

11216

2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN GENETICA HUMANA
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
HOSPITAL DE PEDIATRIA

"ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO DE LAS PROTEINAS DEL COMPLEJO DISTROFINA GLICOPROTEINA EN PACIENTES CON DISTROFIAS MUSCULARES"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN GENETICA MEDICA
P R E S E N T A
ASTRID BARRAZA GARCIA

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TUTORES DE TESIS: DR RAMON MAURICIO CORAL VAZQUEZ
DRA CARMEN NAVARRETE CADENA
COTUTOR: DR FABIO SALAMANCA GOMEZ



MEXICO, D F.

I. M. S. S. C. M. N.
HOSPITAL DE PEDIATRIA
DICIEMBRE 14 2001
DEPT. DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION

Handwritten signatures and stamps, including a circular stamp with 'DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO' and '2002'.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CONTENIDO

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
• 1.1 Antecedentes históricos	4
• 1.2 Prevalencia	5
• 1.3 Aspectos moleculares de las distrofias musculares	7
• 1.4 Datos moleculares de la distrofina, sarcoglicanos y laminina	8
• 1.5 Aspectos clínicos de las distrofias musculares	15
• 1.6 Estudios paraclínicos de las distrofias musculares	22
• 1.7 Diagnóstico	23
• 1.7.1 Diagnóstico por inmunofluorescencia	23
• 1.7.2 Diagnóstico diferencial	25
• 1.8 Asesoramiento Genético	26
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN</b>	<b>27</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>28</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>28</b>
<b>5. DISEÑO DEL ESTUDIO</b>	<b>29</b>
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>29</b>
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>34</b>
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>45</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>52</b>
• Anexo 1. Árboles genealógicos e imágenes de inmunofluorescencia	54
• Anexo 2. Carta de consentimiento informado	84
• Anexo 3. Hoja de captación de datos	85
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>86</b>

## RESUMEN

Las distrofias musculares son un grupo de enfermedades hereditarias caracterizadas por debilidad y atrofia muscular progresiva, que se pueden iniciar desde el nacimiento hasta la edad adulta.

En algunas ocasiones éstas son causadas por alteraciones en la estabilidad de la membrana muscular durante el proceso de contracción, como sucede en las distrofias musculares que se producen por mutaciones en los genes que codifican los componentes del complejo distrofina-glicoproteína (CDG), principalmente en las proteínas distrofina (que produce distrofia muscular de Duchenne/Becker), laminina (que ocasiona distrofia muscular congénita) y sarcoglicanos, que producen algunos tipos de distrofias musculares de cintura (sarcoglicanopatías).

Debido a que el fenotipo de los pacientes con estos tipos de distrofia muscular puede ser muy similar y en ocasiones hasta se sobreponen con los de otros grupos de distrofias musculares, el diagnóstico clínico representa un problema serio.

Tradicionalmente el diagnóstico de las distrofias musculares se hacía tomando en cuenta el grupo de músculos involucrados, la gravedad, el modelo de herencia y progresión de la enfermedad. Sin embargo, el empleo reciente de técnicas bioquímicas, de genética y biología molecular ha traído consigo la identificación de varios genes y proteínas que integran el CDG. Esto determina la posibilidad de establecer un diagnóstico más certero en pacientes con distrofias musculares, principalmente en quienes el cuadro clínico sugiere alteraciones de distrofina, laminina o sarcoglicanos.

En el presente trabajo se analizó el patrón de expresión mediante inmunofluorescencia indirecta de las proteínas distrofina, laminina y sarcoglicanos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y

δ en biopsias musculares de 33 pacientes con diagnóstico sugerente de distrofia muscular. La selección de pacientes para el estudio se basó en criterios clínicos.

Mediante el análisis inmunohistoquímico se encontró un patrón de expresión ausente o deficiente en 4/33 pacientes con distrofia muscular. En un caso se observó ausencia completa de γ sarcoglicano en la membrana de la fibra muscular, acompañado de deficiencia de las proteínas distrofina, β y δ sarcoglicanos; con estos hallazgos, se consideró que el caso corresponde a una distrofia muscular de cinturas de tipo autosómico recesivo debido a una sarcoglicanopatía, que determina una presentación clínica grave. En otro paciente se identificó ausencia total de la proteína laminina, que al correlacionarse con los datos clínicos se estableció como un caso de distrofia muscular congénita. Se identificó un paciente más con distrofia muscular leve y deficiencia parcial de distrofina, lo que se traduce en una distrofia muscular tipo Becker. Por último, se identificó un caso que demuestra inmunotinción ausente para distrofina y en forma alterna expresa dos fibras musculares aisladas con tinción normal distribuida regularmente sobre el sarcolema, considerándose éstas últimas como fibras revertantes; además se observó una disminución secundaria de las proteínas del complejo sarcoglicano, situación que resulta muy interesante pues es considerado un hallazgo de inmunofluorescencia no frecuente. En cada uno de los casos descritos, el análisis inmunohistoquímico constituye un paso previo muy importante para la identificación posterior de las mutaciones mediante técnicas de biología molecular. En conclusión confirmamos que existe gran heterogeneidad genética en la presentación de las distrofias musculares, pues no siempre se logra establecer una correlación directa entre la expresión de las proteínas del complejo CDG y el fenotipo, sugiriendo que su desarrollo no sólo se asocia a la ausencia o deficiencia de una proteína específica, sino también

implica la participación de mecanismos moleculares alternos o defectos en otras proteínas relacionadas molecularmente con el CDG. Se discute cada uno de los casos clínicos de acuerdo a los resultados de inmunofluorescencia y se correlaciona con lo informado en la literatura.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes históricos.

El concepto de distrofia muscular se empleó como un término general para referirse a una gran variedad de enfermedades musculares hereditarias que producen debilidad y atrofia muscular progresiva. Dentro de éste grupo se identificó que la distrofia muscular de Duchenne (DMD) y su forma alélica menos grave conocida como distrofia muscular de Becker (DMB), que siguen un modelo de herencia recesivo ligado al X, representaban más de las dos terceras partes del número total de pacientes con distrofia muscular, por lo que ambas entidades fueron denominadas en forma general como distrofinopatías. Sin embargo, hacia los años de 1950 y 1960, algunos investigadores como Stevenson, Walton y Natrass sugirieron que existía otro tipo de distrofia muscular, cuyo fenotipo clínico era muy similar al de DMD/DMB, con la diferencia que exhibía un modo de herencia autosómico recesivo. A esta forma se le denominó distrofia muscular autosómica recesiva tipo Duchenne ó SCARMMD (por sus siglas en inglés, severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy). En esa época, la diferenciación clínica entre DMD/DMB y SCARMMD era muy difícil, a menos que hubiese una historia familiar concordante con el modelo de herencia respectivo, de tal manera que los estudios únicamente se limitaban a las observaciones clínicas y patológicas en biopsias de músculo (van der Kooi et al., 1994).

Sin embargo, los brillantes estudios de Kunkel y su grupo de investigadores a finales de 1980, abrieron la puerta a la nueva era de la investigación en distrofia muscular, cuando clonaron el gen DMD mediante el método de clonación posicional, a lo que siguieron estudios encaminados a conocer la estructura de la distrofina, que es la proteína

codificada por el gen DMD, así como de las proteínas asociadas a ella. Estas investigaciones sentaron las bases para conocer los mecanismos moleculares que conducen al desarrollo de las distrofias musculares. Posteriormente, en 1994, fue descubierto el complejo sarcoglicano y más tarde muchas otras proteínas relacionadas con el sarcolema, por esta razón se clasificaron como un subgrupo de proteínas asociadas a distrofina (Ozawa et al., 1998).

La nomenclatura de las distrofias musculares fue cambiando a través de los años gracias al conocimiento de su fisiopatología, por lo que el término de SCARMD fue sustituido por el de distrofia muscular de cinturas tipo 1 (DMC1) para referirse a las formas autosómicas dominantes y distrofia muscular de cinturas tipo 2 (DMC2) para aquellas que siguen un modelo de herencia autosómico recesivo (Lim y Campbell, 1998).

A su vez, de las DMC2 ha surgido un subgrupo denominado sarcoglicanopatías, pues se ha identificado que son distrofias musculares que se originan por mutaciones en los genes que codifican los sarcoglicanos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ; clínicamente se caracterizan por producir debilidad de los músculos de las cinturas pélvica y escapular, siguiendo un modelo de herencia autosómico recesivo (Bushby, 1996).

## 1.2 Prevalencia

Los pacientes con DMD tienen una incidencia similar en todo el mundo, debido a que el gen de distrofina es altamente susceptible de mutaciones espontáneas. Aunque los datos reportados tienen algunas variaciones, generalmente se ha encontrado que existe 1 paciente con DMD por cada 2500 a 4000 recién nacidos masculinos vivos, independientemente de la raza. La mayor parte de los casos presenta una historia familiar



positiva de distrofia muscular, es decir, corresponden a casos heredados; sin embargo, se ha determinado que un tercio de los casos corresponde a mutaciones *de novo* en el gen DMD. No obstante, se ha sugerido que la incidencia de DMD/DMB tiende a disminuir en países industrializados, debido al acceso que las familias tienen para recibir asesoramiento genético (Ozawa et al., 1998).

En relación a las sarcoglicanopatías, los reportes han surgido a partir de estudios en países europeos, árabes, asiáticos y del continente americano (principalmente Estados Unidos y Brasil), y al parecer su distribución se extiende mundialmente. No obstante, no existe una estimación exacta de su prevalencia, debido al número escaso de pacientes con sarcoglicanopatías en la mayoría de los países en comparación con los casos de DMD, así como por la reciente atención que los investigadores han puesto en las sarcoglicanopatías. Hasta la fecha, en algunos países europeos y del continente americano se asume que de los pacientes diagnosticados como DMD, el 5% realmente corresponden a casos con DMC. Sin embargo, se ha sugerido que el número de pacientes con sarcoglicanopatías en países árabes sobrepasa con mucho los casos que se presentan en el resto del mundo; posiblemente debido a las tradiciones con las que se llevan a cabo los matrimonios, que generalmente ocurren entre personas consanguíneas. Se acepta entonces que la prevalencia de las sarcoglicanopatías se modifica dependiendo del país y período en que se estudie, así como de la consanguinidad o endogamia que se presenta entre sus habitantes. En contraste, la prevalencia de la DMD, la cual se hereda en forma recesiva ligada al cromosoma X, no se ve influenciada por el grado de consanguinidad (Ozawa et al., 1998).

Una situación similar a la de las sarcoglicanopatías se presenta en el caso de las distrofias musculares congénitas. De los subtipos clínicos que se han identificado, todos siguen un modelo de herencia autosómica recesiva, excepto por algunos casos reportados

en los que se ha sugerido la posibilidad de herencia autosómica dominante (Parano et al., 1995). Se ha establecido que dentro de este grupo de distrofias, la deficiencia de laminina ( $\alpha 2$ ) que se origina por mutaciones en el gen LAMA2 constituye aproximadamente el 50% de los casos de distrofia muscular congénita (Cohn et al., 1998).

### 1.3 Aspectos moleculares de las distrofias musculares

Con el descubrimiento del gen que codifica la proteína distrofina (Hoffman y Kunkel, 1989), se han realizado extensos estudios bioquímicos con el fin de dilucidar las funciones biológicas de la proteína. A partir de estos estudios, se descubrió que la distrofina se encuentra asociada a diversas proteínas (denominadas DAPs, por sus siglas en inglés Dystrophin Associated Proteins) formando un grupo oligomérico llamado complejo distrofina glicoproteínas (CDG) (Ervasti et al., 1990).

Las DAPs pueden subdividirse en complejos separados, cada uno compuesto por varias proteínas (**Figura 1**). Estos complejos se conocen como: complejo sarcoglicano-sarcospan (SG-SSPN) formado por las glicoproteínas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  sarcoglicanos y sarcospan (Crosbie et al., 1997); el complejo distroglicano (DG) que está constituido por las glicoproteínas  $\alpha$  y  $\beta$  distroglicano; y el complejo de sintrofinas, que agrupa a  $\alpha$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 2$  sintrofinas (Campbell, 1995).

Como se muestra en la figura 1, la organización molecular de las DAPs se basa en la asociación de los complejos anteriormente mencionados. La proteína laminina, uno de los principales componentes de la lamina basal, se une a  $\alpha$ -distroglicano, una glicoproteína extracelular, que a su vez, se une al  $\beta$ -distroglicano, una proteína transmembranal. Ambos quedan unidos intracelularmente al dominio rico en cisteína de la distrofina. Por el otro

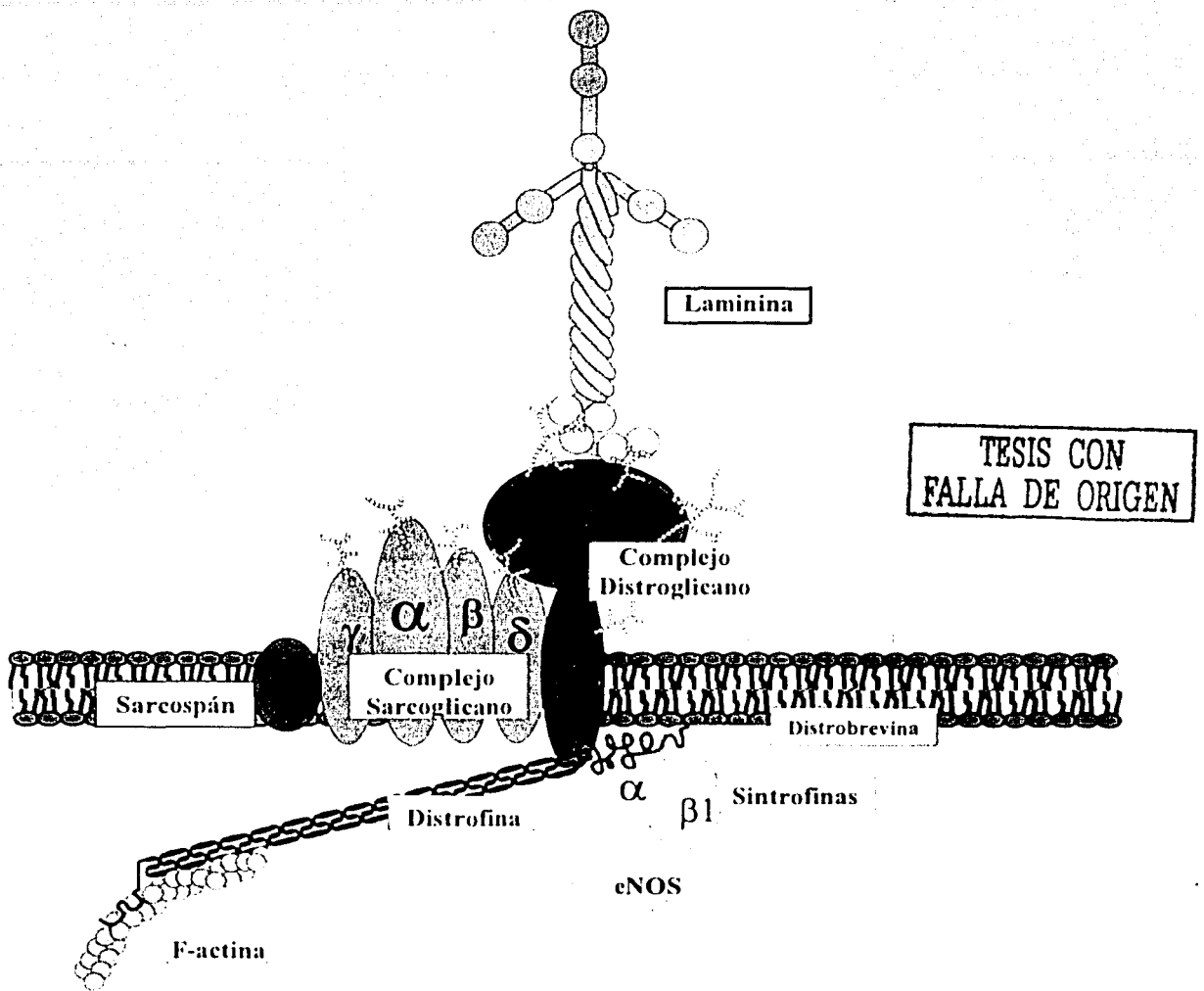


Figura 1. Organización molecular del complejo distrofina-glicoproteínas (CDG). Los componentes integrales del CDG están indicados por elipses de color gris (sarcospan; alfa, beta, gama y delta sarcoglicanos; alfa y beta distroglicanos; laminina-2). Otras proteínas asociadas al CDG se muestran en color blanco (distrobrevina, óxido nítrico sintetasa neuronal (eNOS), alfa y beta-1 sintrofinas). El CDG forma un puente que une la matriz extracelular (laminina-2) con el citoesqueleto (F-actina), el cual se cree que estabiliza mecánicamente el sarcolema y lo protege del estrés durante el proceso de contracción.

extremo, el dominio amino terminal de la distrofina se une a los filamentos de actina que forman parte de la red estructural del citoesqueleto. De esta manera, la lamina basal extracelular queda conectada a la red intracelular del citoesqueleto mediante el eje constituido por el complejo DG y la distrofina. Así, la membrana celular, compuesta por una bicapa lipídica que es susceptible a la destrucción por el estrés mecánico, queda incluida dentro de las estructuras extra e intracelular, protegiéndola durante el proceso de contracción muscular. La destrucción de este sistema debido a la ausencia o deficiencia en alguna de las proteínas que lo conforman contribuye a producir cambios distróficos en las fibras musculares (Lim y Campbell, 1998).

El complejo SG-SSPN se asocia indirectamente con el dominio rico en cisteína de la distrofina mediante su relación con el complejo DG (Ozawa et al., 1998). Se ha sugerido que los sarcoglicanos refuerzan la estabilidad del CDG, y que su deficiencia produce que la interacción de todos los componentes del complejo sea frágil. No obstante, también se ha propuesto que los sarcoglicanos podrían participar en la transducción de señales celulares o funcionar como receptores de ligandos en la matriz extracelular (Matsumura et al., 1994). Finalmente, el complejo de sintrofinas también se asocia al dominio carboxilo terminal de la distrofina, sin embargo, las funciones de estas proteínas aún son desconocidas (Ozawa, et al., 1998).

#### **1.4 Datos moleculares de la distrofina, sarcoglicanos y laminina.**

La distrofina es la proteína codificada por el gen DMD, localizado en la región Xp21. Es el gen más grande que se conoce, pues contiene 79 exones distribuidos sobre aproximadamente  $2.5 \times 10^6$  pares de bases (pb), lo que representa el 1% del DNA del

cromosoma X. Este gen se considera altamente conservado en la evolución y presenta una tasa de mutación elevada ( $1 \times 10^{-4}$ ) (Navarrete y Coral-Vázquez, 1999).

La mayoría de las mutaciones en el gen de distrofina son deleciones (60%) que abarcan varios exones, aunque también pueden presentarse duplicaciones (10%). Existen dos “puntos calientes” de mutación en el gen de distrofina, es decir, regiones en el DNA que están sujetas a una frecuencia muy alta de recombinación o mutación. Uno de ellos, conocido como “punto caliente mayor” se ubica hacia la mitad del gen, entre los intrones 44 al 58. El otro, llamado “punto caliente menor” abarca los primeros 20 exones del gen. Adicionalmente, también se han encontrado mutaciones que sustituyen un solo par de bases o eliminaciones pequeñas, que pueden ocurrir en cualquier parte del gen (Ozawa et al., 1998).

Se ha estimado que un tercio de los casos de DMD se debe a mutaciones nuevas; otro tercio a la transmisión del gen mutado por la madre portadora sin antecedentes; y el último tercio se origina por la transmisión del gen mutado en generaciones anteriores a través de rama materna (Coral Vázquez et al., 2000).

Las mutaciones sobre el gen DMD pueden tener diversos efectos en la expresión de la proteína. En algunos casos ésta se encuentra totalmente ausente; en otros, puede estar presente pero no es funcional, por lo que en ambos casos se originan fenotipos graves tipo DMD. Sin embargo, pueden manifestarse fenotipos menos graves tipo DMB cuando la proteína es más pequeña y tiene un funcionamiento parcial (Navarrete y Coral-Vázquez, 1999).

El gen DMD se transcribe y procesa en un RNA mensajero (mRNA) de aproximadamente 14 000 nucleótidos. Los niveles más altos de transcripción se han observado en músculo esquelético, donde el transcrito representa el 0.02-0.1 % del total de

especies de RNA. La proteína producida por el gen DMD (distrofina) presenta un peso molecular de 427 kilodaltones (kDa) y está compuesta por 3,685 aminoácidos, representando el 5% de las proteínas del citoesqueleto (Canizales, 1998).

Respecto al complejo sarcoglicano, actualmente se conoce la estructura de los genes y las proteínas que lo integran:

**Alfa sarcoglicano:** el gen  $\alpha$  sarcoglicano se localiza en 17q21, abarca 5.4 kb y contiene 10 exones (<http://www.dmd.nl/dap.html>). Codifica una proteína transmembranal de 387 aminoácidos, con expresión en músculo estriado, que inicialmente fue llamada adhalina (derivada de la palabra árabe "adhal" que significa músculo). Las primeras mutaciones que se identificaron en este gen en pacientes con distrofia muscular de cinturas correspondieron a mutaciones con sentido equivocado. Hasta la fecha, se han descrito un gran número de mutaciones diferentes en el gen. La mutación más común (32%), consiste en un cambio de citosina por timina en la posición 229 (Arg77Cys) se ubica en una isla CpG y se ha argumentado que éste sitio corresponde a un "punto caliente" de mutación. El dominio extracelular de  $\alpha$  sarcoglicano posee un número conservado de residuos de cisteína, de tal manera que al introducirse un residuo de cisteína adicional se altera la estructura secundaria de la proteína. Gracias a la identificación de las otras proteínas sarcoglicano se determinó que éstas forman un complejo. Por ello, la adhalina cambió su nombre por el de  $\alpha$  sarcoglicano (Andrew et al., 2000).

**Beta sarcoglicano:** el gen se ha localizado en la región cromosómica 4q12, posee una extensión de 17.5 kb y contiene 8 exones. Codifica una proteína de 318 aminoácidos, con un peso molecular de 43 kDa, que se detecta en todos los tipos musculares, así como en tejidos no musculares (Barresi et al., 2000). Las mutaciones en  $\beta$  sarcoglicano producen

formas graves o leves de distrofia muscular; se han reportado casos de mutaciones con sentido equivocado que ocasionan distrofia muscular leve de inicio en la vida adulta; así como casos más graves, de manifestación en la infancia, ocasionadas por mutaciones diferentes, pero que también involucran la lectura del gen en sentido equivocado y que implican o afectan la porción proximal de la proteína. Generalmente, las mutaciones en  $\beta$  sarcoglicano producen inestabilidad de todas las proteínas del complejo sarcoglicano. Por eso, se enfatiza que existe gran variabilidad en el fenotipo asociado a mutaciones en los genes sarcoglicano y ésta variabilidad no necesariamente se explica por el tipo de mutación o por el gen que se encuentra mutado (Andrew et al., 2000).

**Gama sarcoglicano:** el gen  $\gamma$  sarcoglicano está localizado en el cromosoma 13q12 y tiene 8 exones. La proteína está formada por 291 aminoácidos y tiene un peso molecular de 35 kDa (<http://www.dmd.nl/dap.html>). Su expresión se detecta en tejido muscular y no muscular (Barresi et al., 2000). Una de las mutaciones más comúnmente encontradas, especialmente en descendientes del norte de Africa, es la delta-521-T, misma que desestabiliza la proteína produciendo inestabilidad secundaria en las otras subunidades sarcoglicano. De manera similar, las mutaciones que desplazan el marco de lectura y las de sentido equivocado, afectan los residuos de cisteína altamente conservados en el extremo carboxilo de la proteína y producen también inestabilidad de  $\gamma$  sarcoglicano al evitar su correcto plegamiento y ensamblaje dentro del complejo sarcoglicano (Andrew et al., 2000).

**Delta sarcoglicano:** es una proteína de 35 kDa codificada por un gen localizado en 5q33. Su  $m$ RNA se expresa predominantemente en músculo estriado y liso, pero también en tejidos no musculares (<http://www.dmd.nl/dap.html>). Debido a la homología que existe entre  $\gamma$  y  $\delta$  sarcoglicanos, inicialmente fue difícil caracterizarlos como dos proteínas

separadas, pues ambos genes están formados por ocho exones, teniendo uniones intrón-exón bastante conservadas. Por esto se ha postulado que ambos genes pudieron haberse originado por un evento de duplicación génica. Al igual que los otros sarcoglicanos, posee una región de residuos de cisteína en su extremo carboxilo, por lo que las mutaciones que afectan esta región son críticas y se asocian con fenotipos graves (Andrew et al., 2000).

**Epsilon Sarcoglicano:** recientemente se ha localizado en el cromosoma 7q21-22 el gen de un quinto sarcoglicano, llamado  $\epsilon$  sarcoglicano, el cual es homólogo a  $\alpha$  sarcoglicano; ambos genes tienen una estructura intrón-exón idéntica y están compuestos por 9 exones. La proteína que codifica incluso comparte tanto el número como la posición de residuos de cisteína. Sin embargo, a diferencia de  $\alpha$  sarcoglicano,  $\epsilon$  sarcoglicano se expresa en tejidos diferentes, tanto musculares como no musculares, aunque mediante el uso de anticuerpos se le ha identificado en la membrana muscular al igual que las otras proteínas del complejo SG-SSPN (Andrew et al., 2000). Recientemente se ha descrito que mutaciones en el gen que codifica para  $\epsilon$  sarcoglicano causan una enfermedad conocida como síndrome distonía-mioclonía (Zimprich et al., 2001)

Respecto a la organización de las proteínas sarcoglicano se ha observado que en músculo estriado existen dos complejos SG-SSPN, uno constituido por  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  y otro formado por  $\epsilon$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y SSPN. Con respecto a músculo liso, el complejo está conformado por  $\epsilon$ ,  $\beta$  y  $\delta$  sarcoglicanos (Straub et al., 1999), y también se encuentra presente el sarcoglicano  $\gamma$  (Barresi et al., 2000).

Resumiendo, la mayoría de las mutaciones que se identifican en los genes sarcoglicanos consisten en sustituciones de un sólo par de bases (que producen mutaciones con sentido equivocado, mutaciones sin sentido o que afectan el empalme de los exones),



deleciones (de tamaño variable, que abarcan regiones grandes o pequeñas del gen) o duplicaciones. Se ha reportado que aproximadamente el 40% de las mutaciones que se identifican en los genes  $\alpha$  y  $\beta$  sarcoglicanos están localizadas en el exón 3, sugiriéndose que la secuencia de este exón es más susceptible a mutaciones. No se conoce la frecuencia de las mutaciones *de novo* en estos genes, pero se asume que ocurren con una frecuencia considerablemente menor que las que ocurren en el gen de distrofina (Zatz et al., 2000).

Como ya se describió, se han identificado mutaciones similares en cada uno de los genes sarcoglicano, y hasta se ha propuesto que existen "puntos calientes" susceptibles de mutación. Sin embargo, ya se ha establecido que esos sitios donde frecuentemente caen las mutaciones no constituyen "puntos calientes" reales (Ozawa et al., 1998).

En relación al efecto que las mutaciones tienen en los integrantes del complejo SG-SSPN se ha sugerido que, cuando un gen que codifica un componente del complejo está mutado, el producto proteínico de ese gen estará defectuoso y por lo tanto se perderá, por lo que el complejo SG completo disminuirá su capacidad de ensamblarse y también se perderán el resto de las proteínas o estarán en cantidades reducidas, lo que originará un fenotipo por sarcoglicanopatía (Ozawa et al., 1998).

Para explicar la variabilidad considerable que se presenta en el fenotipo de los pacientes con mutaciones en los sarcoglicanos se ha propuesto que algunos otros factores genéticos o ambientales podrían influir sobre la presentación del fenotipo en estas enfermedades. Incluso, el espectro clínico asociado a mutaciones en genes sarcoglicano en gran parte se sobrepone con las manifestaciones clínicas que se presentan cuando existen mutaciones en el gen de distrofina, que ocasiona las distrofias musculares Duchenne/Becker. Sin embargo, una diferencia notable es la falta de afectación cognoscitiva

en las sarcoglicanopatías. Esta situación en parte puede explicarse por el hecho de que la distrofina se expresa en el sistema nervioso central y periférico; en contraste, los sarcoglicanos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  son específicos de músculo, es decir, se expresan predominantemente en músculo cardíaco, esquelético (Andrew et al., 2000) y liso (Barresi et al., 2000).

**Laminina (merosina).** Existe otra proteína individual, que no forma complejos, pero constituye una parte integral de las proteínas asociadas a distrofina, llamada laminina. Es una glicoproteína que forma parte estructural de las membranas basales constituida por tres subunidades homólogas: una cadena pesada de 400 kDa y dos ligeras de 200 kDa. Hay diferentes tipos de lamininas que tienen patrones distintos de expresión en los tejidos: la laminina A, está constituida por una cadena pesada A y dos cadenas ligeras B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>; es la que se expresa primero durante el desarrollo; la laminina M (laminina M-B<sub>1</sub>-B<sub>2</sub>), que posee una cadena M (merosina) en lugar de la cadena A, es el constituyente principal de las membranas basales de músculo estriado (Xu et al., 1994).

En general se conoce que la laminina A se expresa en músculo durante el desarrollo embrionario, mientras que la laminina M aparece en el músculo maduro. Por lo tanto, en el adulto normal las membranas basales de las fibras musculares contienen laminina M exclusivamente; mientras que la laminina A se restringe únicamente a las uniones neuromusculares y los vasos sanguíneos ( Xu et al., 1994).

La mayoría de casos de distrofia muscular congénita se originan por mutaciones en el gen LAMA2; es un gen grande, con 64 exones, localizado en el cromosoma 6q2, que produce deficiencia de la subunidad alfa 2 de la laminina M/merosina (Cohn et al., 1998). Esta enfermedad se denomina *distrofia muscular congénita por deficiencia de merosina*, y

es una de las distrofias musculares más graves. Las mutaciones que ocasionan este fenotipo severo generalmente rompen el marco de lectura del gen, lo que condiciona ausencia total de la proteína en estos pacientes. No obstante, existen casos en los que se encuentra una deficiencia parcial de merosina, que condiciona formas leves de la enfermedad; así como casos graves con merosina normal (Naom et al., 2000).

### 1.5 Aspectos clínicos de las distrofias musculares

La distrofia muscular ligada al cromosoma X puede manifestarse en forma grave (*DMD*) o intermedia (*DMB*). Mediante estudios de genética molecular se ha definido que ambas entidades resultan alélicas, pues las dos se originan por mutaciones en el gen que codifica distrofina.

En la *distrofia muscular de Duchenne* el promedio de inicio del cuadro clínico es alrededor de los 3 años de edad. Algunos pacientes permanecen libres de síntomas en los primeros años, mientras que otros empiezan a caminar en forma tardía; la primera manifestación es la debilidad muscular, que se hace evidente cuando el niño empieza a caminar, siendo menos ágil que lo esperado para su edad, presenta caídas frecuentes y tiene dificultad para correr y subir escaleras. Los músculos gemelos desarrollan pseudohipertrofia, adquiriendo una consistencia firme.

Entre los 4 y 5 años de edad, al paciente se le dificulta incorporarse a la posición erecta cuando está sentado en el piso, al hacerlo requiere apoyo sobre su propio cuerpo, a lo que se denomina signo de Gowers positivo. Durante la marcha tiende a balancearse y caminar sobre las puntas, con una base de sustentación amplia; también se desarrolla lordosis lumbar.

Durante las primeras etapas, las extremidades inferiores están más afectadas que las superiores, y los músculos proximales con mayor debilidad que los distales. La afección es bilateral, simétrica y muy selectiva. Conforme los músculos están más débiles, los reflejos correspondientes disminuyen y posteriormente se pierden. Se presenta un acortamiento progresivo del tendón de Aquiles, lo que produce deformidad del pie en equinovaro, observándose esta característica con mayor frecuencia cuando el paciente ya ha perdido la capacidad de caminar, que en 95% de los casos ocurre a los 12 años.

Posteriormente se presenta debilidad facial leve. Los músculos intercostales también se afectan, pero los que controlan los esfínteres y aquellos que participan en la masticación y deglución conservan sus funciones. Conforme la enfermedad progresa, la debilidad muscular se hace más intensa y se acentúa el desarrollo de contracturas. El paciente desarrolla xifoescoliosis grave, con deformidad torácica que en forma secundaria restringe el flujo pulmonar en el lado compensado; además, los problemas respiratorios se agravan por la debilidad de los músculos intercostales, por lo que en las últimas etapas hay una reducción significativa de la capacidad pulmonar total. El 90% de los pacientes muere antes de los 20 años de edad, frecuentemente por problemas respiratorios.

Se ha estimado que hasta un 20% de los pacientes presenta un coeficiente intelectual por debajo de 70 puntos, y en el 3% es menor a 50. El daño intelectual no es progresivo y no se correlaciona con la duración o la gravedad de la enfermedad (Navarrete y Coral-Vázquez, 1999).

En los pacientes con DMD también puede presentarse miocardiopatía asociada. La afección cardíaca se desarrolla lentamente durante la primera década de vida, generalmente cuando la debilidad muscular ya es significativa. Se presentan anomalías de la conducción cardíaca, del tipo bloqueo cardíaco o arritmias, acompañado de signos

ecocardiográficos de miocardiopatía hipertrófica o dilatada; ésta última es el tipo más común de afección que se presenta, aunque generalmente se desarrolla después de haber cursado con hipertrofia (Cox y Kunkel, 1997).

La *distrofia muscular de Becker*, es de gravedad intermedia. Se presenta con una incidencia de 1 en 30 mil varones. La edad de inicio oscila entre los 4 y 19 años, con un promedio de 12 años, en el 75% de los pacientes. En etapa temprana los pacientes manifiestan debilidad de las extremidades inferiores, presentando dificultad para correr o subir escaleras e incorporarse del piso a la posición erecta.

En fases tardías se desarrolla pseudohipertrofia de gemelos y contracturas articulares. Los pacientes casi siempre pueden caminar hasta los 16 años de edad, siendo este un dato clínico útil para diferenciar el tipo DMD del tipo DMB, cuyo espectro clínico es moderado en comparación con la DMD. La sobrevida es variable, con un promedio de 42 años.

Un tercio de los pacientes presenta desarrollo mental subnormal, entre 70 y 85 puntos. El retraso en el desarrollo mental es estático y no progresa con la afección muscular, aunque también se ha visto que algunos tienen inteligencia normal e incluso superior (Navarrete y Coral- Vázquez, 1999).

La DMB también presenta alteraciones en la función cardíaca similares a las de la DMD (miocardiopatía), habiendo gran variabilidad en el grado de afección, lo cual se explica en parte porque posee moléculas de distrofina semifuncionales (Cox y Kunkel, 1997).

El grupo de *distrofias musculares de cintura (DMC)* con modelo de herencia autosómica recesiva, afecta a varones y mujeres por igual; es frecuente que los individuos afectados sean hijos de padres consanguíneos, quienes no manifiestan la enfermedad, pero

son portadores del alelo mutado. Sin embargo, los pacientes con DMC también pueden ser producto de un matrimonio no consanguíneo (Jackson y Strehler, 1968).

Se les puede dividir en: DMC causadas por mutaciones en los genes sarcoglicanos (sarcoglicanopatías), a las cuales se les ha asignado una nomenclatura que define cuál integrante del complejo sarcoglicano se encuentra afectado: DMC 2D ( $\alpha$  sarcoglicano), DMC 2E ( $\beta$  sarcoglicano), DMC 2C ( $\gamma$  sarcoglicano) y DMC 2F ( $\delta$  sarcoglicano); de éstas, el tipo más frecuente es la producida por deficiencia primaria de  $\alpha$  sarcoglicano (Bushby, 1996). Además existen las DMC diferentes a las sarcoglicanopatías, que como su nombre lo indica están relacionadas a proteínas que no pertenecen al complejo sarcoglicano. En general, estas últimas se caracterizan por presentar manifestaciones clínicas de inicio tardío y progresión lenta (Pogue et al., 2001), mientras que las sarcoglicanopatías tienen un curso clínico más grave. Por esta razón, se dice que conforman un grupo muy heterogéneo, pues los síntomas varían de moderados (tipo DMB) a graves (similares a DMD) (Nigro et al., 1996). Esta es una de las principales características de las DMC, incluso se han visto variaciones intrafamiliares tanto en inicio como severidad de la enfermedad (Ozawa et al., 1998). Generalmente los pacientes que tienen deficiencia primaria de  $\alpha$  sarcoglicano (DMC 2D) presentan un fenotipo menos grave; por el contrario, los pacientes con DMC 2E (sarcoglicano  $\beta$ ) y DMC 2F (sarcoglicano  $\delta$ ), se encuentran más gravemente afectados que el resto (Bushby, 1999; Zatz et al., 2000).

En las DMC las primeras manifestaciones se presentan durante la primera o segunda décadas de la vida (entre los 4 y 15 años de edad, con un promedio de 8 años). La debilidad muscular que se presenta es simétrica, afectando en forma más acentuada a los músculos proximales de las cinturas pélvica y escapular. Esta aparece inicialmente en la cintura

pélvica, y es progresiva; la afección de los músculos de la cintura escapular se presenta un poco más tarde. Por lo general se presenta pseudohipertrofia de gemelos, aunque puede no estar presente. Algunos pacientes tienen un curso clínico similar a DMD, con inicio a edades tempranas en quienes la capacidad para caminar se pierde alrededor de los 10 años. En otros pacientes el inicio es tardío, incluso en la edad adulta. Estos evolucionan menos rápido, algunas veces sin llegar a perder la capacidad de deambular. No es común que se presente afección de los músculos faciales, aunque pueden verse comprometidos sobre todo en etapas tardías. La función intelectual siempre se preserva. El promedio de vida no se ve tan acortado como en los otros tipos de distrofias musculares e incluso se han descrito casos en los que los pacientes alcanzan un promedio de 67 o más años de edad (Jackson y Strehler, 1968; van der Kooi et al., 1996).

Las miocardiopatías son manifestaciones clínicas comunes en pacientes con ciertos tipos de DMC. Se han reportado casos de miocardiopatía en pacientes con mutaciones primarias en los sarcoglicanos  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  (Melacini et al., 1999; Barresi et al., 2000), mientras que los pacientes con mutaciones en el sarcoglicano  $\alpha$  rara vez desarrollan miocardiopatías leves (Melacini et al., 1999). Gracias a las recientes investigaciones en ratones genéticamente modificados, se ha empezado a dilucidar la naturaleza de ésta correlación. Se ha encontrado que en la miocardiopatía por deficiencia en los sarcoglicanos  $\delta$  ó  $\beta$ , los pacientes presentan cambios histológicos específicos caracterizados por áreas focales de necrosis tanto en músculo cardíaco como en esquelético (Coral-Vázquez et al., 1999). Por el contrario, el ratón deficiente en sarcoglicano  $\alpha$ , a pesar de carecer del complejo sarcoglicano en la membrana del músculo cardíaco, no muestra datos histopatológicos de miocardiopatía (Duclos et al., 1998).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Además, se ha encontrado que en los ratones deficientes en los sarcoglicanos  $\beta$  y  $\delta$  la expresión del complejo sarcoglicano no sólo se encuentra reducida en el sarcolema del músculo esquelético y cardíaco, sino también existe una pérdida del complejo sarcoglicano en el músculo liso vascular, incluyendo el de la vasculatura coronaria, situación que no se observa en el ratón deficiente en sarcoglicano  $\alpha$ . En resumen, se ha sugerido que la pérdida del complejo sarcoglicano en el músculo liso vascular origina constricciones en los vasos sanguíneos que producen eventos intermitentes de isquemia, lo que conduce al desarrollo de miocardiopatía y exagera la distrofia muscular (Coral-Vázquez et al., 1999).

Recientemente, la organización conocida como ENMC (Consortio para la Investigación de las Distrofias Musculares de Cintura) ha publicado los criterios clínicos para la inclusión y exclusión del diagnóstico de las DMC (Bushby y Beckmann, 1995):

*En relación al inicio.* La enfermedad puede iniciarse en los músculos de la cintura pélvica o de la cintura escapular, o en ambos simultáneamente. La pseudohipertrofia de gemelos es una característica clínica frecuente, pero variable, incluso puede haber considerable variación intrafamiliar respecto a esta característica. Si la debilidad se inicia en músculos distales de las extremidades, faciales o extraoculares se considera poco probable el diagnóstico de DMC, aunque estos grupos musculares pueden afectarse en etapas tardías de la enfermedad. Las manifestaciones pueden iniciarse a cualquier edad, sin embargo, los casos de herencia autosómica recesiva raras veces se inician después de la segunda década.

*En relación a la progresión.* La debilidad muscular es inevitablemente progresiva, pero varía, habiendo casos con inicio temprano y progresión rápida similar al curso clínico de la DMD. En otros, la progresión es mucho más lenta. La afección por lo general es simétrica. A medida que avanza la enfermedad puede desarrollarse cardiomiopatía asociada.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



*En relación al modelo de herencia.* Debido a que las DMC se heredan en forma autosómica recesiva la historia familiar resulta determinante. Sin embargo, en casos esporádicos sin antecedentes familiares, puede no ser factible distinguir entre uno y otro tipo de herencia, por lo que en tales casos debe ponerse especial interés en las características clínicas, bioquímicas y moleculares del caso (Bushby y Beckmann, 1995).

Respecto a la *distrofia muscular congénita por deficiencia de laminina (merosina)*, el cuadro clínico se manifiesta con hipotonía severa al nacimiento o poco tiempo después, con debilidad muscular que afecta la mayoría de los grupos musculares, incluyendo los músculos faciales, faríngeos y respiratorios, con contracturas articulares severas y progresivas; también se presenta retraso en el desarrollo motor, sin capacidad para caminar, pero con desarrollo mental normal. Los niveles de fosfoquinasa de creatinina se encuentran elevados principalmente en las etapas iniciales de la enfermedad. La tomografía axial computarizada y la resonancia magnética pueden mostrar en ocasiones anomalías difusas en la sustancia blanca, cerebelo, cuerpo calloso o tallo cerebral. En los casos de distrofia muscular congénita con deficiencia parcial de merosina las alteraciones clínicas son menos graves. Los pacientes presentan hipotonía neonatal y debilidad muscular leves, con contracturas articulares discretas; la afección respiratoria raras veces se presenta y no es grave. El desarrollo motor se ve menos comprometido y la mayoría de los pacientes logran deambular. El coeficiente intelectual es normal. No obstante, existen excepciones, en las cuales los pacientes tienen manifestaciones graves, similares a las que se presentan en el grupo con deficiencia total de merosina (Parano et al., 1995).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 1.6 Estudios paraclínicos en las distrofias musculares

La determinación de enzimas séricas es de gran importancia para el diagnóstico de las distrofias musculares; de manera general, en todos los casos se observan elevaciones significativas de enzimas como fosfocinasa de creatinina (CPK), difosfofructosa aldolasa, piruvato cinasa, aspartato amino transferasa, glucosa fosfato isomerasa, deshidrogenasa láctica, anhidrasa carbónica III y enolasa. La elevación de estas enzimas es más marcada en las primeras etapas de la enfermedad y después disminuyen a medida que se deteriora la función muscular. Entre las pruebas enzimáticas, la determinación de CPK se considera la más útil para complementar el diagnóstico de las distrofias musculares, pues se eleva en suero en forma marcada y constante debido a que está presente en cantidades significativas en músculo esquelético, corazón y cerebro. Especialmente en las formas graves con evolución similar a DMD, la actividad de CPK sérica está muy elevada, incluso en etapas preclínicas (van der Kooi et al., 1994).

También se encuentran cambios característicos en la electromiografía (EMG). En la mayoría de los casos se detecta un patrón miopático, es decir, los potenciales de acción de las unidades motoras son más cortos y con menor amplitud; este cambio se debe a la pérdida de las fibras musculares activas, lo que determina que el tamaño de cada unidad motora se reduzca. Conforme la enfermedad progresa el tejido muscular es reemplazado por grasa y tejido conectivo, pudiendo haber áreas donde se registre poca o ninguna actividad (van der Kooi et al., 1996).

Mediante una biopsia de músculo esquelético pueden hacerse evidentes alteraciones histológicas específicas de las distrofias musculares. En etapas preclínicas e iniciales, se puede encontrar una diferencia marcada en el tamaño de las fibras, con desplazamiento

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

interno de los núcleos celulares; también es común encontrar fibras regenerativas. Conforme la enfermedad progresa, la estructura intracelular se destruye, la fibra muscular es invadida por células fagocíticas y es reemplazada por tejido conjuntivo y adiposo (van der Kooi, 1996).

## **1.7 Diagnóstico**

Inicialmente el diagnóstico puede sospecharse mediante la caracterización clínica, el patrón de herencia, los niveles séricos de fosfoquinasa de creatinina, electromiografía y biopsia muscular; sin embargo, en numerosos casos los datos clínicos y de laboratorio no permiten diferenciar una distrofia muscular de otra, por lo que actualmente están disponibles pruebas diagnósticas más precisas, incluyendo la evaluación de los niveles de expresión de las proteínas por inmunofluorescencia con anticuerpos y la identificación directa de las mutaciones mediante técnicas de biología molecular.

### **1.7.1 Diagnóstico por inmunofluorescencia en las distrofias musculares**

Actualmente se cuenta con toda una batería de anticuerpos que reaccionan con la mayor parte de las proteínas del complejo distrofina glicoproteína, principalmente contra distrofina (en sus extremos amino y carboxilo), laminina y sarcoglicanos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ . Mediante el empleo de estos anticuerpos en pruebas inmunohistoquímicas es posible identificar las proteínas anormales en diversos tipos de distrofias musculares; con la inmunofluorescencia es factible visualizar y detectar proteínas específicas dentro de un tejido. Para el estudio de las distrofias musculares las biopsias de músculo esquelético

constituyen el tejido de elección. Su principio se basa en el uso de un anticuerpo que tiene afinidad específica por su antígeno (Sewry, 2000).

En el músculo normal, la distrofina está localizada en el sarcolema y cada fibra muscular siempre muestra una expresión uniforme en la inmunofluorescencia, mientras que en los pacientes con DMD la distrofina está ausente. Aunque el gen de distrofina que posee una mutación en ocasiones es capaz de sintetizar una proteína más corta (distrofina truncada), generalmente no llega a detectarse debido a que es degradada rápidamente. Sin embargo, existen casos excepcionales en los que la membrana celular muestra un tinción débil. En los casos de DMB las fibras expresan una tinción reducida o incluso puede no detectarse distrofina (Sewry, 2000).

En general se considera que la mayoría de los casos de DMD carecen de la región carboxilo terminal de la distrofina, mientras que en los casos de DMB se preserva. Es por eso, que el ensayo para distrofina se hace utilizando anticuerpos que reconozcan más de un dominio de la proteína (ya sea el amino terminal, el dominio en barra o el carboxilo terminal) para evitar falsos negativos (Sewry, 2000).

En los casos de sarcoglicanopatías, las proteínas se comportan como un complejo, pues la pérdida de cualquiera de los cuatro sarcoglicanos, en particular de  $\beta$  y  $\delta$  sarcoglicanos, conduce a deficiencia secundaria de todo el subcomplejo completo, sin embargo, pueden encontrarse excepciones (Zatz et al., 2000). Es común que el sarcoglicano que posee la mutación primaria sea el que está ausente o más severamente reducido, de tal manera que la expresión de los sarcoglicanos en la inmunofluorescencia puede variar, pudiéndose detectar grados variables que van desde ausencia total a reducción leve. Sin embargo, casi nunca se ve afectada la expresión de distrofina, aunque puede encontrarse

inmunotinción disminuida, especialmente en los casos en los que la deficiencia de sarcoglicanos es muy marcada (Sewry, 2000).

Actualmente, el estudio molecular para la identificación directa de mutaciones se basa en los hallazgos de inmunofluorescencia de las biopsias musculares en una primera etapa, usando un panel de anticuerpos contra las proteínas asociadas a distrofina; de esta manera se incrementa mucho la posibilidad de encontrar la mutación en el primer gen examinado en cada caso particular (Pogue et al., 2001).

Respecto a los hallazgos de inmunofluorescencia en los casos de distrofia muscular congénita puede encontrarse ausencia de laminina o por el contrario expresar una reducción leve o parcial de la proteína. La laminina  $\alpha 2$  se expresa en varios tejidos diferentes del tejido muscular, algunos de los cuales en ocasiones son útiles para diagnóstico (Sewry et al., 2001).

### **1.7.2 Diagnóstico diferencial**

El espectro de padecimientos a incluirse dentro del diagnóstico diferencial de las distrofias musculares incluye a aquellas enfermedades que presentan debilidad muscular de extremidades superiores e inferiores, como: miopatías mitocondriales o metabólicas, las cuales se diferencian mediante ensayos de las actividades enzimáticas correspondientes; algunas enfermedades neurológicas, como la atrofia muscular espinal, cuyos cambios histopatológicos en músculo y de electromiografía son muy específicos; la polimiositis y dermatomiositis, también deben excluirse, así como deficiencias vitamínicas, carcinoma, sarcoidosis, mioglobulinuria o miopatías inflamatorias idiopáticas (van der Kooi, 1994).

### 1.8 Asesoramiento genético

La DMD/DMB sigue un modelo de herencia recesivo ligado al cromosoma X, por lo que sólo se encuentran afectados los varones. No hay transmisión de varón a varón. La transmisión se realiza a través de mujeres heterocigotas, quienes transmiten el gen defectuoso a su descendencia: si el producto es varón tendrá 50% de posibilidades de estar afectado o ser sano; si es mujer, la posibilidad de ser portadora o sana será de 50%. Todos los hijos de un varón afectado serán sanos y sus hijas todas portadoras. Sin embargo, es común que en estas enfermedades el varón no se reproduzca debido a la historia natural propia del padecimiento (Carnevale A. y Esmer M., 2001).

En los casos de las distrofias musculares que siguen un modelo de herencia autosómica recesiva, como las distrofias musculares de cintura y las distrofias musculares congénitas, pueden afectarse individuos de uno u otro sexo. El gen recesivo se transmite de uno y otro progenitor, quienes son heterocigotos por lo que se les designa como portadores del alelo anormal; en ellos no produce efecto fenotípico por sí solo, pues el otro alelo es dominante y normal. El gen anormal puede expresarse en 25% de la descendencia, los cuales serán homocigotos recesivos. Esta posibilidad puede estar influenciada por la frecuencia del gen en la población o debido a la presencia de consanguinidad (Guizar-Vázquez J. y Cortés R., 2001).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Las distrofias musculares son enfermedades hereditarias caracterizadas por debilidad y atrofia muscular progresiva; existen varios grupos, los cuales son difíciles de distinguir únicamente por su edad de inicio, características clínicas o bioquímicas o por su modelo de herencia, pues el fenotipo puede ser muy similar y en ocasiones hasta se sobrepone con los de otros grupos de distrofias musculares. En estos casos el diagnóstico clínico representa un serio problema. Ahora se sabe que muchas de ellas están ocasionadas por defectos en la organización o función de las proteínas del CDG, principalmente de distrofina, laminina y complejo SG-SSPN, las cuales ocasionan las enfermedades musculares que se han denominado: DMD/DMB, distrofia muscular congénita y DMC, respectivamente.

Actualmente es factible identificar a las proteínas defectuosas mediante pruebas inmunohistoquímicas con anticuerpos que reaccionan con varias de las proteínas comprometidas, visualizando en el tejido muscular su patrón de tinción. Debido a que en la población mexicana no existen antecedentes de este tipo de estudios, se considera de suma importancia iniciar el análisis de pacientes con distrofia muscular mediante esta metodología, lo cual nos ofrecerá en adelante la posibilidad de establecer un diagnóstico más certero en pacientes con distrofia muscular, principalmente en aquellos en los que las características clínicas son muy heterogéneas.

### **3. HIPÓTESIS**

Algunos de los pacientes con distrofia muscular presentan ausencia o deficiencia de las proteínas del complejo sarcoglicano, distrofina o laminina en la membrana de la fibra muscular.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Describir los datos clínicos y los hallazgos de inmunofluorescencia en pacientes mexicanos con distrofias musculares.

#### **4.1 Objetivos particulares:**

- Describir a un grupo de pacientes con distrofias musculares de acuerdo al patrón de herencia y a las características clínicas de la enfermedad muscular.
- Realizar en biopsias de músculo esquelético pruebas inmunohistoquímicas para determinar la ausencia o deficiencia de algunas de las proteínas que se asocian a distrofia muscular (sarcoglicanos, distrofina y laminina).
- Establecer las bases para dirigir la búsqueda de mutaciones mediante técnicas de biología molecular en aquellos pacientes en los que se encuentre ausencia o deficiencia de las proteínas estudiadas.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **5. DISEÑO DEL ESTUDIO**

El estudio es descriptivo y transversal.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 Pacientes.**

Se estudiaron 33 pacientes con diagnóstico clínico de distrofia muscular, captados en el servicio de Genética Humana del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI (HP CMN SXXI), del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Dr. Manuel Velasco Suárez (INNyN), del Instituto Nacional de Ortopedia (INO), del Hospital General de México, del Hospital 20 de Noviembre del ISSSTE y del Instituto Nacional de Pediatría (INP).

### **6.2 Criterios de inclusión.**

- Sujetos masculinos o femeninos que cumplan los criterios clínicos de las distrofias musculares:
  - I. Cuadro clínico compatible con distrofia muscular.
  - II. Niveles elevados de CPK.
  - III. Electromiografía que muestre áreas con baja o nula actividad.
  - IV. Biopsia muscular de cuádriceps o deltoides que presente variación en el tamaño de las fibras, necrosis y eventualmente reemplazo por grasa y tejido conectivo, según el grado de avance de la miopatía.

- **Árbol genealógico** que muestre una segregación sugestiva de herencia autosómica recesiva o antecedente de padres consanguíneos, herencia autosómica dominante o herencia recesiva ligada al X, que constituyen los modelos de herencia conocidos en las distrofias musculares. Se incluyen también los casos aparentemente esporádicos o casos aislados.
- **Consentimiento por escrito** de pacientes y familiares para su participación en este protocolo de investigación (**Anexo 2**).

### **6.3 Diagnóstico clínico. (Anexo 3).**

Se llevó a cabo mediante:

- I. **Elaboración del árbol genealógico.**
- II. **Caracterización clínica completa** con la finalidad de establecer el diagnóstico. Se consideró que un paciente presentaba distrofia muscular cuando tenía caídas frecuentes, incapacidad para subir escaleras, pseudohipertrofia de músculos gemelos, niveles en suero de la enzima CPK elevados en al menos dos órdenes de magnitud, anormalidades histológicas y electromiográficas del músculo, consistentes con una distrofia muscular progresiva.
- III. **Evaluación cardiológica** mediante historia clínica, examen físico, radiografía de tórax, electrocardiograma y ecocardiograma.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

#### **6.4 Biopsias musculares.**

Se tomaron biopsias musculares del cuádriceps o deltoides, de tamaño no menor a 5 mm de diámetro y longitud, las cuales se mantuvieron con solución fisiológica en hielo previo al momento de su preparación. El montaje de las piezas de músculo se hizo sobre fragmentos de corcho pequeños, procurando que la orientación de las fibras musculares quedara perpendicularmente, para facilitar que las secciones tengan cortes transversos. El tejido montado en el corcho se embebió con una capa de un medio de montaje para tejidos congelados denominado Tissue Tek (Miles Inc. Diagnostic División) y se congeló en isopentano (2 metil butano) (Fisher 03551-4) enfriado con nitrógeno líquido. Las piezas permanecieron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Posteriormente se hicieron criosecciones con un espesor entre 5 y 7 micras, que fueron colocadas en portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina al 1%. Todas las muestras se tiñeron con hematoxilina:eosina (H:E) para analizar sus características histopatológicas. Los cambios distróficos se definieron por la presencia de degeneración y regeneración de fibras musculares, variación en el tamaño de éstas, con núcleos centrales y proliferación de tejido conectivo y necrosis.

#### **6.5 Inmunofluorescencia.**

Se inmunomarcaron secciones en serie utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra las siguientes proteínas:

- Distrofina (DYS2 extremo carboxilo terminal y DYS3 extremo amino terminal).
- $\alpha$  sarcoglicano (Ad1/20G, Novocastra).
- $\beta$  sarcoglicano (betaSARC1/5B1, Novocastra).
- $\gamma$  sarcoglicano (35 DAG/21B5, Novocastra).

- $\delta$  sarcoglicano (delta SARC3/12C1, Novocastra)
- Laminina (Novocastra).

La inmunofluorescencia se llevó a cabo según la metodología siguiente (Coral-Vázquez et al., 1999):

1. Se prepararon secciones del tejido muscular en estudio, de 5 a 7 micras de espesor, similares a las teñidas con H:E y se colocaron en portaobjetos para microscopio. Por cada portaobjetos que contenía tejido del paciente se utilizó una sección de tejido muscular normal como control positivo. De manera similar, se utilizó una sección adicional del músculo para control negativo (sin anticuerpo primario).
2. En cada una de las secciones de tejido se bloquearon los sitios no específicos, utilizando una solución bloqueadora que contiene amortiguador fosfato salino PBS (phosphate buffered saline) con albúmina de suero bovino (BSA) al 5%. Para este proceso se cubrieron los portaobjetos con las criosecciones con 500 microlitros de solución bloqueadora, cubriendo toda la superficie de la laminilla, durante 30 minutos.
3. Posteriormente se aplicó el anticuerpo primario de interés a cada portaobjetos (DYS2, DYS3, laminina,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  sarcoglicanos, respectivamente), a una dilución 1:20 (la dilución se hace con una solución de PBS/BSA al 1%). Se aplicó un volumen de anticuerpo primario de 800 microlitros por laminilla, las cuales fueron colocadas dentro de una cámara húmeda para evitar la evaporación. La incubación se mantuvo por tres horas a temperatura ambiente o de manera opcional a  $-4^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche.

4. Cumplido el tiempo de incubación, se realizó un proceso de eliminación del anticuerpo primario usando una solución de lavado PBS/BSA al 1%, la cual se aplicó gentilmente sobre las secciones de tejido durante cinco minutos y luego se retiró agitando suavemente. Este proceso se repitió hasta completar tres eventos de lavado, de cinco minutos cada uno.
5. Se agregaron 500 microlitros por laminilla del anticuerpo secundario (anticuerpo anti-ratón acoplado al fluorocromo Cy3) diluido 1:250 en PBS/BSA al 1%. Se mantuvo en proceso de incubación durante una hora a temperatura ambiente en una cámara oscura.
6. Completada la incubación con el segundo anticuerpo se hicieron nuevamente lavados con PBS/BSA al 1% (tres por cinco minutos), similar al proceso de lavado requerido para el anticuerpo primario.
7. Posteriormente, se agregó a cada portaobjetos una gota de un medio de montaje antidesvanescente para tejidos (Vectashield Vector) y se les colocó un cubreobjetos, procurando evitar espacios de aire entre el tejido y el cristal.
8. Las secciones de tejido se observaron al microscopio de fluorescencia y se capturaron en un analizador de imágenes, tomando fotos para documentación.

## 7. RESULTADOS

En este trabajo se reunieron los datos clínicos de 33 pacientes con diagnóstico sugerente de distrofia muscular y se tomaron biopsias de músculo esquelético para analizar el patrón de expresión de algunas de las proteínas que integran el CDG, específicamente distrofina, proteínas del complejo sarcoglicano y laminina.

Se estudiaron 23 hombres y 10 mujeres, conformando un total de 33 pacientes (Tabla 1). De éstos, 16 correspondieron a edades pediátricas, en tanto que 16 de los pacientes estudiados fueron adultos, sin embargo, en un paciente no fue posible integrar este dato por tener una historia clínica incompleta.

En 17 pacientes los síntomas iniciales aparecieron en la infancia; dentro de éstos, se encontraron dos pacientes que presentaron manifestaciones congénitas de distrofia muscular. En tres pacientes, la primera manifestación se presentó en la adolescencia y cuatro pacientes más iniciaron manifestaciones clínicas de la enfermedad durante la etapa de adulto joven. En dos de los casos estudiados el cuadro clínico se inició en la vida adulta. En siete de los pacientes estudiados no pudo consignarse este aspecto de la historia clínica. La clasificación se hizo en base a las etapas de crecimiento establecidas en pediatría (Barrón-Uribe y Pérez-Pasten, 1995).

Mediante el análisis de los árboles genealógicos de los pacientes y sus familiares encontramos que en 11 pacientes existían antecedentes familiares de la enfermedad. En relación a la progresión de la enfermedad, se encontró una evolución similar a DMD en nueve pacientes. Actualmente, 19 pacientes conservan la capacidad de caminar y nueve la han perdido; en el resto, no pudo determinarse este aspecto por haber sido evaluados clínicamente fuera de nuestro hospital.

**Tabla 1. Manifestaciones clínicas de los pacientes estudiados.**

	Edad	Sexo	Edad de inicio	Antecedentes familiares	Evolución similar a DMD	Marcha independiente	Afección cardíaca
P1	9 años	M	1 año	-	+	-	-
P2	25 años	M	19 años	+	-	+	-
P3	30 años	M	8 años	-	-	+	+
P4	17 años	M	5 años	+	+	-	-
P5	8 meses	F	congénita	+	-	-	+
P6	29 años	M	28 años	-	-	+	-
P7	35 años	M	3 años	+	-	+	-
P8	8 años	F	1 año	+	+	+	-
P9	9 años	M	3 años	-	+	-	-
P10	20 años	M	Nd	Nd	-	+	Nd
P11	23 años	M	6 años	+	-	+	+
P12	15 años	M	Nd	-	-	+	Nd
P13	14 años	M	5 años	-	-	+	-
P14	71 años	M	62 años	-	-	+	+
P15	34 años	F	13 años	+	-	+	-
P16	9 años	F	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
P17	27 años	M	15 años	-	-	+	+
P18	45 años	M	Nd	-	Nd	Nd	Nd
P19	15 años	M	2 años	-	+	-	-
P20	Nd	F	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
P21	17 años	M	16 años	-	-	-	-
P22	33 años	F	8 años	-	-	+	-
P23	23 años	F	19 años	-	-	+	-
P24	31 años	M	6 años	+	-	+	-
P25	10 años	M	1 año	+	+	-	-
P26	1 año	M	1 año	+	+	-	-
P27	43 años	M	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
P28	3 años	F	congénita	-	-	-	-
P29	6 años	M	1 año	-	+	+	-
P30	22 años	F	22 años	-	-	+	-
P31	29 años	F	25 años	+	-	+	-
P32	4 años	M	2 años	-	+	+	-
P33	7 años	M	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd

P: paciente; M: masculino; F: femenino; +: dato presente; -: dato ausente; Nd: no determinado; DMD: distrofia muscular de Duchenne.

En cinco de los pacientes analizados, se detectaron anomalías cardíacas asociadas al cuadro de distrofia muscular. Los casos correspondieron a los pacientes: P3, en quien fue detectado un bloqueo de rama derecha grado I; P5, que presentaba cardiomegalia grado II, con dilatación e hipertrofia del ventrículo izquierdo; P11, en el que fue detectada una miocardiopatía, sin especificarse el tipo; P14, quien presenta cardiopatía isquémica y finalmente, en el paciente 17 se estableció el diagnóstico de miocardiopatía dilatada.

Respecto a los estudios paraclínicos (**Tabla 2**), se determinó que en 22 pacientes los niveles séricos de CPK estuvieron elevados. En 20 pacientes el estudio electromiográfico reveló un patrón miopático; mientras que en 28 de los pacientes estudiados se encontraron anomalías histológicas en la biopsia muscular, revelados mediante tinción con hematoxilina y eosina; los hallazgos observados fueron sugerentes de un proceso distrófico en la fibra muscular.

Con la finalidad de determinar si se presentaba un patrón de expresión ausente o deficiente de distrofina y sus proteínas asociadas, se realizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos en biopsias de músculo cuádriceps o deltoides en pacientes con distrofia muscular. Los anticuerpos utilizados están diseñados específicamente para unirse a la distrofina en su extremo amino (DYS3) y carboxilo (DYS2), a los sarcoglicanos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ) y a la proteína laminina.



**Tabla 2. Estudios de gabinete**

Paciente	CPK (U/L)	EMG con patrón miopático	Datos histopatológicos compatibles con cambios distróficos en la fibra muscular
P1	868	-	+
P2	24,825	+	+
P3	479	+	+
P4	6,790	+	+
P5	2,897	+	+
P6	362	+	-
P7	162	+	+
P8	137	+	+
P9	2,211	+	+
P10	Nd	Nd	+
P11	50	+	+
P12	Nd	Nd	+
P13	39	-	-
P14	385	-	+
P15	1,256	+	+
P16	Nd	Nd	+
P17	Nd	+	+
P18	Nd	Nd	+
P19	2,800	+	+
P20	Nd	Nd	+
P21	10,630	+	+
P22	90	+	+
P23	3,085	+	+
P24	3,691	+	+
P25	635	Nd	-
P26	198	Nd	-
P27	Nd	Nd	-
P28	509	-	+
P29	390	+	+
P30	6,727	+	+
P31	1,115	+	+
P32	369	+	+
P33	Nd	Nd	+

P: paciente; CPK: fosfoquinasa de creatinina, U/L.: unidades por litro; EMG: electromiografía; +: dato presente; -: dato ausente; Nd: no determinado.

**Tabla 3. Resultados de inmunofluorescencia**

	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$	lam	DY S2	DYS 3	Comentario
P1	+	+	+	+	+	+	+	Sarcoglicanos, laminina y distrofina normales.
P2	+	+	+	+	+	+	+	Sarcoglicanos, laminina y distrofina normales.
P3	*	*	*	*	*	*	*	Ausencia de fibras musculares.
P4	+	+/-	-	+/-	+	+/-	+/-	<b>Ausencia de <math>\gamma</math>, deficiencia de <math>\beta</math>, <math>\delta</math> y distrofina. DMC 2C.</b>
P5	+	+	+	+	-	+	+	<b>Ausencia congénita de laminina.</b>
P6	+	+	+	+	+	+	+	Sarcoglicanos, laminina y distrofina normales.
P7	+	+	+	+	+	+	+	Sarcoglicanos, laminina y distrofina normales.
P8	+	+	+	+	+	+	+	Sarcoglicanos, laminina y distrofina normales.
P9	*	*	*	*	*	*	*	Ausencia de fibras musculares.
P10	+	+	+	+	+	+	+	Sarcoglicanos, laminina y distrofina normales.
P11	+	+	+	+	+	+	+	Sarcoglicanos, laminina y distrofina normales.
P12	+	+	+	+	+	+/-	+/-	<b>Disminución de distrofina. DMB.</b>
P13	+	+	+	+	+	+	+	Sarcoglicanos, laminina y distrofina normales.
P14	+	+	+	+	+	+	+	Sarcoglicanos, laminina y distrofina normales.
P15	*	*	*	*	*	*	*	Ausencia de fibras musculares.
P16	*	*	*	*	*	*	*	Ausencia de fibras musculares.
P17	*	*	*	*	*	*	*	Ausencia de fibras musculares.
P18	+	+	+	+	+	+	+	Sarcoglicanos, laminina y distrofina normales.
P19	*	*	*	*	*	*	*	Ausencia de fibras musculares.
P20	+	+	+	+	+	+	+	Sarcoglicanos, laminina y distrofina normales.
P21	+	+	+	+	+	+	+	Sarcoglicanos, laminina y distrofina normales.
P22	+	+	+	+	+	+	+	Sarcoglicanos, laminina y distrofina normales.
P23	+	+	+	+	+	+	+	Sarcoglicanos, laminina y distrofina normales.
P24	+	+	+	+	+	+	+	Sarcoglicanos, laminina y distrofina normales.
P25	+	+	+	+	+	+	+	Sarcoglicanos, laminina y distrofina normales.
P26	+	+	+	+	+	+	+	Sarcoglicanos, laminina y distrofina normales.
P27	+	+	+	+	+	+	+	Sarcoglicanos, laminina y distrofina normales.
P28	+	+	+	+	+	+	+	Sarcoglicanos, laminina y distrofina normales.
P29	+	+	+	+	+	+	+	Sarcoglicanos, laminina y distrofina normales.
P30	+	+	+	+	+	+	+	Sarcoglicanos, laminina y distrofina normales.
P31	+	+	+	+	+	+	+	Sarcoglicanos, laminina y distrofina normales.
P32	+	+	+	+	+	+	+	Sarcoglicanos, laminina y distrofina normales.
P33	+/-	+/-	+/-	+/-	+	-	-	<b>Ausencia de distrofina, disminución de SGs. DMD.</b>

P: paciente,  $\alpha$  alfa sarcoglicano,  $\beta$  beta sarcoglicano,  $\gamma$  gama sarcoglicano,  $\delta$  delta sarcoglicano, lam. laminina, DYS2: distrofina (extremo carboxilo terminal), DYS3: distrofina (extremo amino terminal), \* tinción positiva, +/- tinción reducida; - tinción negativa; \* casos en los que no se observaron fibras musculares debido al proceso distrofico avanzado SGs: sarcoglicanos DMD: distrofia muscular de Duchenne DMB: distrofia muscular de Becker DMC 2C: distrofia muscular de cinturas tipo 2C

Se encontró un patrón de inmunofluorescencia anormal en cuatro de los 33 pacientes estudiados, conformando el 12.12% (de éstos 50% presentaron alteraciones en distrofina, 25% en laminina y el 25% restante en las proteínas del complejo sarcoglicano) (Tabla 3); los pacientes que presentaron ausencia o deficiencia de las proteínas estudiadas correspondieron a los casos P4, P5, P12 y P33, que a continuación se describen.

#### Paciente 4

Se trata de un paciente del sexo masculino de 17 años de edad (Figura 2). Existe el antecedente familiar de un tío materno fallecido a la edad de 50 años por una enfermedad neuromuscular, sin conocer el tipo específico.

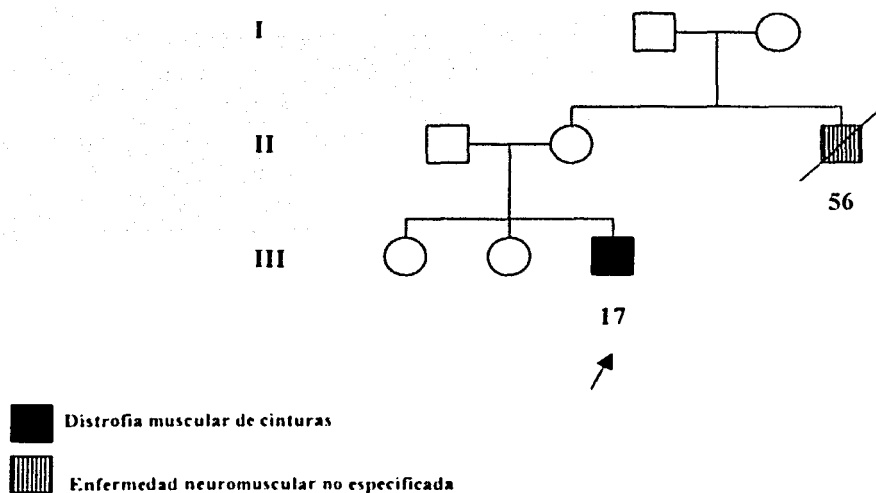
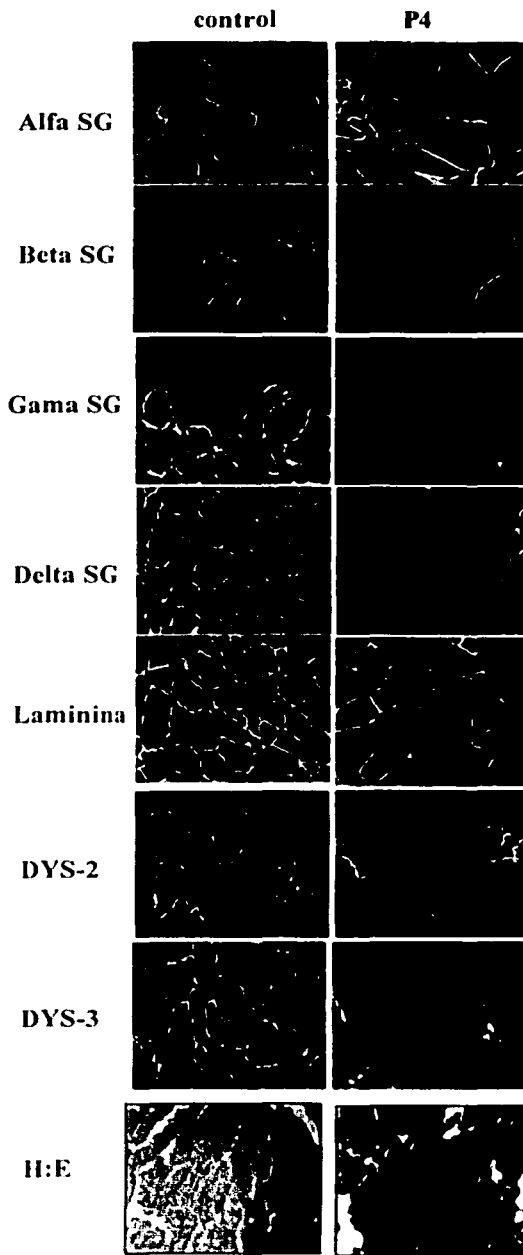


Figura 2. Árbol genealógico del paciente 4. Corresponde a un paciente masculino de 17 años de edad que presenta un cuadro clínico compatible con distrofia muscular de cinturas de inicio e evolución similar a DMD

El paciente inicia con manifestaciones de debilidad muscular a la edad de 5 años, siendo ésta de predominio proximal, afectando principalmente las extremidades inferiores, presentando caídas frecuentes y dificultad para incorporarse a la posición erecta, correr y subir escaleras. Posteriormente se agrega deformidad del pie en equinovaro. La afección ha sido lentamente progresiva, condicionando pérdida de la capacidad de caminar, siendo el curso clínico similar a DMD. Hasta la fecha no se ha identificado cardiomiopatía asociada. Los estudios paraclínicos en el paciente demuestran un aumento significativo de CPK sérica (6,790 U/L), con datos electromiográficos compatibles con un patrón miopático; los datos obtenidos de los hallazgos histopatológicos revelan tejido muscular extensamente infiltrado por tejido adiposo, con pequeños grupos de fibras atroficas en las que se observa centralización nuclear, considerándose que estos hallazgos corresponden a una distrofia muscular avanzada. Mediante el estudio de inmunofluorescencia se identificó ausencia completa en la expresión de  $\gamma$  sarcoglicano, con tinción disminuida en los sarcoglicanos  $\beta$  y  $\delta$ , al igual que en la proteína distrofina en sus dos epítopes (extremos amino y carboxilo). El patrón de tinción para laminina no reveló alteraciones (**Figura 3**). Conjuntando los datos clínicos, paraclínicos y de inmunofluorescencia se considera que el caso corresponde a una distrofia muscular de cinturas, del tipo  $\gamma$  sarcoglicanopatía.

El análisis de este paciente mediante metodologías que permitan identificar la mutación responsable será un paso importante para la caracterización del espectro de mutaciones de los genes sarcoglicano en pacientes mexicanos.

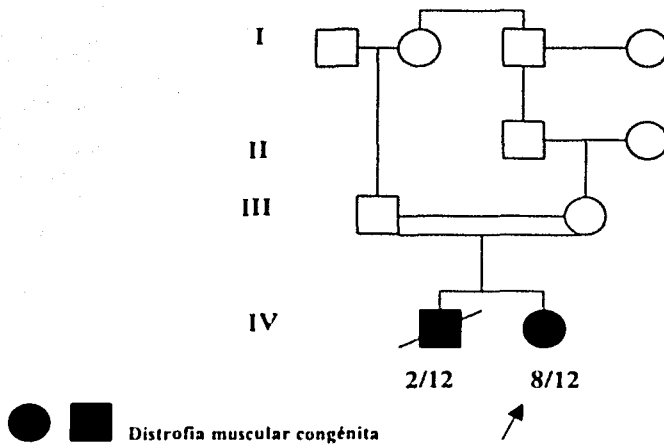


TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 3. Imagen de inmunofluorescencia del paciente 4. Se observa ausencia de Gama SG, con disminución de los sarcoglicanos beta y delta así como de distrofina. H:E: tinción hematoxilina y eosina. SG: sarcoglicano. DYS-2: (distrofina extremo carboxilo). DYS-3: (distrofina extremo amino). H:E: tinción con hematoxilina y eosina.

## Paciente 5

Se trata de una paciente femenina de 8 meses de edad. Es producto de la segunda gestación de padres sanos que conforman un matrimonio consanguíneo (**Figura 4**). Existe el antecedente de un primer hijo varón que falleció a los 2 meses de edad debido a un cuadro de debilidad muscular similar al de la paciente.



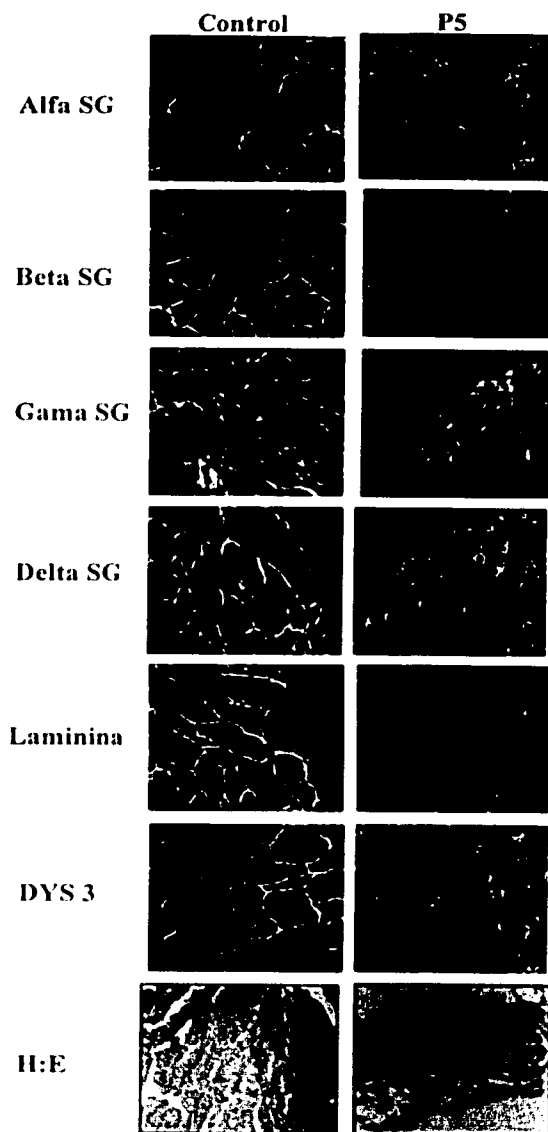
**Figura 4.** Árbol genealógico del paciente 5. Corresponde a una paciente femenina de 8 meses de edad. Los datos clínicos son compatibles con distrofia muscular congénita. Existe el antecedente de padres consanguíneos y un hermano con cuadro clínico similar.

El cuadro clínico se manifiesta desde el nacimiento, con debilidad muscular generalizada, hipotonía y contracturas articulares distales de las extremidades superiores e inferiores que limitan los movimientos de flexión y extensión. El cuadro clínico estuvo

acompañado por manifestaciones de dificultad respiratoria. La valoración cardiológica reportó hipertensión arterial pulmonar moderada, con cardiomegalia grado II y dilatación e hipertrofia del ventrículo izquierdo. Fueron realizados estudios de imagen radiológicos (tomografía de cráneo e imagen de resonancia magnética), que mostraron alteraciones en la mielinización del sistema nervioso central principalmente a nivel frontal y occipital. Los estudios complementarios revelaron elevación de enzimas musculares en suero, principalmente CPK con cifras de 2,897 U/L. Tanto la biopsia muscular como la electromiografía mostraron datos compatibles con afección muscular. En el análisis de inmunofluorescencia se identificó ausencia completa de inmunotinción para la proteína laminina, mientras que en el resto de las proteínas estudiadas la tinción fue normal, aunque por el grado de afección y la edad de la paciente, las fibras musculares se aprecian pequeñas y escasas (**Figura 5**). Con éstos resultados, éste caso se clasificó como una distrofia muscular congénita por deficiencia de laminina (merosina).

### **Paciente 12**

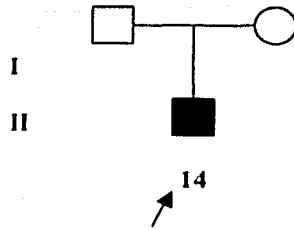
El caso correspondió a un paciente masculino de 14 años de edad (**Figura 6**). Aunque no fue posible obtener una descripción clínica completa, se identificó como un caso único en la familia, de inicio en la infancia, con progresión lenta y gravedad intermedia, pues actualmente el paciente conserva la capacidad de caminar.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 5. Imagen de inmunofluorescencia del paciente 5. Se observa ausencia total de laminina, con tinción positiva para sarcoglicanos. SG: sarcoglicanos. H:E: tinción con hematoxilina y eosina. DYS 3: distrofina extremo amino.





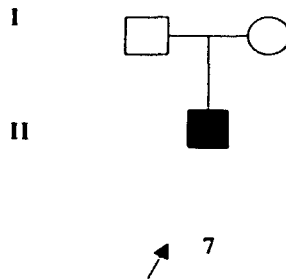
■ Distrofia muscular de Becker

Figura 6. Árbol genealógico del paciente 12. Se trata de un paciente masculino de 14 años de edad, que corresponde a un caso único en la familia. Los hallazgos clínicos y de inmunofluorescencia son sugerentes de DMB.

En el estudio de inmunofluorescencia se encontró tinción disminuída para distrofina, en los extremos aminio y carboxilo (Figura 7). Correlacionando los datos clínicos con los hallazgos de inmunohistoquímica podría sugerirse que el caso corresponde a una DMB.

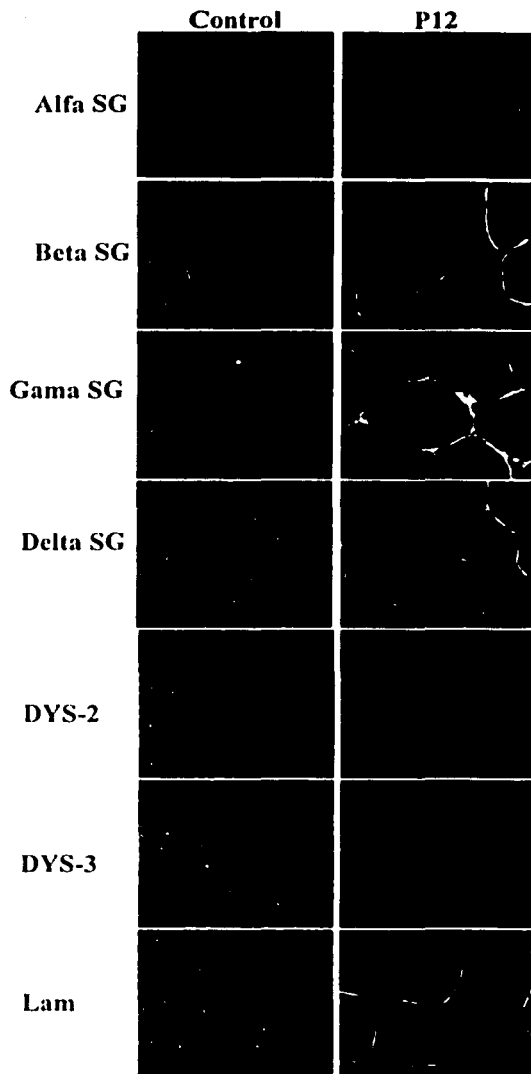
### Paciente 33

Se trata del caso de un paciente masculino de 7 años de edad (Figura 8). Por tratarse de un caso extrahospitalario no pudo integrarse su historia clínica completa.



■ Distrofia muscular de Duchenne

Figura 8. Árbol genealógico del paciente 33. Corresponde al caso de un paciente masculino de 7 años de edad; la imagen de inmunofluorescencia es compatible con DM1D.

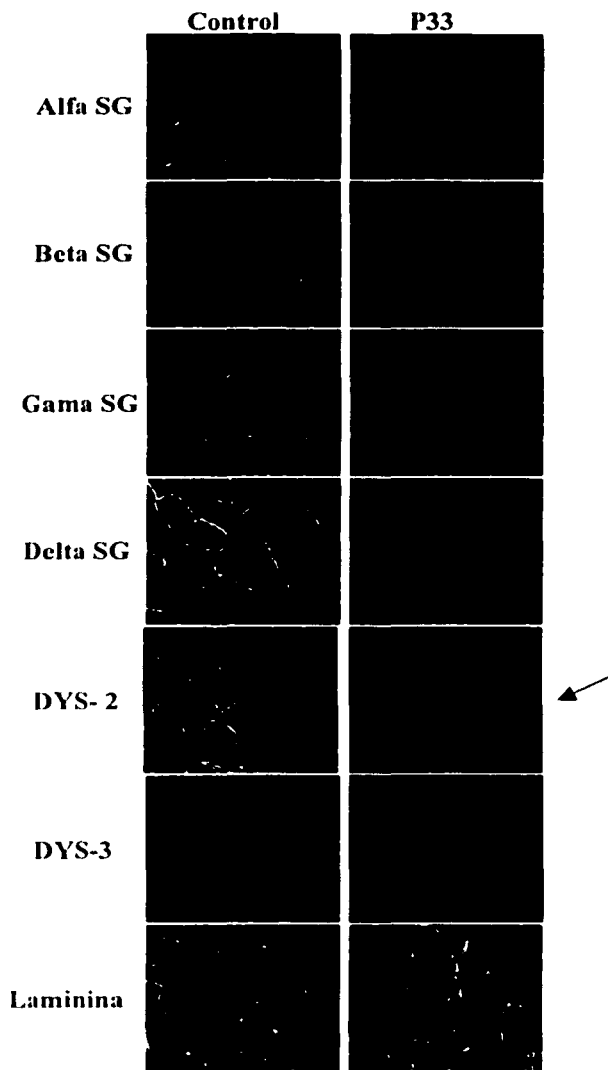


TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 7. Imagen de inmunofluorescencia del paciente 12. Se observa disminución en la tinción para distrofina (DYS-2 y DYS-3), con tinción normal para sarcoglicanos y laminina. SG: sarcoglicanos. DYS-2: distrofina extremo carboxilo. DYS-3: distrofina extremo amino.

La inmunofluorescencia realizada demostró tinción ausente para distrofina en sus extremos amino y carboxilo (DYS-3 y DYS-2); sin embargo, en la inmunosección observada para el anticuerpo DYS-2 en forma alterna expresa dos fibras musculares aisladas con tinción normal distribuida sobre el sarcolema, considerándose éstas últimas como fibras revertantes, lo cual es un hallazgo infrecuente; además se observó, una disminución secundaria en la inmunofluorescencia de las proteínas del complejo sarcoglicano (Figura 9).

En el resto de los pacientes, los hallazgos de inmunofluorescencia no demostraron anomalías de expresión en las proteínas estudiadas (Anexo 1). Sin embargo, esta situación no descarta la posibilidad de que efectivamente los casos correspondan a una distrofia muscular, pues los datos clínicos analizados hacen sugerente tal diagnóstico. Esos casos pudieran estar condicionados por la participación de otras proteínas diferentes a las estudiadas que pudieran relacionarse molecularmente con el CDG o causar distrofia muscular por mecanismos alternos.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 9. Imagen de inmunofluorescencia del paciente 33. Se observa inmunotinción ausente para DYS-3 y DYS- 2; nótese en ésta ultima la presencia de dos fibras revertantes al centro (flecha). La inmunotinción para sarcoglicanos está levemente disminuida. La tinción para laminina es normal. SG: sarcoglicanos. DYS-2: distrofina extremo carboxilo. DYS-3: distrofina extremo amino.

## 8. DISCUSIÓN

Las distrofias musculares son enfermedades hereditarias que se caracterizan por producir debilidad y atrofia muscular progresiva (van der Kooi et al., 1996). Son de inicio y grado variables y se pueden manifestar en etapas que van desde el nacimiento hasta la edad adulta, siguiendo diversos modelos de herencia mendeliana. Algunas de ellas son ocasionadas por mutaciones en los genes que codifican las proteínas que integran el complejo distrofina glicoproteína (CDG) en la membrana de la fibra muscular. Esto origina que la interacción entre los componentes del complejo sea frágil, lo que conduce a defectos de integridad del sarcolema y a degeneración de la fibra muscular (Vainzof et al., 1999).

Debido a que el fenotipo de los pacientes con este tipo de distrofias puede ser muy similar y en ocasiones se sobrepone con los de otros grupos de distrofias musculares, el diagnóstico clínico resulta complicado.

En la actualidad es factible identificar a las proteínas defectuosas mediante pruebas de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos, lo que determina la posibilidad de establecer un diagnóstico más certero en estos pacientes.

Con la finalidad de determinar si los pacientes con distrofia muscular presentan alteraciones en algunas de las proteínas del CDG (sarcoglicanos, distrofina y laminina) se realizó un análisis mediante inmunofluorescencia indirecta en biopsias de músculo esquelético de 33 pacientes, los cuales fueron seleccionados tomando en cuenta sus características clínicas, bioquímicas, hallazgos paraclínicos e histopatológicos.

Mediante el análisis por inmunofluorescencia se detectaron deficiencias de las proteínas del CDG en los pacientes P4, P5, P12 y P33.

En el caso del paciente P4 se identificó ausencia completa en la expresión de  $\gamma$  sarcoglicano, con tinción disminuida en los sarcoglicanos  $\beta$  y  $\delta$ , al igual que en la proteína distrofina, tanto para el anticuerpo que reconoce el dominio amino terminal (DYS3) como el carboxilo terminal (DYS2). En este paciente proponemos que existe una deficiencia primaria de  $\gamma$  sarcoglicano o distrofia muscular de cinturas tipo 2C, pues esta proteína se encuentra completamente ausente, a diferencia de las otras que se encuentran disminuidas. Es importante resaltar que la inmunofluorescencia de este paciente muestra una tinción normal de  $\alpha$  sarcoglicano. Este hallazgo contradice lo que originalmente se pensaba respecto a la integración de las proteínas sarcoglicano, es decir, que la ausencia de una de las proteínas sarcoglicano conducía a la disminución generalizada de todo el complejo (Noguchi et al., 2000). Esta teoría condujo a que en el análisis de inmunofluorescencia para detectar sarcoglicanopatías se usara únicamente el anticuerpo para  $\alpha$  sarcoglicano, dando por hecho que el resto de las proteínas se encontrarían disminuidas (Pogue et al., 2001). El caso del paciente P4 enfatiza la importancia del uso de anticuerpos que reconozcan las cuatro proteínas sarcoglicano; de hecho, casos similares han sido reportados recientemente en la literatura (Pogue et al., 2001; Vorgerd et al., 2001). Así mismo, se han descrito pacientes en los que la ausencia primaria de  $\gamma$  sarcoglicano, se asocia con deficiencia parcial de  $\beta$  y  $\delta$  sarcoglicanos, además de una reducción secundaria de distrofina, como se presenta en éste paciente. Para explicar ésta variación en el patrón de inmunofluorescencia se ha sugerido que se debe a que los sarcoglicanos  $\beta$  y  $\delta$  se encuentran fuertemente asociados en el sarcolema, funcionando como una unidad, lo que origina que la reducción de uno afecte al otro, a diferencia de  $\alpha$  y  $\gamma$  sarcoglicanos que parecen no tener efecto sobre los otros miembros del complejo (Vainzof et al., 1999).

La deficiencia de  $\gamma$  sarcoglicano (DMC 2C) generalmente se asocia con un curso clínico grave (Lasa et al., 1998). Esto va acorde con las características clínicas observadas en este paciente, pues muestra una presentación similar a la DMD. Se ha hecho referencia a que la DMC 2C es difícil de diferenciar de la DMD, especialmente cuando el tipo de herencia no permite distinguir entre uno y otro tipo (Ben Hamida et al., 1996). Es en éstos casos donde el análisis de inmunofluorescencia resulta útil.

Aunque este paciente se presenta como un caso único en la familia, resulta importante tomar en consideración que existe una marcada variabilidad en la expresión de la DMC2C, tanto intrafamiliar como entre una familia y otra (Ben Hamida et al., 1996). Esta variación en parte puede explicarse por el tipo de mutaciones que se presentan. La mayoría corresponden a deleciones o inserciones que alteran el marco de lectura del gen y que conducen a falta de síntesis o a la producción de una proteína truncada; esto se asocia con un fenotipo grave, como lo que se observa con una de las mutaciones que más comúnmente se presentan en el gen  $\gamma$  sarcoglicano, la delta-521T. Sin embargo se han descrito otro tipo de mutaciones que originan manifestaciones leves de la enfermedad (Nowak et al., 2000).

Se ha sugerido que aproximadamente 30% de los pacientes que tienen una sarcoglicanopatía primaria presentan afección cardíaca (Melacini et al., 1999); por lo que llama la atención que en este paciente no se han presentado manifestaciones de cardiomiopatía asociada, pues el sarcoglicano  $\gamma$  normalmente se expresa en el músculo cardíaco (Calvo et al., 2000). Sin embargo, hay casos en los que no se detectan datos de disfunción cardíaca debido a que la afección puede no ser grave o presentarse como una condición subclínica, como se reporta en un estudio de 13 pacientes con mutaciones en los

sarcoglicanos  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  en quienes se evaluó la función cardíaca; en estos casos se sugiere que la ausencia de cardiomiopatía pudiera deberse a que la expresión de los sarcoglicanos sea menor en corazón que en el músculo esquelético o a que el sarcolema es menos inestable en el miocardio, debido a la distribución diferente de las fuerzas generadas por contracción del miocardio comparadas con las del músculo esquelético (Melacini et al., 1999).

Es recomendable que en este paciente se haga un seguimiento a largo plazo, principalmente por tratarse de un paciente joven con manifestaciones clínicas graves, para evaluar su progresión y monitorizar la función cardíaca, especialmente en etapas más avanzadas de la enfermedad.

Resultará de suma importancia el estudio de este paciente con metodologías que permitan identificar la mutación responsable, lo cual será un paso determinante para la caracterización del espectro mutacional de los genes sarcoglicano en pacientes mexicanos.

Respecto al paciente P5, el estudio de fluorescencia reveló ausencia en la inmunotinción de la proteína laminina, con tinción normal para las proteínas del complejo sarcoglicano y distrofina; sin embargo, las características de la fluorescencia observadas en las imágenes captadas corresponden a fibras pequeñas y escasas, aunque con tinción regularmente distribuida sobre la membrana. Existen reportes de que la inmunotinción de merosina en estos casos puede ser variable, y generalmente correlaciona con la gravedad de las manifestaciones; es decir, la deficiencia parcial de merosina se asocia con fenotipo menos grave a diferencia de lo que ocurre cuando hay ausencia total de la proteína (Sewry et al., 2000).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Al correlacionar los datos inmunohistoquímicos observados con la presentación clínica, se determinó que el diagnóstico corresponde a una forma congénita de distrofia muscular, ocasionada por ausencia de merosina (laminina). Esta condición produce una afección neuromuscular grave, caracterizada por hipotonía, debilidad y contracturas musculares que se manifiestan desde el nacimiento o dentro de los primeros meses de vida (Parano et al., 1995; Naom et al., 2000); estas características correspondieron a las presentadas por este paciente. Así mismo, los datos obtenidos mediante el análisis del árbol genealógico de la familia, concuerdan con el modelo de herencia autosómico recesivo descrito en estos casos, apoyado principalmente por el hecho de que el paciente es descendiente de padres sanos que provienen de un matrimonio consanguíneo, aunado al antecedente de haber tenido un primer hijo afectado con un cuadro clínico similar.

Debido a que la merosina muestra una expresión primaria en el músculo estriado y en las células de Schwann, además de las manifestaciones musculares pueden encontrarse hallazgos específicos en el sistema nervioso central que se hacen evidentes mediante estudios de imagen (tomografía axial computarizada e imagen de resonancia magnética); estos consisten principalmente en alteraciones de mielinización en la sustancia blanca (Parano et al., 1995; Mahjneh et al., 1999). Dados los hallazgos en los estudios de imagen comentados previamente para este paciente, podemos considerar en forma general que corresponde a un caso clásico de distrofia muscular congénita.

Resulta relevante que en este paciente se hayan presentado alteraciones cardíacas principalmente aquellas relacionadas con la función miocárdica (dilatación e hipertrofia del ventrículo izquierdo), dado que se considera un hallazgo que no es frecuentemente reportado en la literatura en este tipo de distrofia muscular.

En el caso del paciente 12, se manifiesta un cuadro sugerente de DMB, pues presenta curso clínico menos grave y lento; hasta la edad actual del paciente, que es de 15 años, no hay pérdida de la capacidad ambulatoria, siendo éste uno de los criterios clínicos que hacen posible diferenciar la DMB de la DMD. El estudio de inmunofluorescencia muestra gran correlación y especificidad con el cuadro clínico del paciente, pues la inmunotinción para distrofina muestra fibras musculares con disminución de la fluorescencia en comparación con el músculo normal utilizado como control positivo; la expresión de las proteínas del complejo sarcoglicano y laminina se consideran normales.

La diferencia en la tinción observada entre los casos de DMD y DMB se explica por la naturaleza de las mutaciones; es decir, aquellas que rompen el marco de lectura del gen determinan la ausencia de la proteína; mientras que las que lo mantienen, producen una proteína truncada parcialmente funcional, la cual preserva el extremo carboxilo terminal. Esto explica las diferencias clínicas y de inmunofluorescencia entre las dos entidades y la variabilidad observada en los casos de DMB (Sewry, 2000).

Tomando en cuenta que el caso de este paciente se presenta por primera vez en la familia, por el momento no es posible distinguir si corresponde a una mutación *de novo* o a la transmisión por la madre portadora sin antecedentes; sin embargo, dados los hallazgos observados resultará conveniente realizar estudios bioquímicos y moleculares, tanto en la madre como en el paciente, con fines de asesoramiento genético.

Otro caso que resulta interesante, es el del paciente 33, cuya inmunofluorescencia muestra ausencia total de distrofina, hallazgo compatible con el diagnóstico de DMD. Sin embargo, la fluorescencia marcada con el anticuerpo para DYS-2, muestra dos fibras musculares centrales con expresión normal de distrofina, consideradas como fibras revertantes.

La expresión de distrofina en las fibras revertantes se origina por restauración del marco de lectura, en ocasiones debido a procesamientos alternativos del gen. El número de fibras revertantes que se pueden encontrar en una biopsia es variable; algunas veces puede no haber ninguna, o como en este caso haber sólo algunas aisladas, aunque en otros casos pueden detectarse en grupos. Se considera que el número de fibras revertantes encontradas no tiene correlación con la gravedad con la que se presenta el cuadro clínico (Sewry, 2000). En relación al resto de los pacientes estudiados en quienes no se encontraron anomalías de inmunofluorescencia, no podemos excluir la posibilidad de distrofia muscular, si se toma en consideración que se utilizaron anticuerpos para identificar seis diferentes proteínas relacionadas con distrofia muscular, siendo que actualmente se han reconocido 13 tipos diferentes de distrofia muscular de cinturas autosómicas recesivas, además de las formas autosómicas dominantes y las ya ampliamente conocidas DMD y DMB (ligadas al cromosoma X). Dentro de estos grupos hay una gran diversidad de mecanismos involucrados en la fisiopatología muscular, no sólo relacionados al defecto primario del gen, sino a otros factores tanto genéticos como ambientales, que pueden influir en los efectos de una mutación (Bushby, 1999).

A medida que se incrementa el número de genes y proteínas implicadas con distrofia muscular, se hace más complejo efectuar el diagnóstico partiendo únicamente del cuadro clínico. Por lo tanto, las estrategias de investigación basadas en la identificación de proteínas, como lo es método de inmunofluorescencia, constituyen una herramienta útil, pues actualmente están disponibles una gran cantidad de anticuerpos, que incrementan la posibilidad de determinar un diagnóstico preciso en éstos pacientes.

## 9. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se estudiaron 33 pacientes con cuadro clínico compatible con distrofia muscular. Para su selección se incluyeron los datos de las manifestaciones clínicas, así como de los estudios paraclínicos y bioquímicos tales como niveles séricos de CPK elevados, electromiografía compatible con patrón miopático y alteraciones histopatológicas sugerentes de un proceso distrófico en las fibras musculares.

Con el objetivo de determinar si en estos pacientes se presentan deficiencias de algunas de las proteínas del complejo distrofina glicoproteínas (específicamente distrofina, sarcoglicanos y laminina) se efectuó un análisis de inmunofluorescencia indirecta en biopsias musculares.

Se tomaron biopsias de músculo cuádriceps o deltoides y se hicieron criosecciones; se dirigieron anticuerpos monoclonales contra las proteínas del CDG:

- Distrofina (DYS2: extremo carboxilo y DYS3: extremo amino terminal).
- Sarcoglicanos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ).
- Laminina.

De los pacientes analizados, se identificaron deficiencias de las proteínas del CDG en cuatro casos. Se encontraron dos pacientes con distrofinopatías, uno de ellos muestra deficiencia severa de distrofina, cuyo diagnóstico correlaciona con una DMD; el otro caso corresponde a un paciente con deficiencia parcial de distrofina, lo que indica un diagnóstico compatible con DMB. En otro caso se identificó ausencia de laminina en la fibras

musculares, indicando en este paciente, tanto por el estudio de inmunofluorescencia como por los datos clínicos, una distrofia muscular congénita por deficiencia de merosina (laminina). Finalmente, hubo un paciente más en quien se estableció el diagnóstico de sarcoglicanopatía  $\gamma$  (DMC2C), que en forma alterna produce deficiencia secundaria del resto de los integrantes del complejo sarcoglicano ( $\beta$  y  $\delta$  SG).

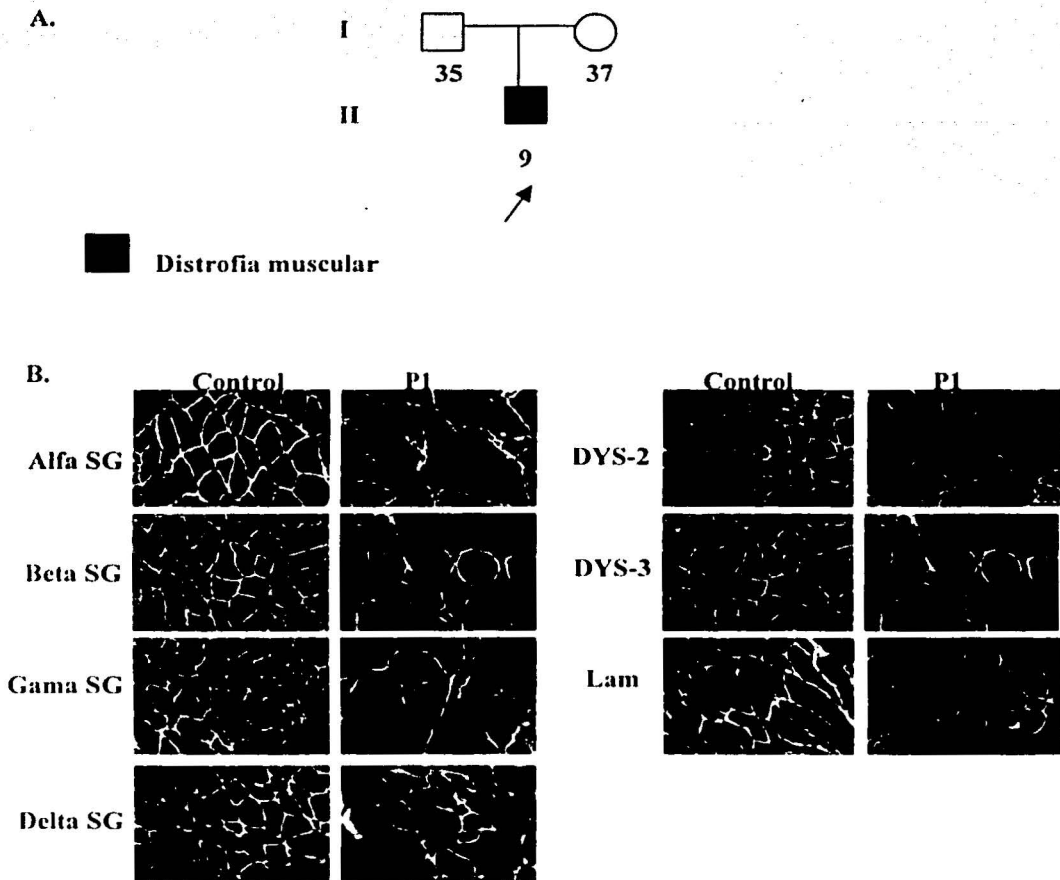
Haciendo un análisis de los resultados obtenidos podemos concluir que, de manera similar a lo reportado en la literatura, encontramos un mayor número de casos con DMD/DMB, mientras que los casos de distrofia muscular de cinturas y distrofia muscular congénita se presentaron con menos frecuencia en nuestros pacientes estudiados. En tales casos el diagnóstico mediante inmunofluorescencia indirecta constituye una herramienta útil para establecer un diagnóstico más certero en pacientes con distrofias musculares.

Además, con los datos obtenidos será posible dirigir la búsqueda de mutaciones en los genes responsables de las distrofias musculares en estos pacientes, mediante técnicas de biología molecular.

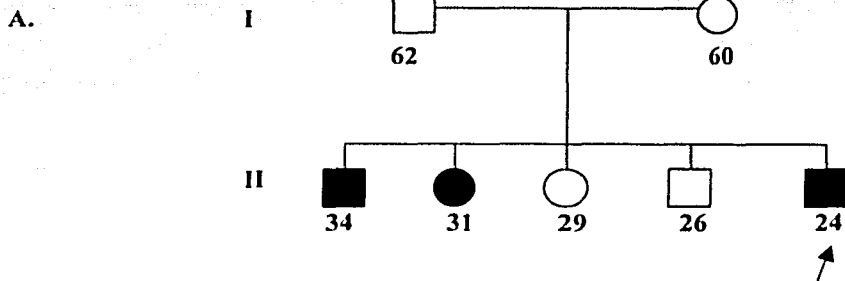
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ANEXO 1

### Árboles genealógicos e imágenes de inmunofluorescencia



**Figura 10. A. Árbol genealógico del paciente 1.** Se trata de un paciente masculino de 9 años de edad, que se presenta como caso único en la familia. **B. Imagen de inmunofluorescencia del paciente 1.** Se observa tinción normal de las proteínas estudiadas. SG: sarcoglicano. DYS-2: distrofina extremo carboxilo. DYS-3: distrofina extremo amino. Lam: laminina.



■ ● Distrofia muscular

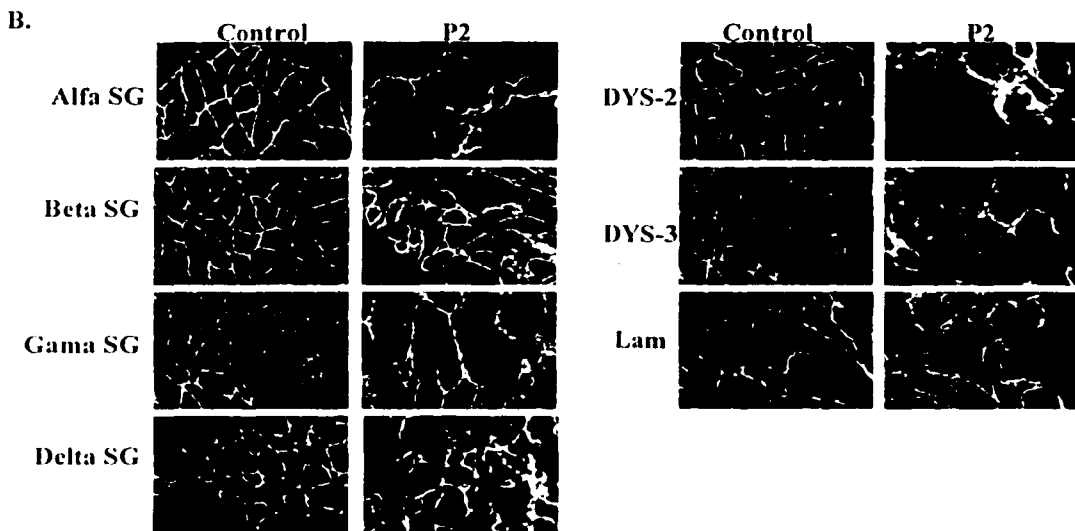
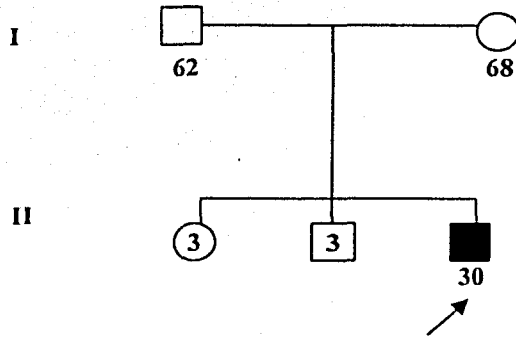


Figura 11. A. Árbol genealógico del paciente 2. Se trata de un paciente masculino de 24 años de edad, con antecedente dos hermanos afectados con distrofia muscular. B. Imagen de inmunofluorescencia del paciente 2. Se observa tinción normal de las proteínas estudiadas. SG: sarcoglicano. DYS-2: distrofina extremo carboxilo. DYS-3: distrofina extremo amino. Lam: laminina.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



A.



■ Distrofia muscular

**Figura 12. A. Árbol genealógico del paciente 3.** Corresponde a un paciente masculino de 30 años de edad, se presenta como caso único en la familia. No se muestra la imagen de inmunofluorescencia ya que no se identificaron fibras musculares por inmunotinción debido al proceso distrófico avanzado.

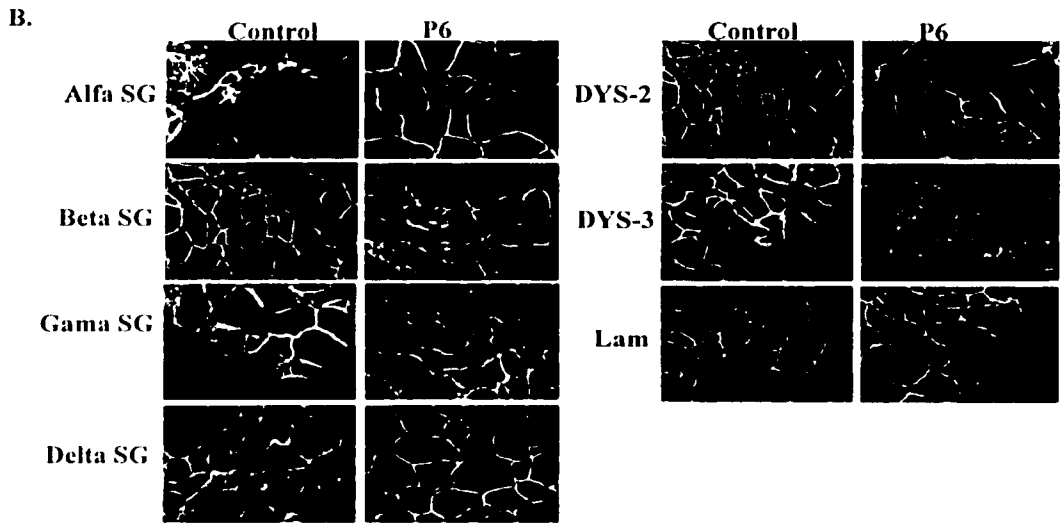
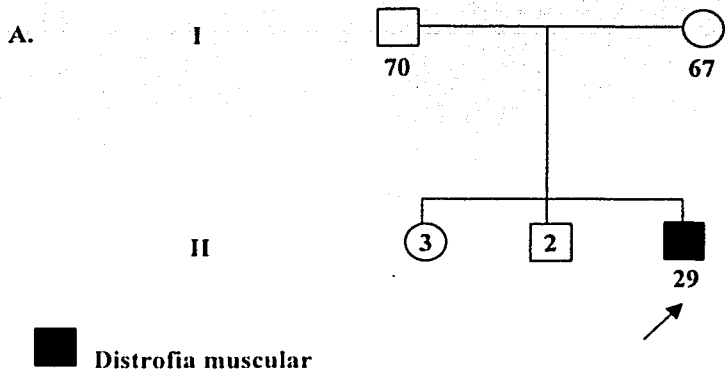
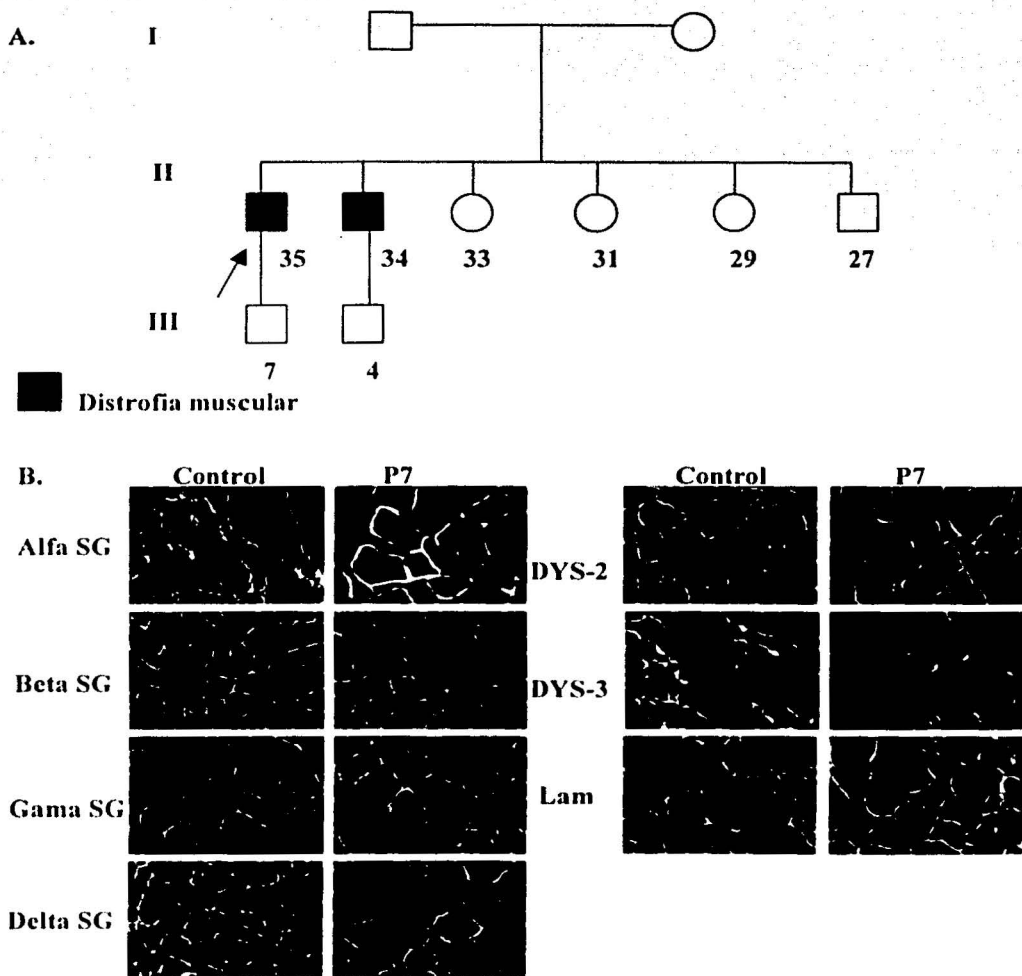


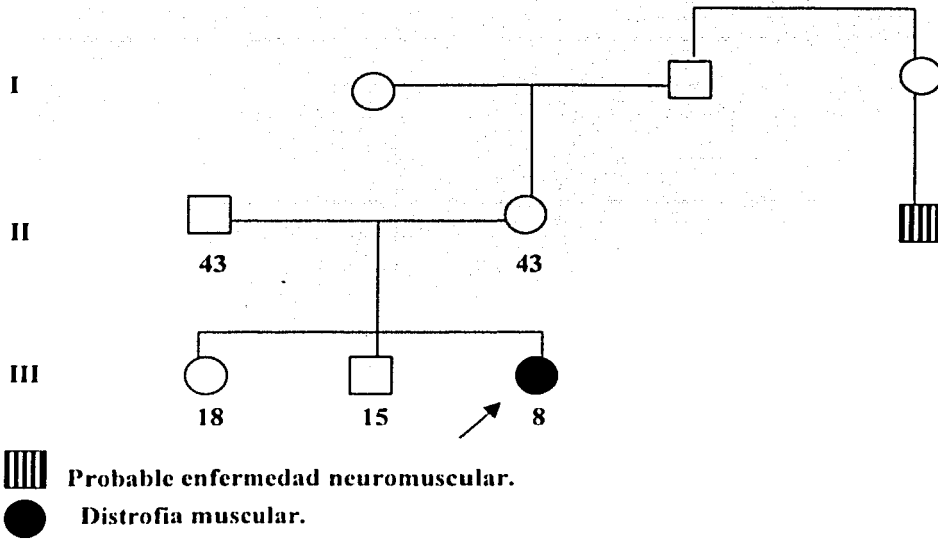
Figura 13. A. Árbol genealógico del paciente 6. Se trata de un paciente masculino de 29 años de edad, que se presenta como caso único en la familia. B. Imagen de inmunofluorescencia del paciente 6. Se observa tinción normal de las proteínas estudiadas. SG: sarcoglicano. DYS-2: distrofina extremo carboxilo. DYS-3: distrofina extremo amino. Lam: laminina.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



**Figura 14. A.** Árbol genealógico del paciente 7. Se trata de un paciente masculino de 35 años de edad, con antecedente de un hermano afectado con distrofia muscular. **B.** Imagen de inmunofluorescencia del paciente 7. Se observa tinción normal de las proteínas estudiadas. SG: sarcoglicano. DYS-2: distrofina extremo carboxilo. DYS-3: distrofina extremo amino. Lam: laminina.

A.



B.

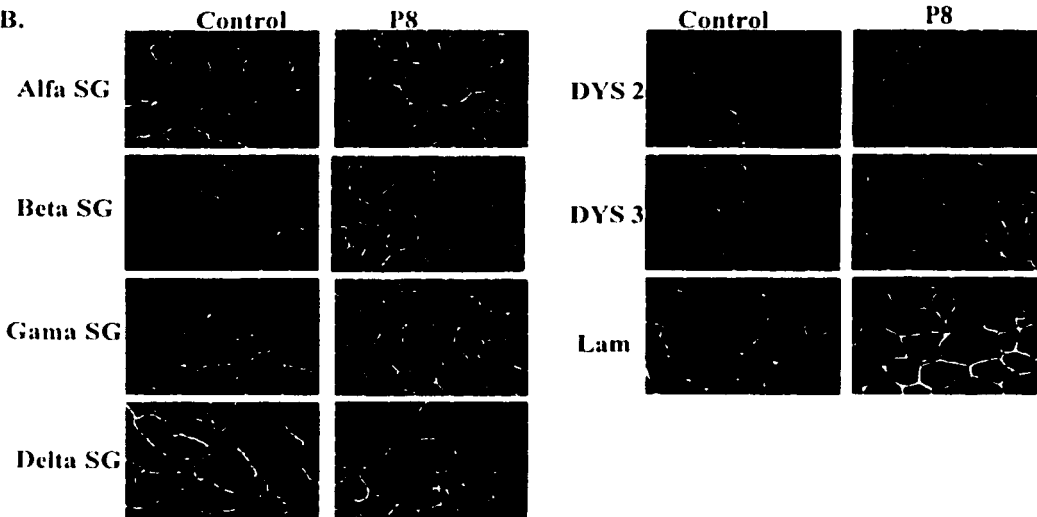
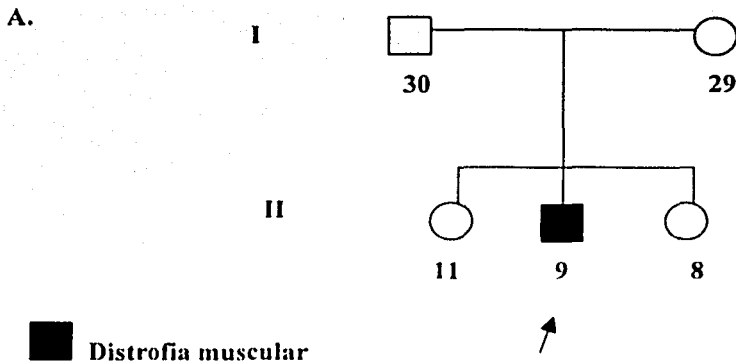


Figura 15. A. Árbol genealógico del paciente 8. Se trata de una paciente femenina de 8 años de edad con distrofia muscular; existe el antecedente familiar de un tío materno en 2º grado afectado con una enfermedad neuromuscular no especificada. B. Imagen de inmunofluorescencia del paciente 8. Se observa tinte normal de las proteínas estudiadas. SG: sarcoglicano. DYS-2: distrofina extremo carboxilo. DYS-3: distrofina extremo amino. Lam: laminina.



**Figura 16. A. Árbol genealógico del paciente 9.** Corresponde a un paciente masculino de 9 años de edad, se presenta como caso único en la familia. No se muestra la imagen de inmunofluorescencia ya que no se identificaron fibras musculares por inmunotinción debido al proceso distrófico avanzado.

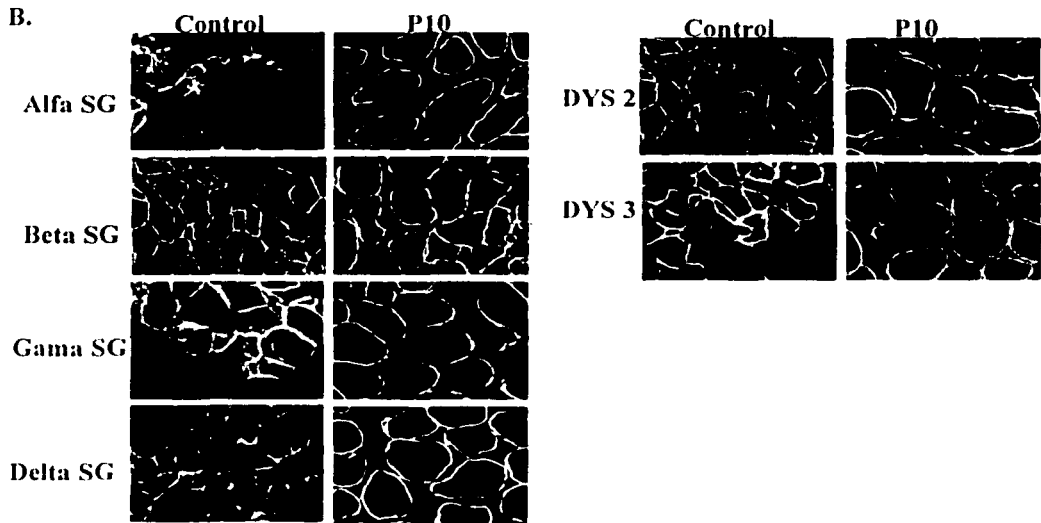
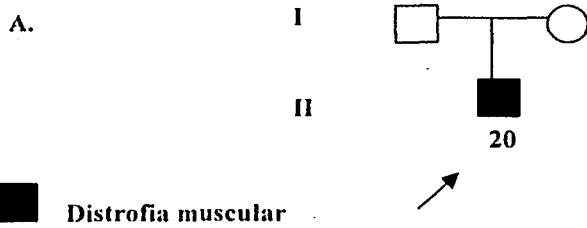
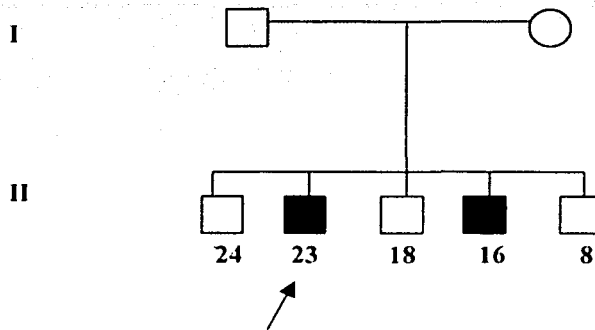


Figura 17. A. Árbol genealógico del paciente 10. Se trata de un paciente masculino de 20 años de edad; se desconocen los antecedentes familiares y datos clínicos completos respecto al cuadro de distrofia muscular. B. Imagen de inmunofluorescencia del paciente 10. Se observa tinción normal de las proteínas estudiadas. SG: sarcoglicano. DYS-2: distrofina extremo carboxilo. DYS-3: distrofina extremo amino.

A.



■ Distrofia muscular

B.

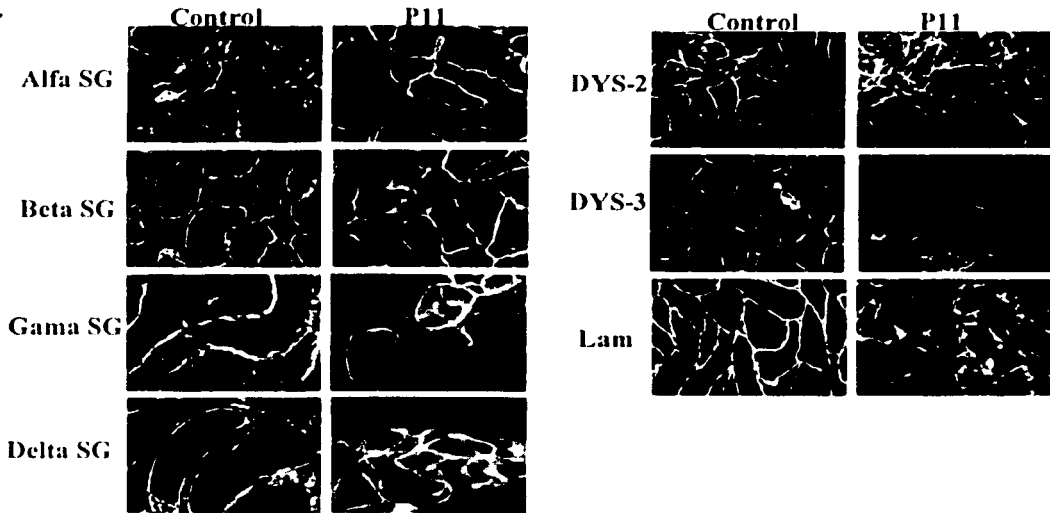
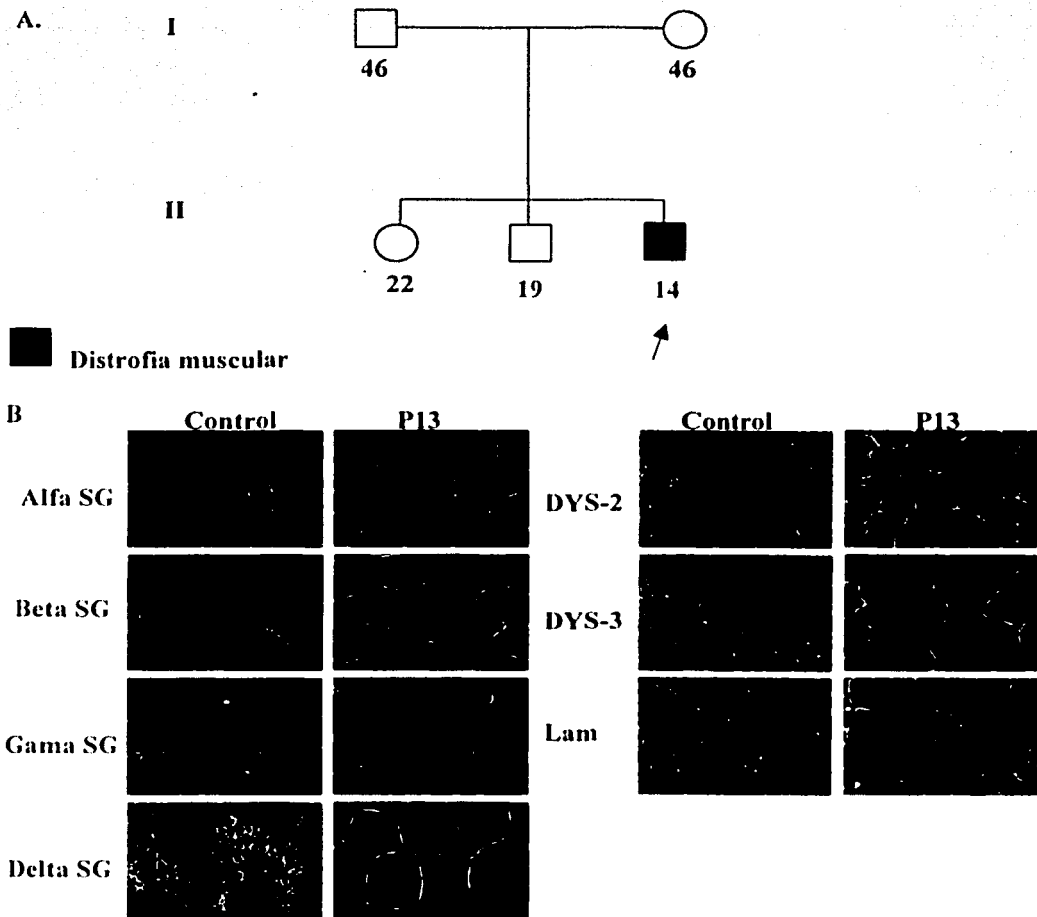


Figura 18. A. Árbol genealógico del paciente 11. Se trata de un paciente masculino de 23 años de edad, con antecedente de un hermano afectado con distrofia muscular. B. Imagen de inmunofluorescencia del paciente 11. Se observa tinción normal de las proteínas estudiadas. SG: sarcoglicano. DYS-2: distrofina extremo carboxilo. DYS-3: distrofina extremo amino. Lam: laminina.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 19. A. Árbol genealógico del paciente 13.** Se trata de un paciente masculino de 14 años de edad, identificado como caso único en la familia. **B. Imagen de inmunofluorescencia del paciente 13.** Se observa tinción normal de las proteínas estudiadas. SG: sarcoglicano. DYS-2: distrofina extremo carboxilo. DYS-3: distrofina extremo amino. Lam: laminina.



A.

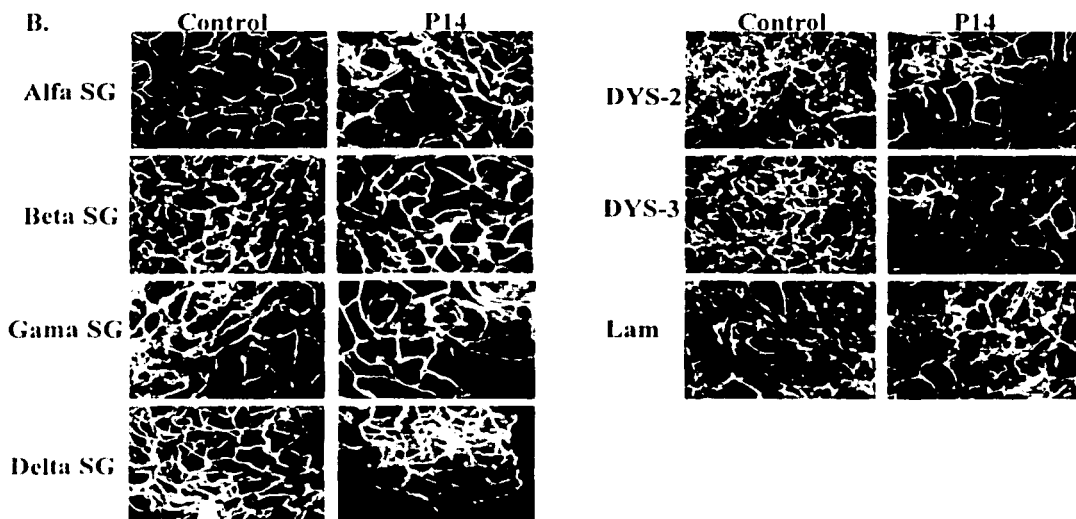
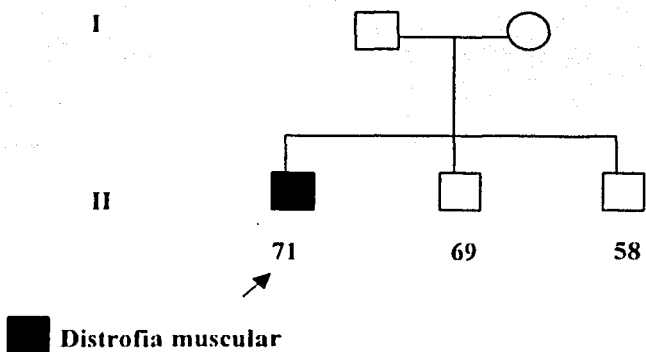


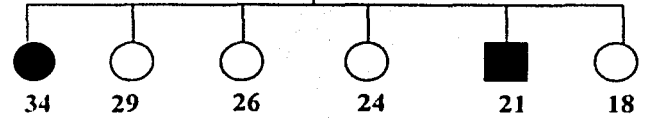
Figura 20. A. Árbol genealógico del paciente 14. Se trata de un paciente masculino de 71 años de edad, identificado como un caso único en la familia. B. Imagen de inmunofluorescencia del paciente 14. Se observa tinción normal de las proteínas analizadas. SG: sarcoglicano. DYS-2: distrofina extremo carboxilo. DYS-3: distrofina extremo amino. Lam: laminina.

A.

I



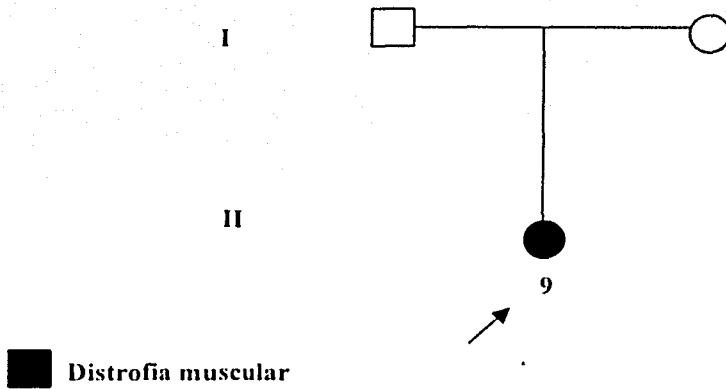
II



■ ● Distrofia muscular

Figura 21. A. Árbol genealógico del paciente 15. Se trata de una paciente femenina de 34 años de edad; presenta el antecedente de un hermano varón con manifestaciones de distrofia muscular. No se muestra la imagen de inmunofluorescencia ya que no se identificaron fibras musculares por el método de inmunohistoquímica debido al proceso distrófico avanzado.

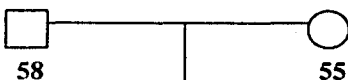
A.



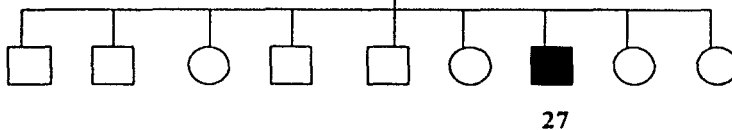
**Figura 22. A. Árbol genealógico del paciente 16.** Corresponde a una paciente femenina de 9 años de edad, se presenta como caso único en la familia. No se muestra la imagen de inmunofluorescencia ya que no se identificaron fibras musculares por inmunotinción debido al proceso distrófico avanzado.

A.

I



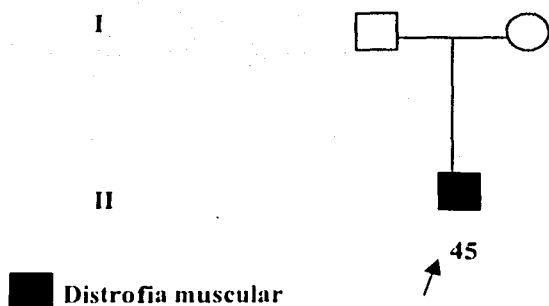
II



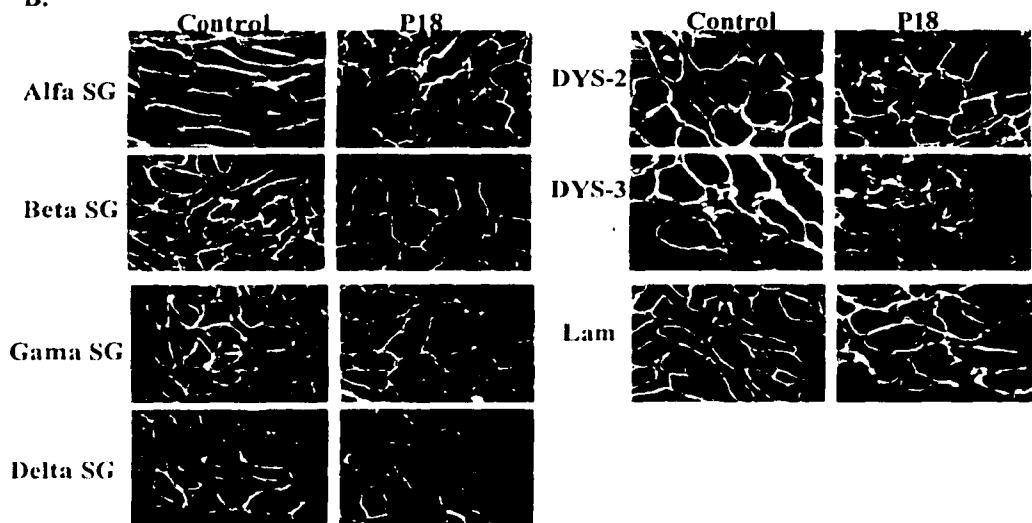
Distrofia muscular

Figura 23. A. Árbol genealógico del paciente 17. Corresponde a un paciente masculino de 27 años de edad, se presenta como caso único en la familia. No se muestra la imagen de inmunofluorescencia ya que no se identificaron fibras musculares por inmunotinción debido al proceso distrófico avanzado.

A.

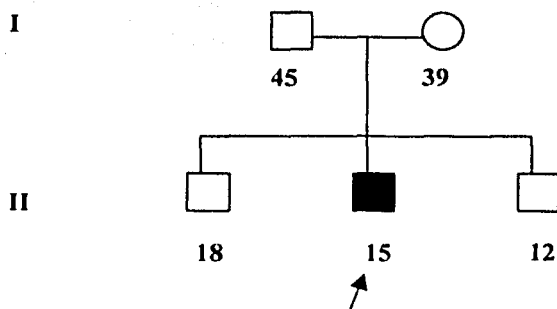


B.



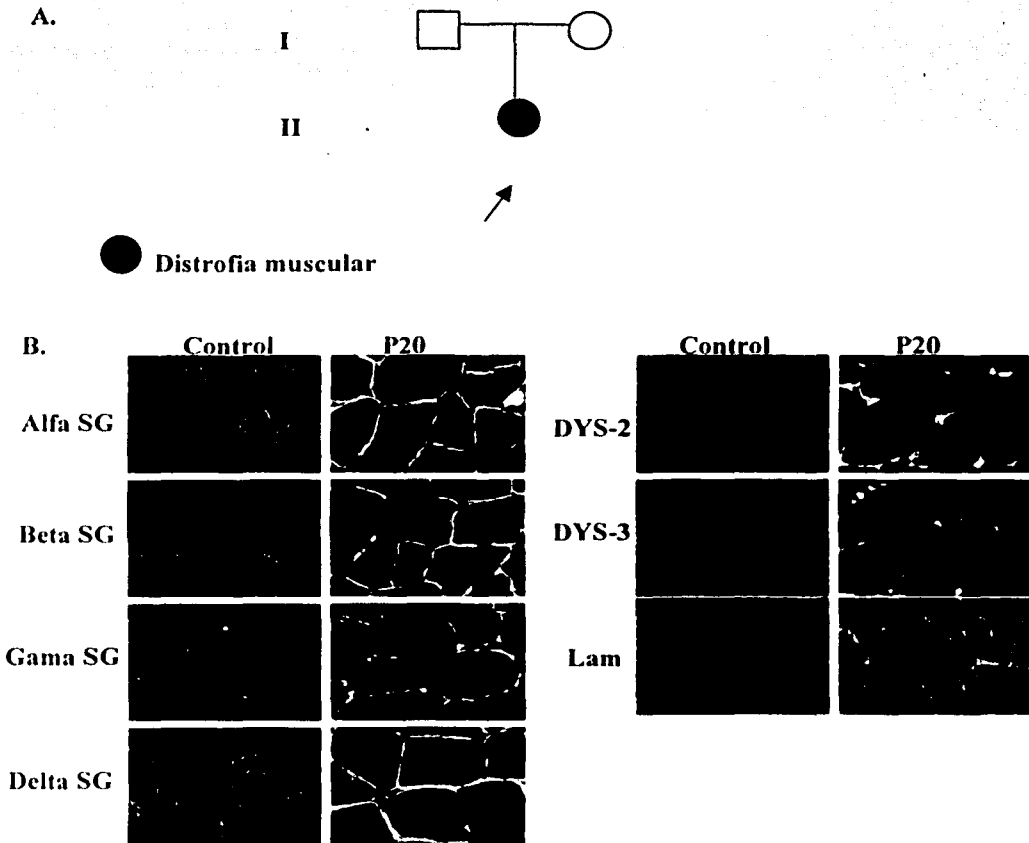
**Figura 24. A. Árbol genealógico del paciente 18.** Se trata de un paciente masculino de 45 años de edad; no se especifican los antecedentes familiares debido a que no se pudo integrar la historia clínica completa. **B. Imagen de inmunofluorescencia del paciente 18.** Se observa tinción normal de las proteínas analizadas. SG: sarcoglicano. DYS-2: Distrofina extremo carboxilo. DYS-3: distrofina extremo amino. Lam: laminina.

A.



■ Distrofia muscular

Figura 25. A. Árbol genealógico del paciente 19. Se trata de un paciente masculino de 15 años de edad, identificado como un caso único en la familia. No se muestra la imagen de inmunofluorescencia ya que no se identificaron fibras musculares por inmunotinción debido al proceso distrófico avanzado.



**Figura 26. A. Árbol genealógico del paciente 20.** Se trata de una paciente femenina con manifestaciones clínicas de distrofia muscular; los datos se muestran incompletos debido a que no fue posible integrar su historia clínica completa. **B. Imagen de inmunofluorescencia del paciente 20.** Se observa tinción normal de las proteínas estudiadas. SG: sarcoglicano. DYS-2: distrofina extremo carboxilo. DYS-3: distrofina extremo amino. Lam: laminina.

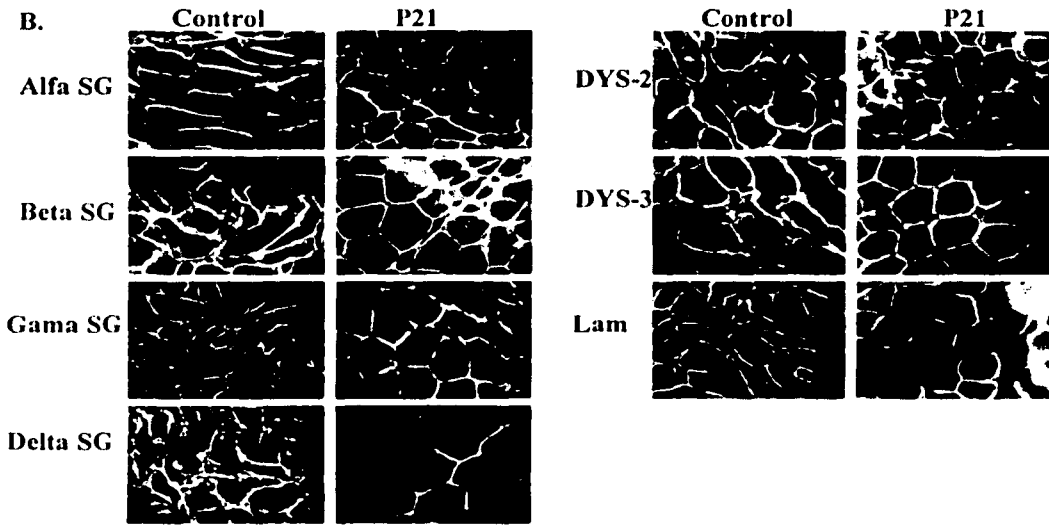
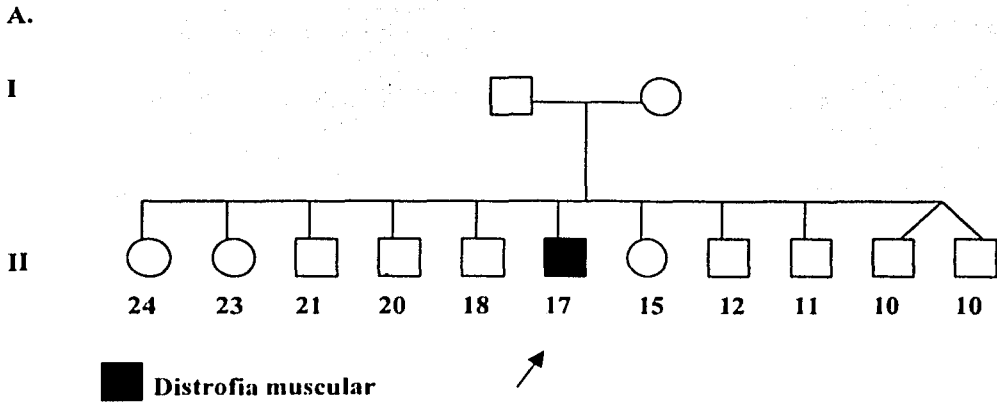
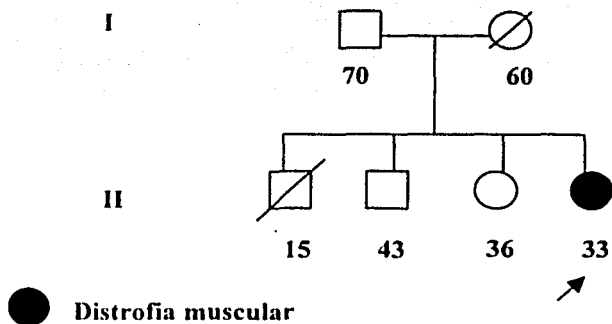


Figura 27. A. Árbol genealógico del paciente 21. Se trata de un paciente masculino de 17 años de edad, identificado como un caso único en la familia. B. Imagen de inmunofluorescencia del paciente 21. Se observa tinción normal de las proteínas analizadas. SG: sarcoglicano. DYS-2: distrofina extremo carboxilo. DYS-3: distrofina extremo amino. Lam: laminina.



A.



B.

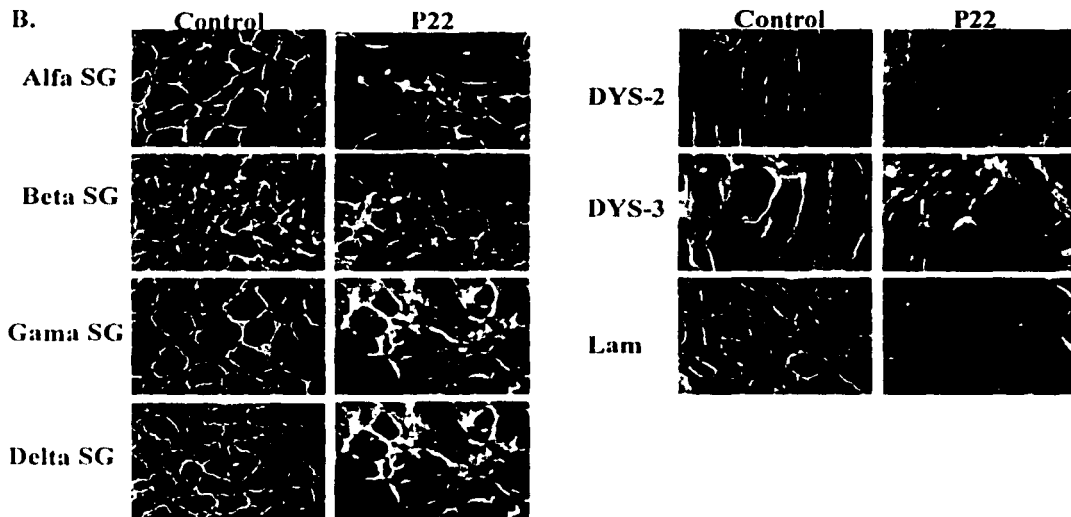
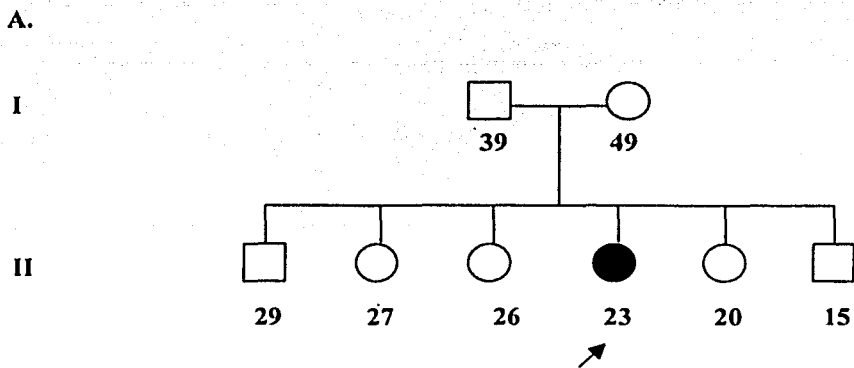


Figura 28. A. Árbol genealógico del paciente 22. Se trata de una paciente femenina de 33 años de edad, identificado como un caso único en la familia. B. Imagen de inmunofluorescencia del paciente 22. Se observa tinción normal de las proteínas analizadas. SG: sarcoglicano. DYS-2: distrofina extremo carboxilo. DYS-3: distrofina extremo amino. Lam: laminina.



● Distrofia muscular

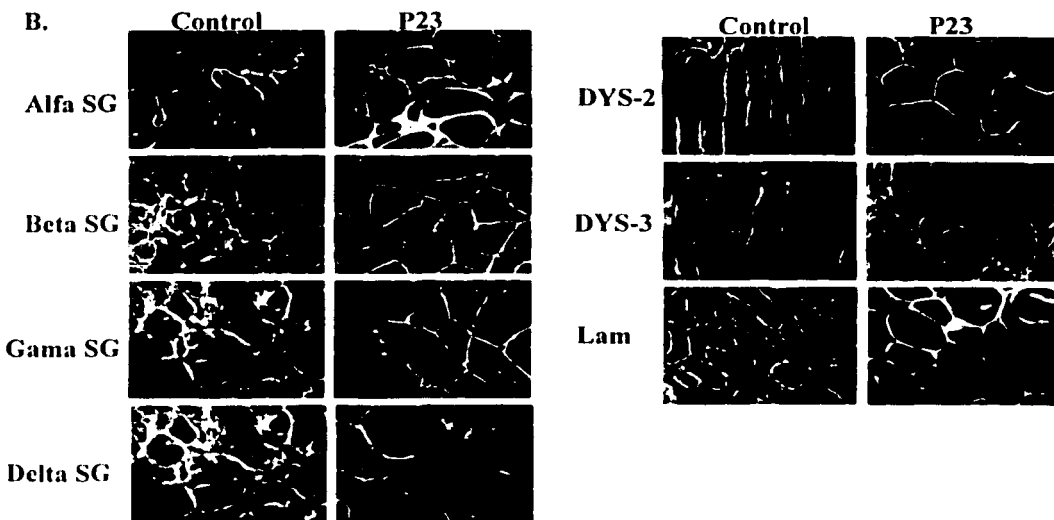
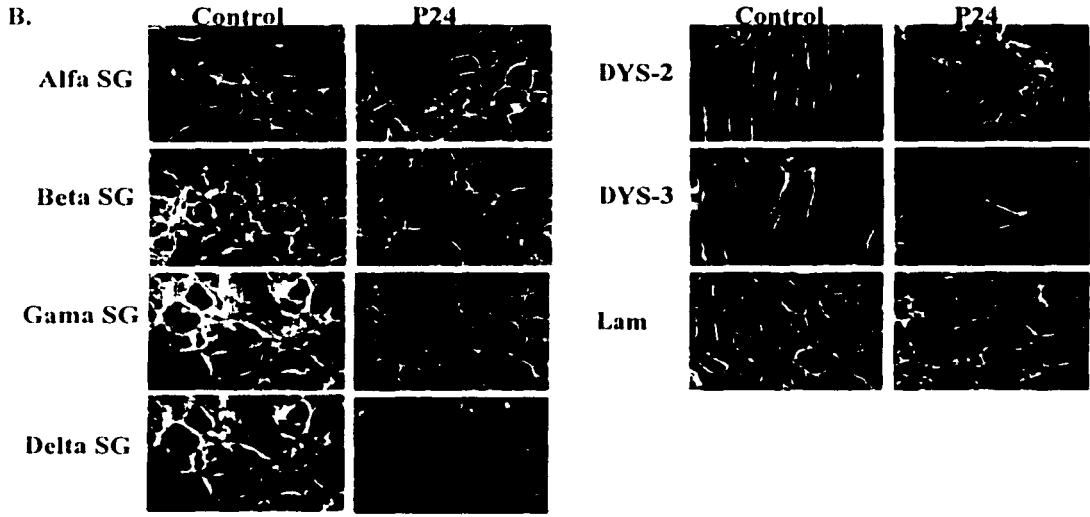
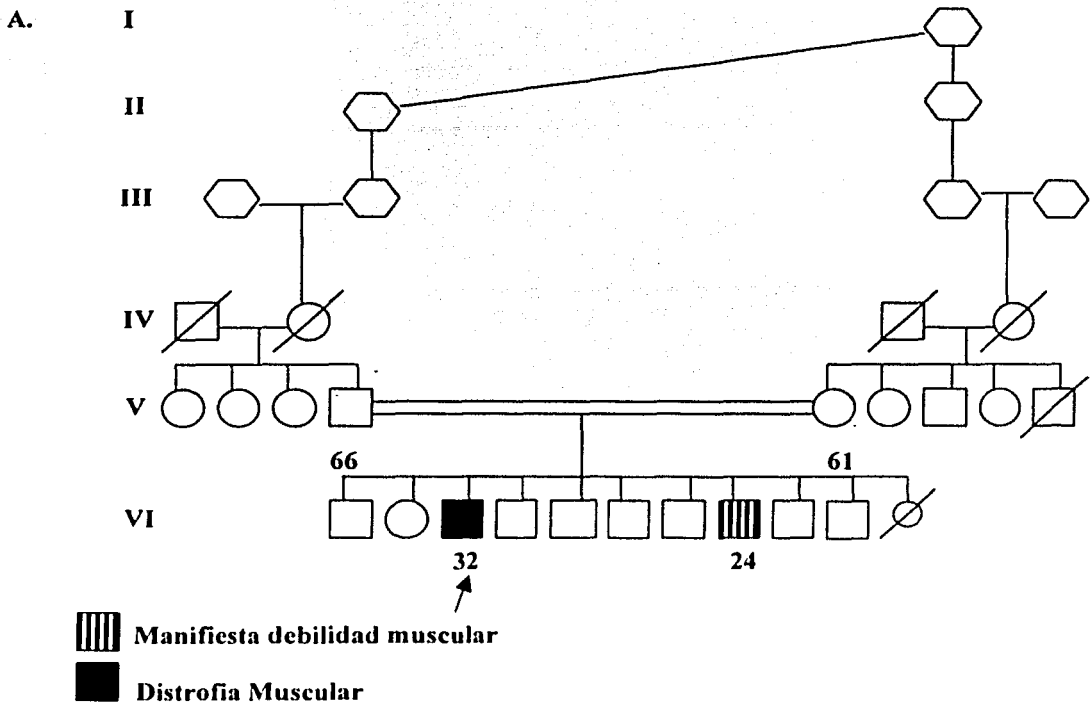


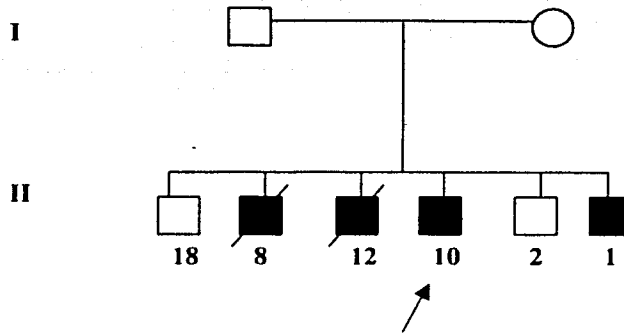
Figura 29. A. Árbol genealógico del paciente 23. Se trata de una paciente femenina de 23 años de edad, identificado como un caso único en la familia. B. Imagen de inmunofluorescencia del paciente 23. Se observa tinción normal de las proteínas analizadas. SG: sarcoglicano. DYS-2: distrofina extremo carboxilo. DYS-3: distrofina extremo amino. Lam: laminina.



**Figura 30. A.Árbol genealógico del paciente 24.** Se trata de un paciente masculino de 32 años de edad, hijo de padres consanguíneos, con antecedente de un hermano varón con un cuadro de debilidad muscular similar. **B. Imagen de inmunofluorescencia del paciente 24.** Se observa tinción normal de las proteínas analizadas. SG: sarcoglicano. DYS-2: distrofina extremo carboxilo. DYS-3: distrofina extremo amino. Lam: laminina.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

A.



B.

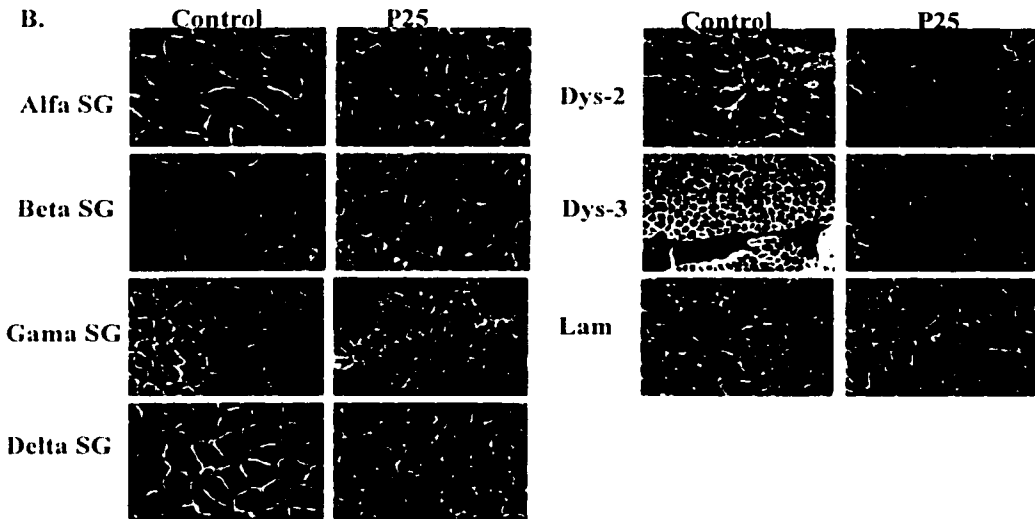


Figura 31. A. Árbol genealógico del paciente 25. Se trata de un paciente masculino de 10 años de edad, con antecedente de tres hermanos afectados con distrofia muscular. B. Imagen de inmunofluorescencia del paciente 25. Se observa tinción normal de las proteínas estudiadas. SG: sarcoglicano. DYS-2: distrofina extremo carboxilo. DYS-3: distrofina extremo amino. Lam: laminina.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

A.

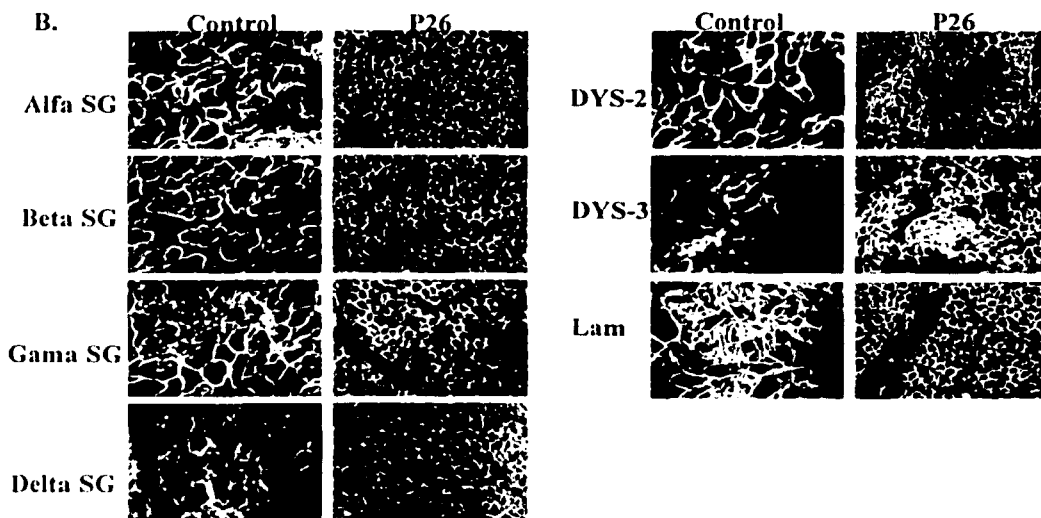
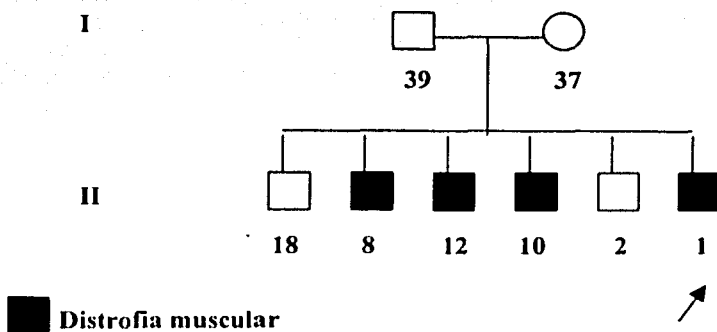
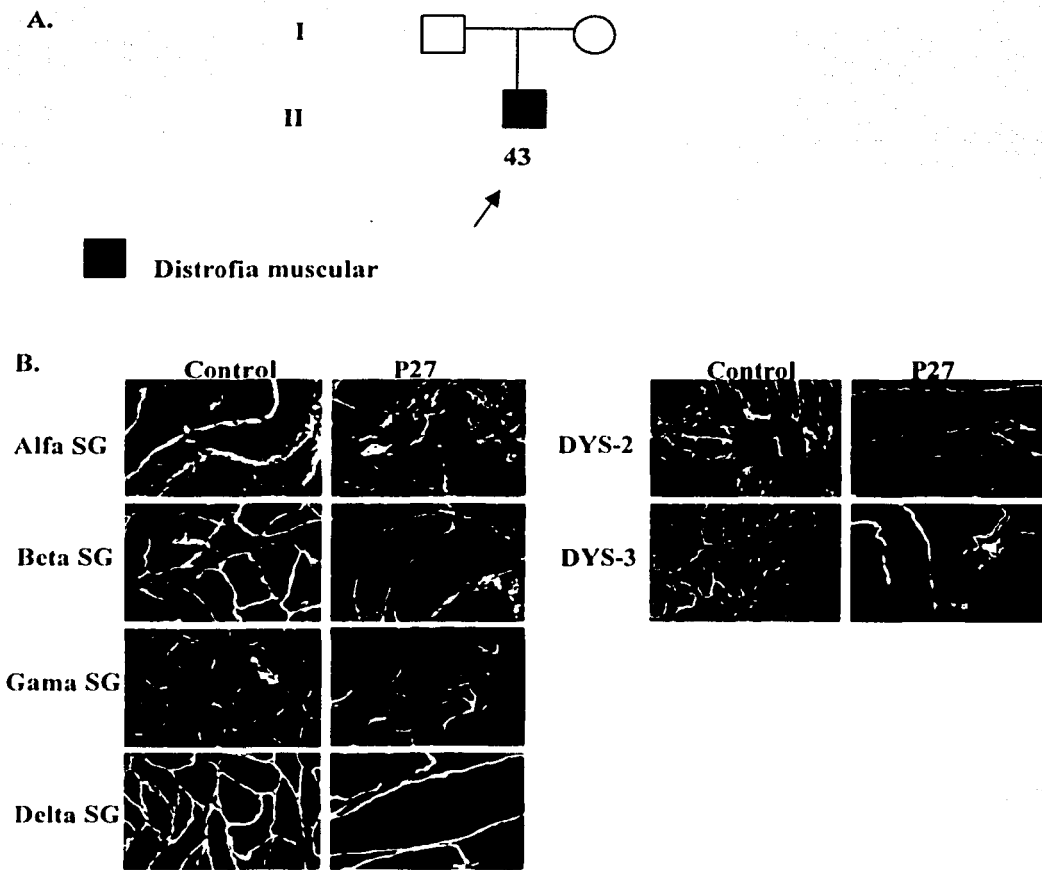
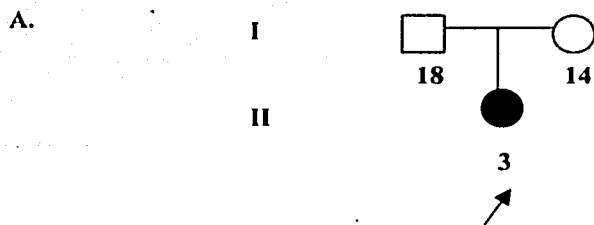


Figura 32. A. Árbol genealógico del paciente 26. Se trata de un paciente masculino de 1 año de edad; existe el antecedente familiar de distrofia muscular en tres hermanos varones. B. Imagen de inmunofluorescencia del paciente 26. Se observa tinción normal de las proteínas analizadas. SG: sarcoglicano. DYS-2: distrofina extremo carboxilo. DYS-3: distrofina extremo amino. Lam: laminina.



**Figura 33. A. Árbol genealógico del paciente 27.** Se trata de un paciente masculino de 43 años de edad; no se presentan todos los datos familiares, pues no se pudo integrar su historia clínica completa. **B. Imagen de inmunofluorescencia del paciente 27.** Se observa tinción normal de las proteínas estudiadas. SG: sarcoglicano. **DYS-2:** distrofina extremo carboxilo. **DYS-3:** distrofina extremo amino.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



● Distrofia muscular

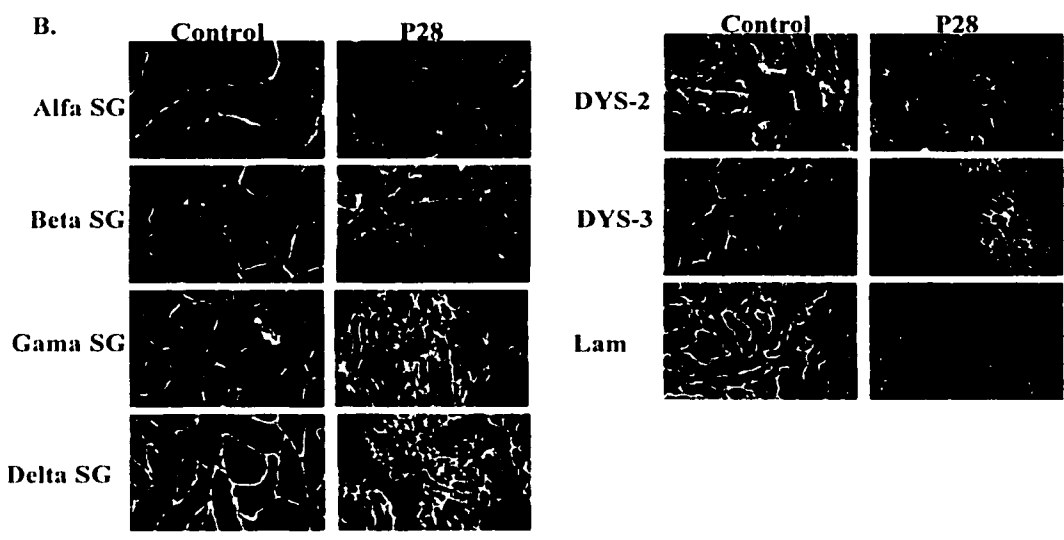
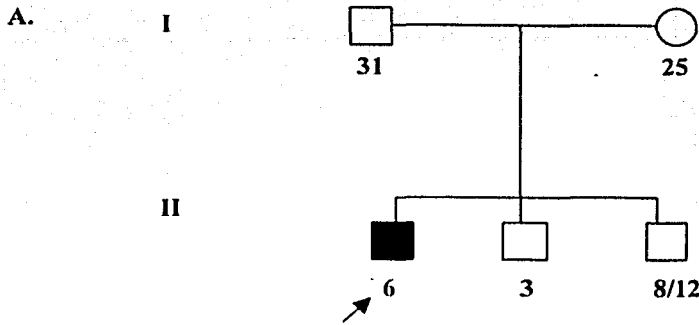


Figura 34. A. Árbol genealógico del paciente 28. Se trata de una paciente femenina de 3 años de edad, que se presenta como caso único en la familia. B. Imagen de inmunofluorescencia del paciente 28. Se observa tinción normal de las proteínas estudiadas. SG: sarcoglicano. DYS-2: distrofina extremo carboxilo. DYS-3: distrofina extremo amino. Lam: laminina.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



■ Distrofia muscular

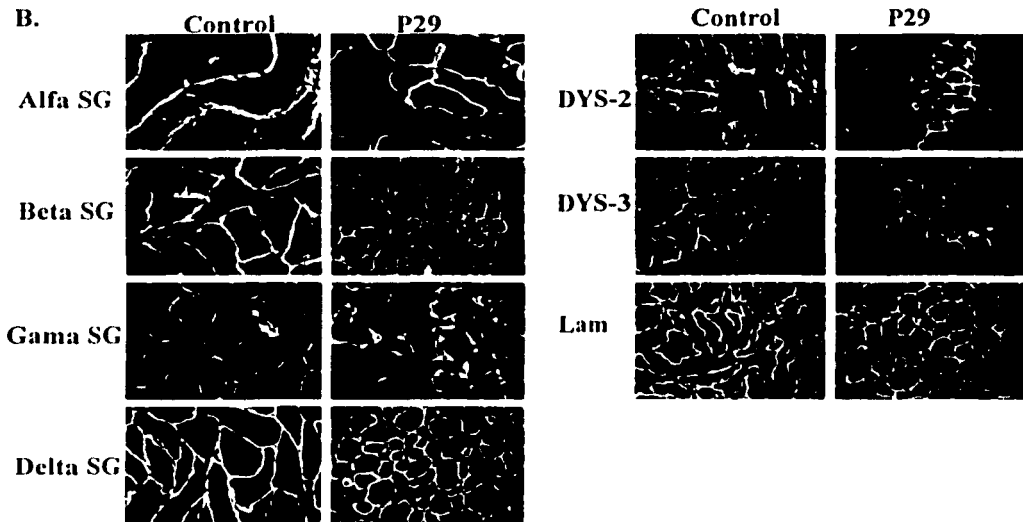


Figura 35. A. Árbol genealógico del paciente 29. Se trata de un paciente masculino de 6 años de edad, identificado como caso único en la familia. B. Imagen de inmunofluorescencia del paciente 29. Se observa tinción normal de las proteínas estudiadas. SG: sarcoglicano. DYS-2: distrofina extremo carboxilo. DYS-3: distrofina extremo amino. Lam: laminina.



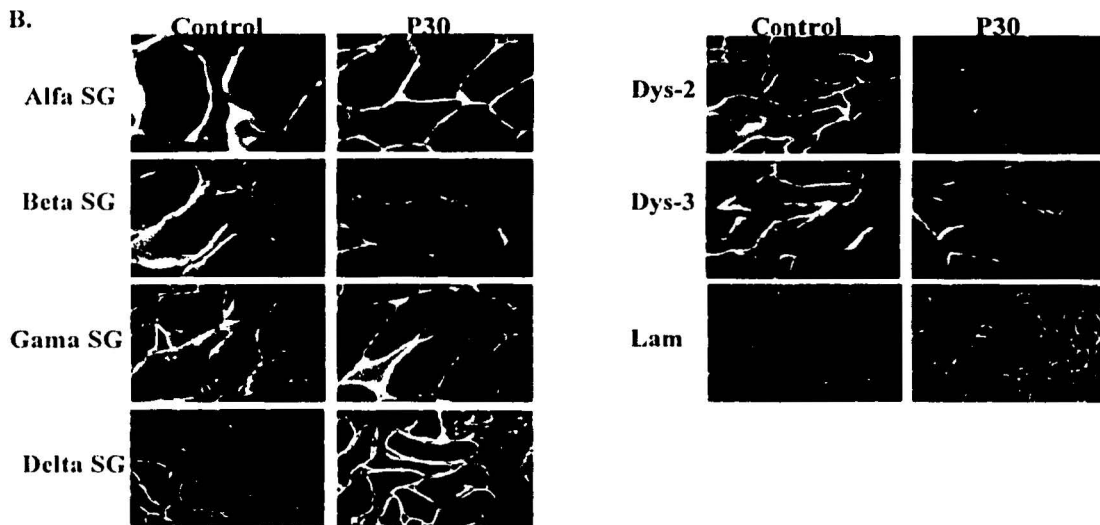
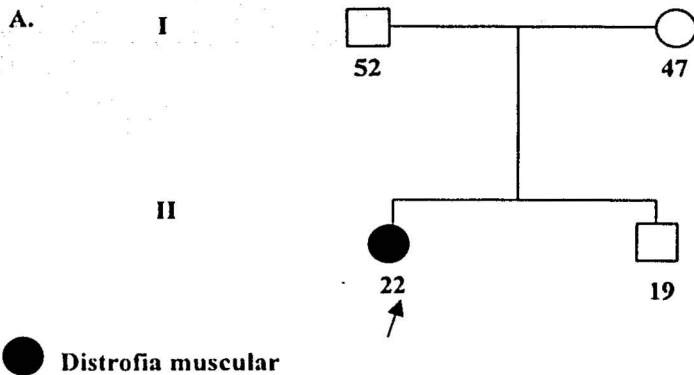


Figura 36. A. Árbol genealógico del paciente 30. Se trata de una paciente femenina de 22 años de edad, identificado como caso único en la familia. B. Imagen de inmunofluorescencia del paciente 30. Se observa tinción normal de las proteínas estudiadas. SG: sarcoglicano. DYS-2: distrofina extremo carboxilo. DYS-3: distrofina extremo amino. Lam: laminina.

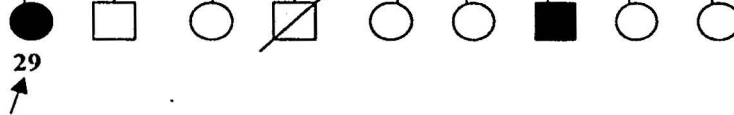
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

A.

I



II



■ ● Distrofia muscular

B.

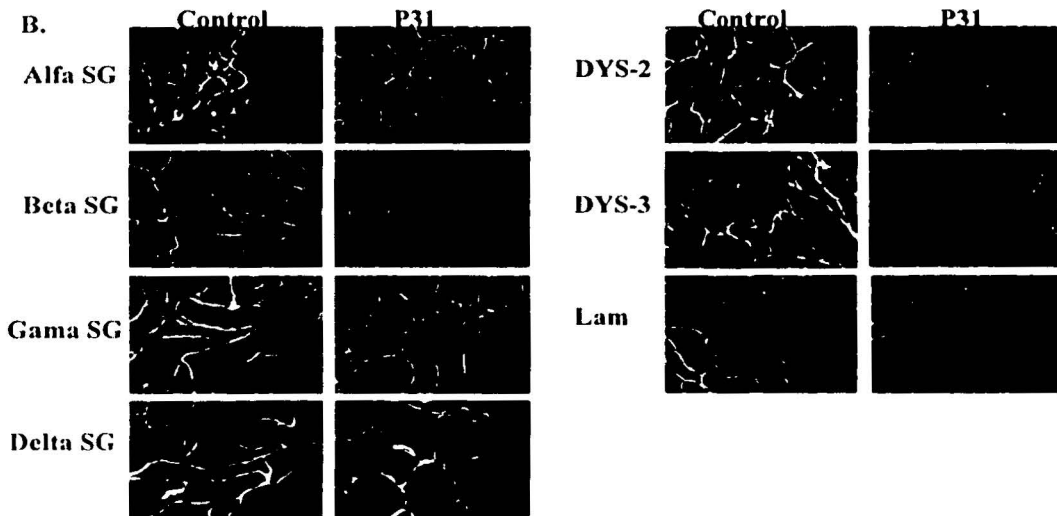


Figura 37. A. Árbol genealógico del paciente 31. Se trata de una paciente femenina de 29 años de edad, con antecedente de un hermano afectado con distrofia muscular. B. Imagen de inmunofluorescencia del paciente 31. Se observa tinción normal de las proteínas estudiadas. SG: sarcoglicano. DYS-2: distrofina extremo carboxilo. DYS-3: distrofina extremo amino. Lam: laminina.

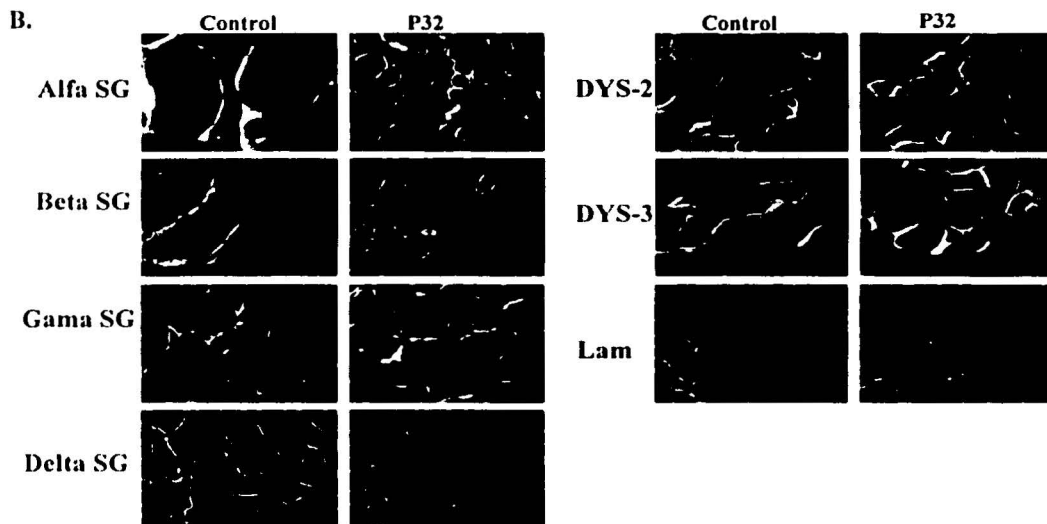
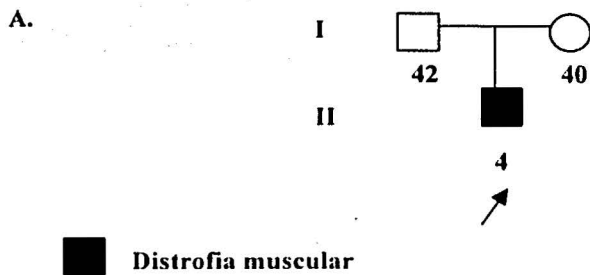


Figura 38. A. **Árbol genealógico del paciente 32.** Se trata de un paciente masculino de 4 años de edad, que se presenta como caso único en la familia. B. **Imagen de inmunofluorescencia del paciente 32.** Se observa tinción normal de las proteínas estudiadas. SG: sarcoglicano. DYS-2: distrofina extremo carboxilo. DYS-3: distrofina extremo amino. Lam: laminina.

## Anexo 2

### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Las distrofias musculares son enfermedades que se caracterizan por debilidad muscular que tiene carácter progresivo. En algunos pacientes tiene un curso clínico grave, en los que la capacidad de caminar se pierde alrededor de los 10 años. Existen muchos tipos identificados, por lo que con frecuencia es difícil definir un diagnóstico con certeza tomando en cuenta únicamente las manifestaciones clínicas.

Desde el punto de vista del material de la herencia estas enfermedades pueden ser heterogéneas. El estudio inmunohistoquímico en biopsia de músculo permite identificar con mayor precisión el tipo de enfermedad que afecta al paciente y relacionar con una forma de herencia específica. Estos datos a su vez serán la base para proporcionar información sobre la naturaleza genética de la entidad e informar sobre riesgos de que un futuro hijo presente el mismo padecimiento.

Me han sido explicados claramente los objetivos del estudio, los cuales no representan ningún riesgo para la salud de mi hijo (a), ni de ninguno de los miembros de mi familia, por lo cual estoy dispuesto a autorizar la realización de la biopsia muscular, aceptando formar parte del proyecto de investigación: "Estudio inmunohistoquímico de las proteínas del complejo distrofina glicoproteína en pacientes con distrofias musculares"; la información de los resultados obtenidos se hará a través del personal médico del servicio de la consulta externa de Genética Médica.

Estoy consciente que la participación en el estudio es completamente voluntaria, pudiendo elegir en cualquier momento del mismo abandonarlo, sin que ello sea motivo de estar sujetos a represalias en cuanto a la atención médica que mi hijo (a), o el resto de mi familia requiera.

NOMBRE DEL PACIENTE: \_\_\_\_\_

NOMBRE DE LA MADRE: \_\_\_\_\_

NOMBRE DEL PADRE: \_\_\_\_\_

---

FIRMA DE LA PERSONA LEGALMENTE RESPONSABLE DEL PACIENTE

Anexo 3

**HOJA DE CAPTACIÓN DE DATOS**

Nombre: \_\_\_\_\_

No de cédula: \_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_

Domicilio: \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_

Edad de la madre: \_\_\_\_\_ Edad del padre: \_\_\_\_\_

Consanguinidad: \_\_\_\_\_ Endogamia: \_\_\_\_\_

Otros familiares afectados: \_\_\_\_\_

Edad de inicio de los primeros signos: \_\_\_\_\_

Afección inicial: cintura pélvica \_\_\_\_\_ cintura escapular \_\_\_\_\_

Tiempo de extensión de signos: \_\_\_\_\_

Con afección a: \_\_\_\_\_

Valoración cardiológica: \_\_\_\_\_

A la fecha de estudio: marcha independiente \_\_\_\_\_ uso de silla de ruedas \_\_\_\_\_

Inicio y evolución similar a DMD: \_\_\_\_\_

Enzimas: \_\_\_\_\_

Datos de EMG: \_\_\_\_\_

Datos de biopsia muscular: \_\_\_\_\_

Estudio inmunohistoquímico: \_\_\_\_\_

## 10. BIBLIOGRAFIA

1. Andrew A, Groh M, Mc Nally E. Sarcoglycans in Muscular Dystrophy. *Microscopy and Technique* 2000; 48: 167-180.
2. Barresi R., Moore S., Stolle C., Mendell J., Campbell KP. Expression of  $\gamma$  Sarcoglycan in Smooth Muscle and Its Interaction with the Smooth Muscle Sarcoglycan Sarcospan Complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000; 275(49): 38554-38560.
3. Barrón-Urbe C. y Pérez-Pasten E., en *Introducción a la Pediatría de Games-Eternod y Palacios-Treviño*. Sexta Edición; 55-73, 2000.
4. Ben Hamida M, Ben Hamida Ch, Zouari M, Belal S, Hentati F. Limb Girdle Muscular Dystrophy 2C: Clinical Aspects. *Neuromuscular Disorders* 1996; 6(6): 493-494.
5. Bushby K. y Beckmann J. Diagnostic Criteria for the Limb Girdle Muscular Dystrophies: Report of the ENMC Workshop on Limb Girdle Muscular Dystrophies. *Neuromuscular Disorders*, 1995; (5): 71-74.
6. Bushby K. Towards the Classification of the Autosomal Recessive Limb Girdle Muscular Dystrophies. *Neuromuscular Disorders* 1996; 6(6): 439-441.
7. Bushby K. The Limb Girdle Muscular Dystrophies: Multiple Genes, Multiple Mechanisms. *Human Molecular Genetics*, 1999; 8(10): 1875-1882.
8. Calvo F, Teijeira S, Fernandez J, Teijeiro A, Fernández-Rojas R, Fernández Lopez X, Martín E, Navarro C. Evaluation of Heart Involvement in Gamma-Sarcoglycanopathy (LGMD 2C). A Study of Ten Patients. *Neuromuscular Disorders* 2000; 10: 560-566.
9. Campbell KP. Three Muscular Dystrophies: Loss of Cytoskeleton-Extracellular Matrix Linkage. *Cell*, 1995; 80: 675-679.
10. Canizales S. Estudio Molecular del Gen DMD y su Transcrito en Pacientes con Distrofia Muscular de Duchenne/Becker. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas, 1998.
11. Carnevale A. y Esmer M., en *Genética Clínica: Diagnóstico y Manejo de las Enfermedades Hereditarias de J. Jesús Guízar-Vázquez*. Tercera edición; 193-205, 2001.
12. Cohn R, Herrman R, Sorokin I, Wewer U, Voit T. Laminin  $\alpha 2$  Chain Deficient Congenital Muscular Dystrophy. *Neurology* 1998; 51: 94-101.
13. Coral-Vázquez R, Cohn R, Moore S, Hill J, Weiss R, Davison R, Straub V, Barresi R, Bansal D, Hrstka R, Williamson R, Campbell K. Disruption of the Sarcoglycan-Sarcospan Complex in Vascular Smooth Muscle: A Novel Mechanism for Cardiomyopathy and Muscular Dystrophy. *Cell* 1999; 98: 465-474.
14. Coral-Vázquez R, Navarrete C, Mendoza I, Barraza A. Avances en distrofias musculares. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 2000; 38(2): 155-164.
15. Cox F, Kunkel L. Dystrophies and Heart Disease. *Current Opinion in Cardiology* 1997; 12: 329-343.
16. Crosbie R., Heighway J., Venzke D., Lee J., Campbell K. Sarcospan, the 25-kDa Transmembrane Component of the Dystrophin-Glycoprotein Complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997; 272(50): 31221-31224.

17. Duclos F., Straub., Moore S., Venzke D., Hrsta R., Crosbie R., Durbeej M., Lebakken C., Ettinger E., van der Meulen J., Holt K., Campbell K. Progressive Muscular Dystrophy in  $\alpha$ -Sarcoglycan Deficient Mice. *Journal of Cell Biology*, 1998; 142: 1461-1471.
18. 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: 315-319.
19. Guízar-Vázquez J y Cortés R, en *Genética Clínica: Diagnóstico y Manejo de las Enfermedades Hereditarias de J. Jesús Guízar-Vázquez*. Tercera edición; 207-223, 2001.
20. Hoffman EP, Kunkel LM. Dystrophin anomalies in Duchenne/Becker Muscular Dystrophies. *Neuron*, 1989; 2: 1019-1029.
21. <http://www.dmd.nl/dap.html>. Muscular Dystrophy Pages.
22. Jackson C. y Strehler D. Limb Girdle Muscular Dystrophy: Clinical Manifestations and Detection of Preclinical Disease. *Pediatric* 1968; 41(2): 495-502.
23. Lasa A, Piccolo F, Carles de Diego, JeanPierre M, Colomer J, Rodríguez M, Urtizbera J, Baiget M, Kaplan J, Gallano P. Severe Limb Girdle Muscular Dystrophy in Spanish Gypsies: Further evidence for a founder Mutation in the  $\gamma$  Sarcoglycan Gene. *European Journal of Human Genetics* 1998; 6: 396-399.
24. Lim L. y Campbell K. The Sarcoglycan Complex in Limb Girdle Muscular Dystrophy. *Current Opinion in Neurology* 1998; 11: 443-452.
25. Matsumura K. y Campbell K. Dystrophin-Glycoprotein Complex: its role in the Molecular Patogenesis of Muscular dystrophies. *Muscle and Nerve*, 1994; 17: 2-15.
26. Mahjneh I, Bushby K, Anderson L, Muntoni F, Tolvanen-Mahjneh H, Bashir R, Pizzi A, Brockington M, Marconi G. Merosin-Positive Congenital Muscular Dystrophy: A Large Inbred Family. *Neuropediatrics* 1999; 30: 22-28.
27. Melacini P, Fanin M, Duggan D, Freda M, Berardinelli A, Danieli G, Barchitta A, Hoffman E, Dalla-Volta S, Angelini C. Heart Involvement in Muscular Dystrophies Due to Sarcoglycan Gene Mutations. *Muscle and Nerve* 1999; 22: 473-479.
28. Naom I, D'Alessandro, Sewry C, Jardine P, Ferlini A, Moss T, Dubowitz V, Muntoni F. Mutations in the Laminin  $\alpha$ 2 Chain Gene in Two Children with Early Onset Muscular Dystrophy. *Brain* 2000; 123: 31-41.
29. Navarrete C. y Coral-Vázquez R., en *Atlas Diagnóstico de Síndromes Genéticos de Guízar-Vázquez y Zafra de la Rosa*. Primera edición; 276-281. 1999.
30. Nigro V, Moreira E, Piluso G, Vainzof M, Belsito A, Politano L, Puca A, Passos-Bueno M, Zatz M. Autosomal Recessive Limb Girdle Muscular Dystrophy, LGMD2F, is Caused by a Mutation in the  $\delta$ -Sarcoglycan Gene. *Nature Genetics* 1996; 14: 195-198.
31. Noguchi S, Wakabayashi E, Imamura M, Yoshida M, Ozawa E. Formation of Sarcoglycan Complex with Differentiation in Cultured Myocytes. *European Journal of Biochemistry*, 2000; 267: 640-648.
32. Nowak K, Walsh P, Jacob R, Johnsen R, Peverall J, McNally E, Wilton S, Kakulas B, Laing N. Severe  $\gamma$ -Sarcoglycanopathy Caused by a Novel Missense Mutation and a Large Deletion. *Neuromuscular Disorders* 2000; 10: 100-107.

33. Ozawa E, Noguchi S, Mizuno Y, Hagiwara Y, Yoshida M. From Dystrophinopathy to Sarcoglycanopathy: Evolution of a Concept of Muscular Dystrophy. *Muscle and Nerve* 1998; 421-438.
34. Parano E, Pavone L, Fiumara A, Falsaperla R, Trifiletti R, Dobyns W. Congenital Muscular Dystrophies: Clinical Review and Proposed Classification. *Pediatric Neurology*, 1995; 13: 97-103.
35. Pogue R, Anderson L, Pyle A, Sewry C, Pollitt C, Johnson M, Davison K, Moss J, Mercuri E, Muntoni F, Bushby K. Strategy for Mutation Analysis in the Autosomal Recessive Limb Girdle Muscular Dystrophies. *Neuromuscular Disorders* 2001; 11: 80-87.
36. Sewry CA. Immunocytochemical Analysis of Human Muscular Dystrophy. *Microscopy Research and Technique* 2000; 48: 142-154.
37. Straub V., Ettinger A., Durbeej M., Venzke D., Cutshall S., Sanes J., Campbell K. Epsilon Sarcoglycan replaces  $\alpha$  Sarcoglycan in Smooth Muscle to Form a Unique Dystrophin Glycoprotein Complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999; 274(39):27989-27996.
38. Vainzof M, Passos-Bueno M, Canovas M, Moreira E, Pavanello R, Marie S, Anderson L, Bonnemann C, McNally E, Nigro V, Kunkel L, Zatz M. The Sarcoglycan Complex in the Six Autosomal Recessive Limb Girdle Muscular Dystrophies. *Human Molecular Genetics* 1996; 12: 1963-1969.
39. Vainzof M, Moreira E, Ferraz G, Passos-Bueno M, Marie S, Zatz M. Further Evidence for the Organisation of the Four Sarcoglycan Proteins within the Dystrophin Glycoprotein Complex. *European Journal of Human Genetics* 1999; 7: 251-254.
40. van der Kooij AJ, Visser M, Barth PG. Limb Girdle Muscular Dystrophy: Review of the Literature. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 1994; 96: 209-218.
41. van der Kooij AJ, Barth P, Busch H, de Haan R, Ginjaar H, van Essen A, van Hoof, Höweler C, Jennekens F, Jongen P, Oosterhuis H, Padberg G, Spaans F, Wintzen A, Wokkle J, Bakker E, van Ommen G, Bolhuis P, de Visser M. The Clinical Spectrum of Limb Girdle Muscular Dystrophy: a Survey in the Netherlands. *Brain* 1996; 119: 1471-1480.
42. Vorgerd M, Gencik M, Mortier J, Epplen J, Malin J, Mortier W. Isolated Loss of  $\gamma$ -Sarcoglycan: Diagnostic Implications in Autosomal Recessive Limb Girdle Muscular Dystrophies. *Muscle and Nerve* 2001; 24: 421-424.
43. Xu H, Christmas P, Wu X, Wewer U, Engvall E. Defective Muscle Basement and Lack of M-Laminin in the Dystrophic dy/dy Mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994; 91: 5572-5576.
44. Zatz M, Vainzof M, Passos-Bueno MR. Limb Girdle Muscular Dystrophy: One Gene with Different Phenotypes, One Phenotype with Different Genes. *Current Opinion in Neurology* 2000; 13: 511-517.
45. Zimprich A., Grabowski M., Asmus F., Naumann M., Berg D., Bertram M., Scheidtmann K., Kern P., Winkelmann J., Müller-Myhsok B., Riedel L., Castro M., Mitinger T., Strom T., Gasser T. Mutations in the Gene Encoding  $\epsilon$ -Sarcoglycan cause Mioclonus-Dystonia Syndrome. *Nature Genetics*, 2001; 29(1): 66-69.