de 1 Kb (fig.8).

2.4) PTT

Para o estudo da PTT, utilizamos o Kit PromegaTNT T7 Quick + Metionina (Amersham Biosciences); o tamanho da proteína é avaliado por eletroforese em gel de SDS-PAGE. A presença de um polipeptídeo truncado indica a ocorrência de um códon de terminação prematuro, o que permite selecionar o fragmento que deve ser seqüenciado (fig.9).

2.5) Seqüenciamento

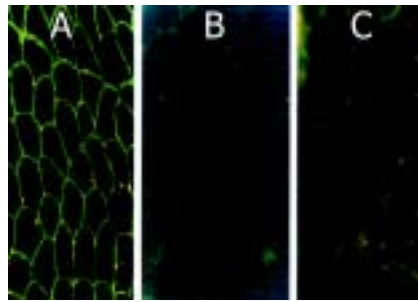


Fig. 5: Microscopia de imunofluorescência, coloração com anticorpo antidistrofina

- a) Localização de distrofina na membrana no músculo normal;
- b) Ausência de distrofina no músculo com DMD;
- c) Quantidade reduzida de distrofina no músculo de DMB (Gentileza da Dra. Mariz Vainzof, Centro de Estudos do Genoma Humano, IBUSP)

Quando se encontra um fragmento de tamanho menor que o esperado, realiza-se o seqüenciamento. O produto amplificado por PCR é purificado pelas enzimas fosfatase alcalina e exonuclease do “Sequenase™ Version 2,0 DNA Sequencing Kit da Amersham Biosciences, utilizando *primers* específicos, em um seqüenciador automático (ABI377-Perkin Elmer) (fig.10).

3. Análise de custos para o Laboratório de Biologia Molecular:

Comparando a eficácia da técnica da PTT com as demais técnicas para o diagnóstico de doenças que apresen-

tam mutações de ponto, o PTT tem um custo relativamente baixo para o diagnóstico molecular, com uma eficiência de 50% a 95% (ENG E COLS, 1997) (tabela.2).

A vantagem do teste da PTT é que ele fornece uma pista importante para a procura de mutações que resultam em um produto truncado. A sua desvantagem é que ele não detecta mutação “missense” (troca de sentido) ou substituição de bases silenciosas ao contrário dos demais métodos citados na tabela 2, que também detectam polimorfismos e mutações “missense”.

4. Aplicações Clínicas

Enquanto não houver um tratamento eficaz para as doenças genéticas, prevenir o nascimento de novos afetados, através da identificação de portadores e diagnóstico pré-natal é fundamental. Para isso é necessário identificar entre as mães de casos isolados e entre as irmãs de afetados aquelas que são heterozigotas quanto ao gene defeituoso, o que já é possível na grande maioria dos casos. Para identificação de portadoras do gene DMD/DMB, combinam-se os dados da genealogia, o estudo da enzima sérica CK e a análise de DNA/RNA.

A compreensão dos mecanismos moleculares que causam as doenças genéticas, além de possibilitar a prevenção de novos afetados nas famílias de alto risco, será fundamental para futuros tratamentos.

O teste da PTT para auxiliar na identificação de mutações de ponto no gene da distrofina ilustra só um dos exemplos de aplicação clínica

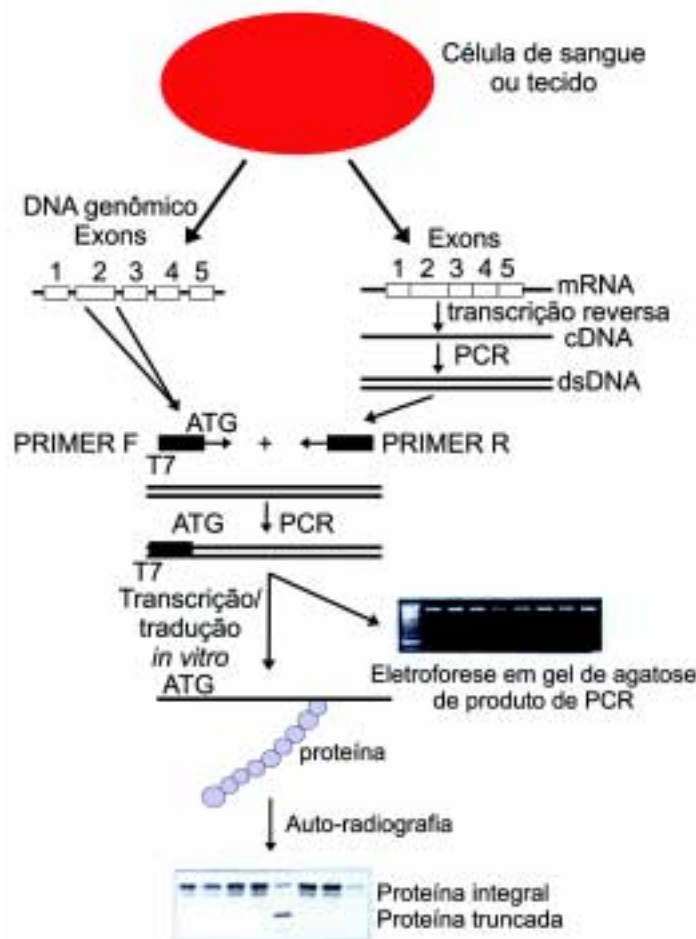


Fig. 6: Esquema da PTT (adaptada por Vagenas, 1998)



Fig. 7: Extração de RNA a partir de 10ml de sangue periférico

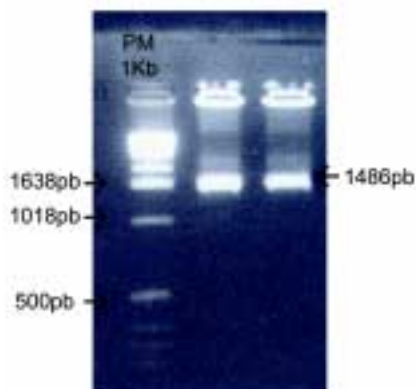


Fig. 8: Análise do produto da PCR do cDNA, em gel de agarose 1,5%

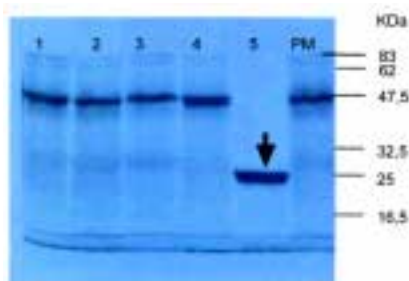


Fig. 9: Análise por PIT do fragmento 3EF (exons 36-45), mostrando redução do tamanho da proteína no paciente 5

ca dessa metodologia. Hoje, o Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH) (fig.11), o maior centro de atendimento a doenças genéticas da América Latina presta atendimento a famílias de afetados por inúmeras doenças genéticas. Esse centro, inaugura-

do em 2000, oferece, como parte do aconselhamento genético, o diagnóstico molecular e cromossômico e a análise de proteínas (tabela 3).

5. Cenário Político Institucional:

As doenças genéticas atingem 3% das crianças que nascem e são responsáveis por 50% das mortes no primeiro ano de vida, nos países do primeiro mundo, onde as doenças sociais e infecciosas já foram controladas. Além disso, 10% das doenças genéticas de adultos, como diabetes, doença de Alzheimer, doença de Parkinson ou algumas formas de câncer, têm um comprometimento genético importante.

Por isso, hoje, não é mais possível pensar em medicina sem a genética.

A partir da biologia molecular, tem sido possível diagnosticar um número cada vez maior de doenças, em uma amostra de sangue ou esfregaço de mucosa bucal, evitando-se exames invasivos que frequentemente são pouco informativos. Além disso, as novas ferramentas têm permitido aprofundar as pesquisas acerca dos mecanismos moleculares patológicos, o que será fundamental para futuros tratamentos. Mas enquanto não houver cura para as doenças genéticas, principalmente as letais, ou incompatíveis com uma vida normal, prevenir o nascimento de novos afetados é fundamental. Isso também tem sido conseguido graças à identificação de casais em risco e de diagnóstico pré-natal, graças ao aprimoramento dos testes genéticos. O uso desses testes no Aconselhamento Genético de inúmeras famílias com afetado por doenças genéticas teve início no Departamento de Biologia – IBUSP há mais de 30 anos, e tem permitido para um número crescente de doenças passar do risco ou da probabilidade para a certeza. Esperamos que no futuro próximo, seja possível

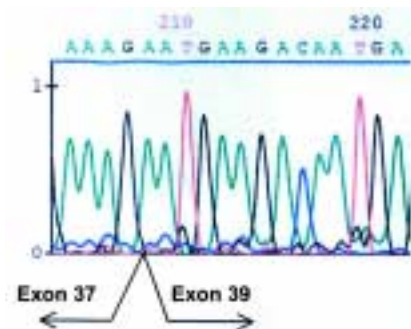


Fig. 10: Sequência de cDNA de linfócito, mostrando a deleção do exon 38



Fig. 11: Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH) - USP



Fig. 12: Associação Brasileira de Distrofia Muscular - ABDIM

passar do diagnóstico para uma cura definitiva.

A Biologia Molecular tem revolucionado também outras áreas da ciência e da biotecnologia. Hormônios, vitaminas e vacinas têm sido sintetizados por técnicas de DNA recombinante. Plantas transgênicas têm trazido um considerável impacto na agricultura. Animais transgênicos tem-se constituído em excelentes modelos para estudar-se doenças humanas. As possibilidades diagnósticas em doenças genéticas e neoplásicas têm progredido enormemente. Essas são algumas das conquistas de repercussão mais evidente e imediata, mas o potencial de beneficiar significativamente toda a

Tabela 3: Exemplos de Diagnósticos realizados no CEGH

Diagnóstico Molecular	Diagnóstico Cromossômico	Diagnóstico por Análise de Proteínas
Distrofias Musculares	Síndrome de Down	Distrofina
Neuropatias periféricas	Síndrome de Turner	Sarcoglicanas
Fibrose Cística do Pâncreas	Síndrome de Klinefelter	Calpaina
Craniossinostoses	Síndrome do Duplo Y	Disferlina
Hidrocefalia ligada ao X	Intersexualidade	Teletonina
Surdez Hereditária	Malformação congênita	Laminina
Esterilidade Masculina	Retardo Mental	Merosina

população no futuro próximo é gigantesco.

6. O papel social do pesquisador

Prevenir o nascimento de novos afetados e melhorar a qualidade de vida daqueles que já nasceram tem sido a luta de um grupo de geneticistas do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da USP, que vem pesquisando as Distrofias Musculares Progressivas (DMP's) há mais de 30 anos. Ao realizar o aconselhamento genético visando à prevenção de novos casos, constataram que inúmeras famílias atendidas sofriam de carências relativas a alimentação, assistência médica e educação (fig.12). Foi assim que nasceu, em 1981, a ABDIM (Associação Brasileira de Distrofia Muscular), cujo principal objetivo é atender pacientes e familiares. Na ABDIM, pacientes que foram diagnosticados no Centro de Estudos do Genoma Humano tem um atendimento bio-psico-social por uma equipe multidisciplinar. Isso inclui fisioterapia, terapia ocupacional, apoio psicológico, aulas de computação e várias atividades que visam a melhorar em todos os sentidos a qualidade de vida dos afetados.

Mas isso ainda é muito pouco. A ABDIM, que atende hoje, aproximadamente, a 120 crianças e adolescentes por semana, tem uma demanda reprimida, já que, só no Estado de S. Paulo, estimam-se existirem quase 20.000 afetados por distrofias musculares progressivas. Para se manter até hoje, a ABDIM tem contado com um apoio fundamental do UNIBANCO. Mais recentemente, conseguiu uma nova parceria, extremamente importante, da Amersham Biosciences, que vai repassar uma porcentagem da venda de seus produtos destinados à pesquisa científica, para a ABDIM. Trata-se de mais uma empresa que está se conscientizando acerca do enorme papel social que nos cabe a todos.

REFERÊNCIAS

CHELLY, J.; GILGENKRANTZ, H.; LAMBERT, M.; HAMARD, G.; CHAFFEY, P.; RECAN, D.; KATZ, P.; E cols. – Effect of Dystrophin Gene Deletions on mRNA Levels and Processing in Duchenne and Becker Muscular Dystrophies. **Cell**, vol 63: 1239-1248, 1990b.

- CAMPBELL, K.P. & KAHL. – Association of Dystrophin and na Integral Membrane Glycoprotein. **Nature**, 338:259-262, 1989.
- CAMPBELL, KP. – Three Muscular Dytrphies: Loss of Cytoskeleton-Extracellular Matrix Linkage. **Cell**, 80: 675-679, 1995.
- EMERY, A. E. H. (1993) Duchenne Muscular Dystrophy, 2d ed. Oxford University Press, Oxford and New York, pp. 25-45.
- EMERY, A.H.E. IN: Duchenne Muscular Dystrophy. Oxford Monographs in Medical Genetics No 15. Oxford: Oxford University Press, 99-102, 1987.
- ENG, C.; VIJG, J. - Genetic Testing: The problems and the promise. **Nature Biot.** 45:422 - 426, 1997.
- FORREST, S.M.; CROSS, G.S.; FLINT, T.; T.; SPEER, A.; ROBSON, K.J.H. & DAVIES, K.E. - Further Studies of Gene Deletions that Cause Duchenne and Becker Muscular Dytrphies. **Genomics**, 2: 109-114, 1988.
- GARDNER, R.J.; BOBROW, M. & ROBERTS, R.G. -The Identification of Point mutations in Duchenne Muscular Dystrophy Patients by Using Reverse-Transcription PCR and the Protein Truncation Test. **Am.J.Hum.Genet.**, 57: 311-320, 1995.
- GROMPE, M. - The Rapid Detection of Unknown Mutations in Nucleic Acids. **Nature Genetics**, 5: 111-117, 1993.
- HARPER, P.S. - What do we mean by genetic testing. **J. Med. Genet**, 34: 749-752, 1997.
- KOENIG, M.; HOFFMAN, E.P.; BERTELSON, C.J.; MONACO, ^aP.; FEENER, C. & KUNKEL, L.M. – Complete Cloning of the Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) cDNA and Preliminary Genomical Organization of the DMD Gene in Normal and Affected Individuals.
- ORITA, M.; IWAHARA, H.; KANAZAWA, H.; HAYASHI, K. & SEKITA, T. - Detection of Polymorphisms of Human DNA by Gel Electrophoresis as Single-Strand Conformation Polymorphisms. **PNAS USA**, Vol 86: 2766-2770, 1989.
- PLUMMER, S.J.; ANTO-CUVER, H.; WEBSTER, L.; & COLS. - Detection of BRCA 1 mutations by the protein Truncation test. **Hum. Mol. Genet.**, 4:1989-1991, 1995.
- ROEST, P.A.M.; ROBERTS, R.G.; SUGINO, S.; VAN OMMEM, G.J.B. & DEN DUNNEN, J.T. - Protein Truncation Test (PTT) for Rapid Detection of Translatio terminating Mutation. **Hum. Molec. Genet.**, 2: 1719-1721, 1993.
- ROEST, P.A.M.; BOUT, M.; VANDER TUIJN, A.C.; GINJAAR, I.B.; BAKKER, E.; HGORVORST, F.B.; VAN OMMEN, G.J. & DEN DUNNEN, J.T.- Splicing mutations in DMD/BMD detected by RT-PCR/PTT: detection of a 19AA insertion the cysteine rich domain of dystrophin compatible with BMD. **J.Med.Genet**, 11: 935-939.
- TUFFERY, S.; CHAMBERT, S.; BAREIL, C.; SARDA, P.; COUBES, C.; ECHENNE, B.; DEMAILLE, J.; CLAUSTRES, M. – Mutation analysis of the dystrophin gene in Southern French DMD or BMD families: from Southern blot to protein truncation test. **Hum. Genetics**, 102: 334-342, 1998.
- VANBAKEL, I.; SEPP, T.; WAR, S.; YATES, J.R.; GREEN, A.J. - Mutations in the TSC2 gene: Analysis of the complete coding sequence using the protein truncation test (PTT). **Hum. Molec. Genetec**, 6: 1409-1414, 1997.
- WHITTOCK, N. V.; TOBERTS, R. G.; MATHEW, C. G.; ABBS S. J. – Dystrophin point mutation screening using a multiplexed protein truncation test. **Genetics Testing**, 1, 115-123, 1997.
- WORTON, R.G. & GILLARD, E.F. - Muscular Dystrophy , Molecular Genetics. In Encyclopedia of Human Biology. Volume 5, New York, Academic Press, p. 191-204, 1991.
- ZATZ, M; LANG, K; SPENCE, MA. Frequency of Duchenne Muscular Dystrophy Carrier. **Lancet**, I, 759, 1977.
- ZATZ, M; VIANNA-MORGANTE AM; CAMPOS P.; DIAMENT AJ – Translocation (X;6) in female with Duchenne muscular dystrophy: implications for the localisation of the DMD locus. **J Med Genet**, 18(6): 442-447, 1981.
- ZATZ, M, VAINZOF M, PASSOS-BUENO M R. SERUM CREATINE-KINASE (CK) In Progressi Muscular Dystrophies. In: Methods in molecular medicine (in press), 2000. †