

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

Estudio por inmunofluorescencia del complejo de
glicoproteínas unidas a distrofina (DGC) en biopsias
musculares de pacientes con distrofia muscular y análisis
molecular de una familia con una mutación en merosina.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA EXPERIMENTAL
P R E S E N T A ,
BIOL: PEDRO AGUSTÍN MEZA ESPINOSA

DIRECTOR DE TESIS: DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VAZQUEZ

MÉXICO, D. F.

SEPTIEMBRE DEL 2005

COORDINACIÓN

m347335



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Pedro Agustín Meza Espinosa

FECHA: 30-08-05

FIRMA: [Firma]

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 6 de junio del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) Meza Espinosa Pedro Agustín con número de cuenta 92577657 con la tesis titulada: "Estudio por inmunofluorescencia del complejo de glicoproteínas unidas a distrofina (DGC) en biopsias musculares de pacientes con distrofia muscular y análisis molecular de una familia con una mutación en merosin", bajo la dirección del(a) Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez

Presidente:	Dr. Fabio Abdel Salamanca Gómez
Vocal:	Dr. Miguel Ángel Jorge Guevara Fonseca
Secretario:	Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez
Suplente:	Dra. María Elisa Alonso Vilatela
Suplente:	Dra. Haydée Rosas Vargas

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 2 de agosto del 2005

[Firma]
Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Reconocimientos

Al apoyo recibido por el CONACYT, para que se llevara a cabo esta tesis que pertenece a un proyecto mayor titulado “Estudio clínico molecular de las distrofias musculares de cintura ocasionadas por mutaciones en los sarcoglicanos” 2001-2003 con número de referencia 34603M

Al Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez por permitirme participar en el proyecto, así como por la dirección de la misma, por su amistad y también quiero expresar la gran admiración que siento por el.

A la Dra. Haydee Rosas Vargas por el apoyo que me brindó durante la estancia en el laboratorio, por la capacidad de perfección en el trabajo que irradia a sus alumnos y por los conocimientos que me transmitió.

Al Dr. Fabio Abdel Salamanca Gómez por la beca del SNI que me brindó por un año, que sin duda me fue de gran ayuda, por los valiosos comentarios al ser parte del comité tutorial y por la revisión de la tesis.

Al Dr. Miguel Ángel Jorge Guevara Fonseca por sus comentarios para mejorar el trabajo final de la tesis.

A la Dra. María Elisa Alonso Vilatela por los pacientes que en colaboración se diagnosticaron y por las observaciones finales a esta tesis.

A todos ellos muchas gracias.

Dedicada:

A Karla mi esposa que estuvo siempre presente durante el desarrollo de esta tesis y que sin su participación no estaría concluida. Me siento afortunado de tenerla ya que he aprendido de ella la paciencia, el darlo todo por la persona amada sin esperar algo a cambio y quiero decirle que sin lugar a dudas es el amor de mi vida.

Agradecimientos:

A mi hija Sofía por darme fuerza.

A mi madre por apoyarme y amarme como yo la amo.

A mis hermanos Eduardo y Marco Antonio que siempre me impulsaron, creyeron y me dejaron decidir.

A! Dr. Ramón Coral por darme la oportunidad e integrarme al proyecto como alumno.

A la Dra. Haydee Rosas por la constante ayuda para la realización del proyecto.

A Javier Estrada y Adrián Flores por la amistad que tenemos y la ayuda que me brindaron siempre.

A mis compañeros de laboratorio, Israel, Norman, Adriana, Ana, Benjamín, por su compañía.

A la bióloga Francisca Fernández del laboratorio de patología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) por su amistad, colaboración y ayuda.

Al técnico de laboratorio Alfredo de Patología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Por el apoyo que me brindó.

A los trabajadores del área de genética del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI Ana Claudia, Areli y Victoria por todos los días de trabajo juntos.

Al Dr. Ramón jefe del laboratorio de patología, por el préstamo del criostato, igualmente a los neurólogos García Ramírez R. Ramírez Navarrete E. por su colaboración en este trabajo. Así como a los médicos cirujanos Piña Mora E. y Ribera Games E. por las biopsias que se utilizaron en el proyecto. Todos excelentes médicos y personas que laboran en Hospital de Pediatría del CMNS XXI

Al Dr. Luis Ruano Calderón por las biopsias de músculo extraídas en el INNN y sus diagnósticos Clínicos.

A todos muchas gracias.

Índice	Página
Resumen	1
Introducción	2
Generalidades	2
Distrofinopatías	6
Sarcoglicanopatías	7
Distrofia muscular congénita causada por laminina α -2	10
Variación intrafamiliar e interfamiliar.....	12
Incidencia.....	13
Justificación.....	13
Hipótesis.....	14
Objetivo general.....	14
Objetivos particulares.....	15
Estrategia experimental.....	15
Criterios de inclusión de pacientes.....	15
Biopsias musculares.....	16
Inmunofluorescencia.....	16
Anticuerpos	17
Extracción de DNA	17
Análisis Molecular de LAMA-2	18
Secuenciación Radioactiva.	18
Resultados	20
Pacientes con ausencia de distrofina	21
Pacientes con deficiencia de distrofina	36
Pacientes con deficiencia de sarcoglicanos	51

Pacientes en los que no se encontró deficiencia de las proteínas estudiadas.....	59
Pacientes sin fibras musculares	97
Paciente con ausencia de la proteína merosina.....	99
Análisis de inmunofluorescencia del paciente	101
Discusión	105
Conclusiones	115
Bibliografía.....	116
Anexo.....	Publicación

Figura 1. Organización celular de proteínas involucradas en las diferentes distrofias musculares.....	5
Figura 2. Sistema de anclaje constituido por el complejo Laminina-Integrina.....	12
Figura 3. Inmunofluorescencia del paciente 1.....	23
Figura 4. Inmunofluorescencia del paciente 2.....	24
Figura 5. Inmunofluorescencia del paciente 3.....	25
Figura 6. Inmunofluorescencia del paciente 4.....	26
Figura 7. Inmunofluorescencia del paciente 5.....	27
Figura 8. Inmunofluorescencia del paciente 6.....	28
Figura 9. Inmunofluorescencia del paciente 7.....	29
Figura 10. Inmunofluorescencia del paciente 8.....	30
Figura 11. Inmunofluorescencia del paciente 9.....	31
Figura 12. Inmunofluorescencia del paciente 10.....	32
Figura 13. Inmunofluorescencia del paciente 11.....	33
Figura 14. Inmunofluorescencia del paciente 12.....	34
Figura 15. Inmunofluorescencia del paciente 13.....	35
Figura 16. Inmunofluorescencia del paciente 14.....	39
Figura 17. Inmunofluorescencia del paciente 15.....	40
Figura 18. Inmunofluorescencia del paciente 16.....	41
Figura 19. Inmunofluorescencia del paciente 17.....	42
Figura 20. Inmunofluorescencia del paciente 18.....	43
Figura 21. Inmunofluorescencia del paciente 19.....	44
Figura 22. Inmunofluorescencia del paciente 20.....	45
Figura 23. Inmunofluorescencia del paciente 21.....	46
Figura 24. Inmunofluorescencia del paciente 22.....	47
Figura 25. Inmunofluorescencia del paciente 23.....	48
Figura 26. Inmunofluorescencia del paciente 24.....	49
Figura 27. Inmunofluorescencia del paciente 25.....	50
Figura 28. Inmunofluorescencia del paciente 26.....	53
Figura 29. Inmunofluorescencia del paciente 27.....	54
Figura 30. Inmunofluorescencia del paciente 28.....	55
Figura 31. Inmunofluorescencia del paciente 29.....	56
Figura 32. Inmunofluorescencia del paciente 30.....	57
Figura 33. Inmunofluorescencia del paciente 31.....	58
Figura 34. Inmunofluorescencia del paciente 32.....	61
Figura 35. Inmunofluorescencia del paciente 33.....	62
Figura 36. Inmunofluorescencia del paciente 34.....	63
Figura 37. Inmunofluorescencia del paciente 35.....	64
Figura 38. Inmunofluorescencia del paciente 36.....	65
Figura 39. Inmunofluorescencia del paciente 37.....	66
Figura 40. Inmunofluorescencia del paciente 38.....	67
Figura 41. Inmunofluorescencia del paciente 39.....	68

Figura 42. Inmunofluorescencia del paciente 40.....	69
Figura 43. Inmunofluorescencia del paciente 41.....	70
Figura 44. Inmunofluorescencia del paciente 42.....	71
Figura 45. Inmunofluorescencia del paciente 43.....	72
Figura 46. Inmunofluorescencia del paciente 44.....	73
Figura 47. Inmunofluorescencia del paciente 45.....	74
Figura 48. Inmunofluorescencia del paciente 46.....	75
Figura 49. Inmunofluorescencia del paciente 47.....	76
Figura 50. Inmunofluorescencia del paciente 48.....	77
Figura 51. Inmunofluorescencia del paciente 49.....	78
Figura 52. Inmunofluorescencia del paciente 50.....	79
Figura 53. Inmunofluorescencia del paciente 51.....	80
Figura 54. Inmunofluorescencia del paciente 52.....	81
Figura 55. Inmunofluorescencia del paciente 53.....	82
Figura 56. Inmunofluorescencia del paciente 54.....	83
Figura 57. Inmunofluorescencia del paciente 55.....	84
Figura 58. Inmunofluorescencia del paciente 56.....	85
Figura 59. Inmunofluorescencia del paciente 57.....	86
Figura 60. Inmunofluorescencia del paciente 58.....	87
Figura 61. Inmunofluorescencia del paciente 59.....	88
Figura 62. Inmunofluorescencia del paciente 60.....	89
Figura 63. Inmunofluorescencia del paciente 61.....	90
Figura 64. Inmunofluorescencia del paciente 62.....	91
Figura 65. Inmunofluorescencia del paciente 63.....	92
Figura 66. Inmunofluorescencia del paciente 64.....	93
Figura 67. Inmunofluorescencia del paciente 65.....	94
Figura 68. Inmunofluorescencia del paciente 66.....	95
Figura 69. Inmunofluorescencia del paciente 67.....	96
Figura 70. Paciente sin fibras musculares.....	98
Figura 71. Árbol genealógico de la paciente 74.....	99
Figura 72. Imágenes de resonancia magnética de hemisferios cerebrales de la paciente 74.....	100
Figura 73. Imágenes de inmunofluorescencia del paciente 74.....	101
Figura 74. Electroferogramas de secuencia nucleotídica del exón 54 del gene <i>LAMA 2</i>	102
Figura 75. Secuenciación automatizada y manual del exon 54 del gene <i>LAMA 2</i>	103
Figura 76. Árbol genealógico de la familia del paciente 74 con Portadores de la mutación.....	104

Índice de tablas	Página
Tabla 1. Clasificación genética de las distrofias musculares.....	4
Tabla 2. Total de pacientes estudiados.....	20
Tabla 3. Pacientes con ausencia de la proteína distrofina.....	21
Tabla 4. Pacientes sin distrofina y deficientes en sarcoglicanos.....	22
Tabla 5. Características clínicas de pacientes con deficiencia en la proteína distrofina.....	36
Tabla 6. Expresión del extremo amino y carboxilo en pacientes deficientes de la proteína distrofina.....	37
Tabla 7. Pacientes con deficiencia de la proteína distrofina y deficientes en las proteínas sarcoglicanos.....	38
Tabla 8. Pacientes deficientes en las proteínas sarcoglicanos.....	51
Tabla 9. Expresión de los sarcoglicanos en pacientes deficientes en estas proteínas.....	52
Tabla 10. Pacientes con presencia de todas las proteínas estudiadas.....	59
Tabla 11. Pacientes sin fibras musculares.....	97

RESUMEN

Las distrofias musculares son un grupo de enfermedades hereditarias caracterizadas por debilidad y atrofia muscular progresiva, que se pueden iniciar desde el nacimiento o hasta la edad adulta, causadas por alteraciones en 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-Glicoproteínas (DGC).

Inicialmente, 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. Debido a que el fenotipo de los pacientes con distrofia muscular puede ser muy similar y en ocasiones se sobreponen entre sí, el diagnóstico clínico representa un problema serio. Sin embargo, el empleo de técnicas bioquímicas y de biología molecular ha permitido identificar varios genes y proteínas que integran el DGC y que están relacionados con las distrofias musculares, abriendo la posibilidad de un diagnóstico más certero en pacientes con este tipo de patologías.

En el presente trabajo se analizó el patrón de expresión mediante inmunofluorescencia indirecta de las proteínas distrofina, laminina y sarcoglicanos- α , - β , - γ y - δ de 74 pacientes con diagnóstico sugerente de distrofia muscular, de los cuales 13 pacientes resultaron con ausencia de la proteína distrofina, 12 con deficiencia de la proteína distrofina, 6 con disminución de las proteínas sarcoglicanos, 6 sin fibras musculares debido al proceso avanzado de la enfermedad y 36 pacientes con presencia de todas las proteínas estudiadas. Además se detectó una paciente con ausencia de la proteína laminina y se logró identificar una nueva mutación en este gen, misma que se detectó en varios miembros de la familia afectada.

ABSTRACT

Muscular dystrophies are a group of hereditary diseases characterized by weakness and progressive muscular atrophy, which can be initiated from the birth or to the adult age, caused by alterations in the muscular membrane during the contraction process, as it happens in the muscular dystrophies that take place by mutations in the genes that codify the components of Dystrophin-Glycoproteins Complex (DGC).

Initially, the diagnosis of the muscular dystrophies was done taking into account the group of involved muscles, the gravity, the model of inheritance and progression of the disease. Because the phenotype of the patients with muscular dystrophy can be very similar and sometimes overlap with each other, the clinical diagnosis represents a serious problem. Nevertheless, the use of biochemical techniques and molecular biology has allowed to identify several genes and proteins that integrate the DGC and that are related to muscular dystrophies, opening the possibility of a more accurate diagnosis in patients with this type of pathologies.

In the present work the pattern of expression of the proteins dystrophin, laminin and sarcoglycans-a, b-, g- and -d were analyzed by indirect immunofluorescence in 74 patients with suggestive diagnosis of muscular dystrophy, from which 13 patients were deficient of dystrophin, 12 with deficiency of the distrofina protein, 6 with diminution of the sarcoglycans, 6 without muscular fibers due to the advanced process of the disease, and 36 patients with presence of all the studied proteins. In addition, a patient with absence of the laminin protein was detected and it was possible to identify a new mutation in the laminin gene, same that was detected in several members of the affected family.

INTRODUCCIÓN

Generalidades:

El termino distrofia muscular se refiere a un grupo diverso de enfermedades, caracterizadas por debilidad y atrofia muscular progresiva, en las cuales el defecto primario es observado en el músculo esquelético con una evidente regeneración de fibras, con núcleos centrales, necrosis muscular y reemplazo de músculo por tejido conectivo y adiposo. Las distrofias musculares se han clasificado de diferentes formas; de acuerdo con el tipo de músculos involucrados, edad de inicio, progresión de la enfermedad y modelo de herencia. Sin embargo, debido a la marcada diversidad genotípica y fenotípica, esta clasificación tiene deficiencias. A la fecha asciende a más de treinta el número de genes involucrados o responsables de las diferentes distrofias musculares (Tabla 1). La identificación de estos genes ha llevado a cambios profundos en la clasificación de distrofias musculares, con un nuevo enfoque en la genética molecular (Cohn et al., 2000).

Con la identificación de la distrofina y la subsecuente caracterización del complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina (DGC por sus siglas en ingles Dystrophin-Glycoprotein Complex, fig 1), se ha dado el primer paso para la comprensión de la patogénesis molecular de las distintas distrofias musculares. El DGC es un conjunto de proteínas que conectan la matriz extracelular con el citoesqueleto, cuya separación causada por mutaciones en la distrofina o en el subcomplejo de sarcoglicanos, causan inestabilidad en la membrana muscular (sarcolema) durante el proceso de contracción. Por otro lado, existen evidencias que sugieren que alteraciones en el DGC, podrían causar errores en la transducción de

señales celulares, y expresarse clínicamente como una distrofia muscular (Coral et al., 1999).

El DGC se puede dividir en tres subcomplejos de acuerdo a sus características bioquímicas (Campbell, 1995). El componente citoplasmático consiste en un grupo de proteínas periféricas a la membrana intracelular: la distrofina con peso molecular de 427 KDa, las sintrofina α , $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$ y $\gamma 2$ todas ellas con un peso molecular de 60 KDa y la α -distrobrevina con un peso molecular de 80KDa. Tanto las sintrofina como las distrobrevinas se asocian al extremo carboxilo terminal de la distrofina o su homólogo autosómico, la utrofina. El segundo subcomplejo en el DGC es el complejo distroglicano, el cual está compuesto de dos proteínas muy relacionadas; el distroglicano α con un peso molecular de 156 KDa, y el distroglicano β con un peso de 43 KDa. El distroglicano α se une a laminina en la matriz extracelular; mientras que el distroglicano β , una proteína transmembranal, se une a la distrofina/utrofina en la cara intracelular de la membrana citoplasmática. El tercer complejo consiste de un grupo de proteínas transmembranales llamadas sarcoglicanos (SG) α -, β -, γ -, δ , ϵ y ζ con pesos moleculares de 50, 43, 35, 35 50 y 40 KDa respectivamente (Etinger et al., 1997; Straub et al., 1999; Wheeler et al., 2002) , y una proteína llamada sarcospan con un peso molecular de 25 KDa (Crosbie et al., 1997). Estas proteínas en su conjunto conforman un subcomplejo denominado sarcoglicano-sarcospan (SG-SSPN).

Tabla 1

Distrofias moleculares y clasificación genética

Enfermedad	Modo de herencia	Locus	Producto del Gene
<u>Distrofias musculares ligadas a X</u>			
Duchenne/Becker	XR	Xp21	Distrofina
Emery-Dreifuss	XR	Xq28	Emerina
<u>Distrofias musculares de cintura</u>			
<u>Autosómicas dominantes</u>			
LGMD 1 A	AD	5q22-q34	
LGMD 1 B	AD	1q1-21	Lamina A/C
LGMD 1 C	AD	3p25	Caveolina-3
LGMD 1 D	AD	6q22	?
LGMD 1 E	AD	7q	?
<u>Autosómicas recesivas</u>			
LGMD 2 A	AR	15q15	Calpaina-3
LGMD 2 B	AR	2p13	Disferlina
LGMD 2 C	AR	13q12	γ-Sarcoglicano
LGMD 2 D	AR	17q12-q21	α-Sarcoglicano
LGMD 2 E	AR	4q12	β-Sarcoglicano
LGMD 2 F	AR	5q33-q34	δ-Sarcoglicano
LGMD 2 G	AR	17q11-q12	Teletonina (TCAP)
LGMD 2 H	AR	9q3-q34	RIM 32
LGMD 2 I	AR	19q13.4	FKRP
LGMD 2 J	AR	2q31	Titina
<u>Distrofia muscular distal</u>			
Miopatía Miyoshi	AR	2p13	Disferlina
Distrofia Tibial muscular	AD	2q31	Titina
<u>Distrofia muscular congénita</u>			
Clásica o pura CMD	AR	6q22	Laminina α-2
Fukuyama CMD	AR	9q31-33	Fukutina
Miopatía congénita integrina α7	AR	12q13	Integrina α7
Espina rígida CMD	AR	1p35-36	Selenoproteína N
Enfermedad músculo-ojo-cerebro	AR	1p32-p34	POMTGnt1
<u>Otras formas de distrofia muscular</u>			
Miopatía Bethlem	AD	21q22	Colagena VI α 1
	AD	21q22	Colagena VI α 2
	AD	2q37	Colagena VI α 3
Epidermis bulosa y MD	AR	8q24-qter	Plectina
Distrofia muscular oculofaríngea	AD	14q11.2-q13	Proteína unida a poli A
Distrofia muscular iacioescapulohumeral	AD	4q35	?
Distrofia miotónica tipo I	AD	19q13	Proteinasa Miotónica
Síndrome Walter-Warburg	AR	9q34	POMT1
Emery-Dreifuss	AD	1q11	Lamina A/C
Distrofia miotónica tipo II	AD	3q21	?

AD, autosómica dominante; AR, autosómica recesiva; LGMD (del inglés *limb-girdle muscular dystrophy*) Distrofias musculares de cintura; XR, recesiva unida al cromosoma X. (Cohn et al., 2000; Matheus D.K., 2003; Torricelli E.R. 2004).

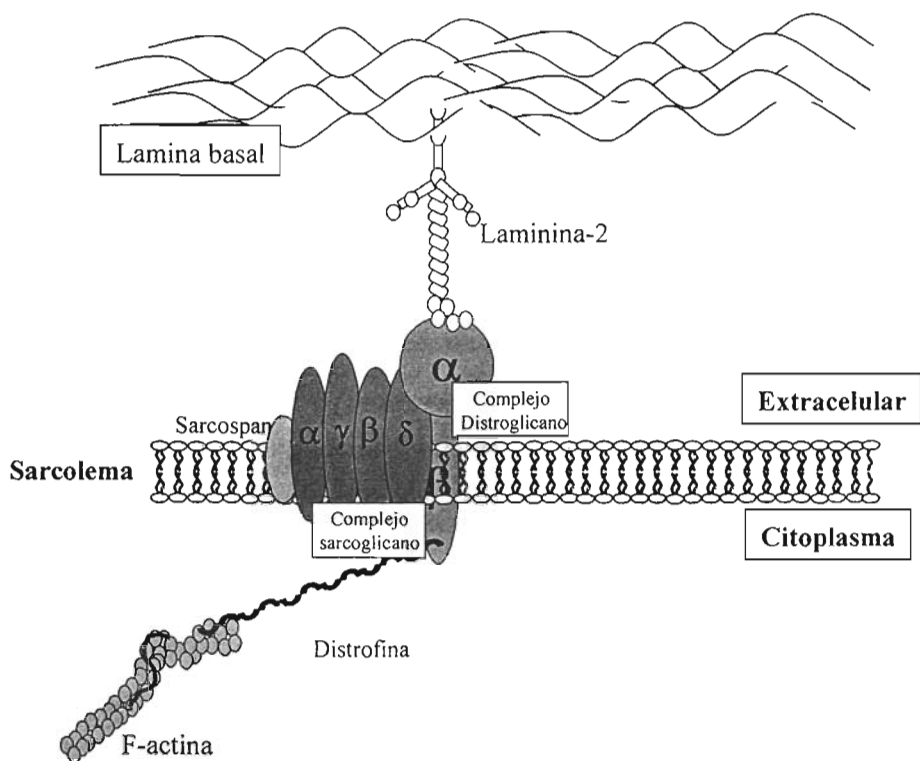


Figura1. Organización celular de proteínas involucradas en las distrofias musculares. Dentro del DGC de músculo estriado se identifican diversos subcomplejos, dentro de los que destacan el complejo distroglicano y el complejo sarcoglicano-sarcospan; La característica estructural y funcional más relevante del DGC es la formación de un puente entre la matriz extracelular y citoesqueleto mediante su asociación con laminina-2 y F-actina.

En México no se conoce la prevalencia de las distintas distrofias musculares en general, sin embargo, se estima que la DMD que tiene una incidencia similar en todo el mundo 1 de 2500 a 4000 recién nacidos masculinos vivos. Por otro lado, los reportes de las sarcoglicanopatías en países europeos, árabes, asiáticos y del continente americano como

Estados Unidos y Brasil, no existen cifras de prevalencia, pero se cree que el 5% de los pacientes diagnosticados como DMD corresponden a distrofias musculares de cintura (Ozawa et al., 1998). En el caso de las distrofias musculares congénitas donde aproximadamente el 50% de los pacientes diagnosticados con distrofia muscular congénita muestran una deficiencia primaria de la proteína laminina α -2 (Tome, 1998; Voit, 1997).

Distrofias musculares

Distrofinopatías

Las distrofinopatías son enfermedades causadas por mutaciones en el gen de la distrofina y presenta dos formas principales: una grave denominada distrofia muscular de Duchenne (DMD), cuya incidencia es de 1 en 3500 varones nacidos vivos (Werneck and Bonilla, 1990; Engel et al., 1994); y la distrofia muscular de Becker (DMB), que representa una forma menos grave de la enfermedad con una incidencia menor de 1 en 18,500 varones nacidos vivos (Grimm, 1986). El gen de la distrofina se sitúa en el locus Xp21, ha sido clonado y secuenciado (Monaco et al., 1986; Bakker et al., 1987; Hoffman et al., 1987; Koenig et al., 1987 y 1988; Worton, 1995). Es el gene mas grande descrito hasta ahora, abarca 2,4 Mb (megabases) con 79 exones que codifican para un ARNm de 14kb (Koenig et al., 1987; Den Dunner et al., 1989; Tennyson et al., 1995). La distrofina tiene un peso molecular de 427 KDa (Hoffman et al., 1987) y es una proteína citoesquelética situada en la superficie interna de la membrana de fibras musculares (Fig 1) (Worton, 1995). La función fisiológica de la distrofina no esta clara, aunque es esencial para el mantenimiento de músculos normales durante el proceso de contracción relajación. En pacientes con DMD, la distrofina se encuentra ausente en cantidades inferiores al 3%, con respecto a niveles normales, mientras que en pacientes con DMB los niveles de distrofina representan 10 al

40% de los niveles normales de expresión, generalmente como una proteína truncada parcialmente funcional (Hoffman et al., 1988).

Existen evidencias clínicas de la asociación de las distrofias musculares con cardiomiopatías. Es frecuente observar pacientes con DMD/DMB que desarrollan cardiomiopatía dilatada, siendo más alto el riesgo en los individuos con la forma benigna de distrofia muscular (DMB), que comúnmente mueren por falla cardíaca (Cox y Kunkel, 1997). En situaciones especiales, mutaciones en el gen de la distrofina resultan en la inactivación del gen en el músculo cardíaco sin afección del músculo esquelético, dando lugar a una cardiomiopatía dilatada ligada al cromosoma X (Muntoni et al., 1993).

Sarcoglicanopatías

El encontrar que la distrofina interactúa con todo un grupo de proteínas, llevó a pensar a varios grupos de investigación que la deficiencia en algunos de los componentes del DGC podrían ser causa de distrofias musculares genéticamente distintas pero fenotípicamente similares a la DMD/DMB (Ervasti et al, 1990; Matsumura et al, 1999). Una serie de investigaciones enfocadas a demostrar la hipótesis anterior pusieron en evidencia que la deficiencia primaria en α , β , γ , o δ - sarcoglicano es la causa de distintas distrofias musculares, ahora denominadas sarcoglicanopatías (Angelini et al, 1999).

Actualmente, se ha demostrado que las distrofias musculares de cintura tipo 2D, 2E, 2C y 2F (LGMD2: por sus siglas en inglés limb girdle muscular dystrophy 2) son causadas por mutaciones en los genes de α , β , γ , δ sarcoglicanos respectivamente (Ozawa et al, 1995). La deficiencia primaria de cualquiera de estas proteínas en el músculo estriado de los pacientes, provocada por las mutaciones en cada una de ellas, ocasiona la reducción o pérdida secundaria de los otros sarcoglicanos (Mizuno et al, 1995) y de sarcospan (Duclos

et al, 1998; Coral-Vazquez et al, 1999) y desestabiliza la unión del complejo distroglicano al sarcolema (Tan et al, 1997). Esto último sugiere que el complejo SG-SSPN fija a esta proteína a la membrana muscular (Tan et al., 1997). Se postula que mutaciones en alguna de estas proteínas desestabilizan la conexión entre la matriz extracelular y el citoesqueleto, lo que induce inestabilidad del sarcolema y susceptibilidad de la fibra muscular a necrosis, principal evento en la distrofia muscular.

La estructura primaria de α y de ε -sarcoglicano indica que son proteínas transmembranales del tipo I, mientras que β , γ o δ -sarcoglicanos son proteínas transmembranales de tipo II. Todos los sarcoglicanos tienen un dominio extracelular largo, un pequeño dominio citoplasmático y un solo dominio transmembranal. Algunos datos sugieren que α , β , γ y ε -sarcoglicanos tienen sitios potenciales para fosforilación en el dominio citoplásmico y β , γ y α -sarcoglicanos tienen un grupo de cisteínas en la región del carboxilo terminal localizada extracelularmente, característica encontrada frecuentemente en moléculas receptoras (Matsumura et al, 1999). En el caso de α sarcoglicano, se ha demostrado que tiene una función de ecto-adenosin trifosfatasa (ATPasa) y que el incremento de adenosina trifosfato (ATP) extracelular podría contribuir a la sobrecarga de calcio y muerte de la fibra muscular (Betto et al, 1999). Estudios recientes, tanto *in vivo* como *in vitro*, para evaluar la función fisiológica del músculo esquelético de ratones deficientes en el γ -sarcoglicano, mostraron que el daño muscular y la debilidad mecánica no son necesarios para el desarrollo de alteraciones distroficas en el músculo esquelético (Hack et al, 1998). Por lo tanto, es posible que algunas vías de señalización participen de forma importante en la patogénesis de la distrofia muscular en ratones deficientes del γ -sarcoglicano.

En el caso de ϵ -sarcoglicano no se ha asociado a distrofia muscular pero pacientes con mutaciones en el gen padecen distonía mioclónica caracterizada por movimientos desordenados, con tortícolis y calambres, algunos de ellos muestran anormalidades psiquiátricas que incluyen ataques de pánico y desarrollan actitud obsesiva compulsiva (Zimprich et al, 2001). A la fecha, no se han detectado mutaciones en el gen humano de sarcospán. Aunado a lo anterior, los ratones diferentes en este gen mantienen la expresión de todos los sarcoglicanos y no desarrollan distrofia muscular (Lebakken et al., 2000).

En años recientes, se han publicado algunos casos de pacientes distróficos con mutaciones en β -, γ - y δ -sarcoglicano y cardiomiopatía (Moreira et al., 1988; 1999; Barresi et al., 2000). Los pacientes con alteraciones en α -sarcoglicano rara vez desarrollan cardiomiopatía leve (Melacini et al., 1999). En este contexto, es importante mencionar que la expresión de α -sarcoglicano está restringida al músculo esquelético y cardíaco (Roberds et al., 1994; Noguchi et al., 1995); En contraste, β - y δ -sarcoglicano se expresan en otros tejidos incluyendo células del músculo liso (Lim et al., 1995; Nigro et al., 1996). Así mismo, algunos estudios han mostrado que γ -sarcoglicano también se expresa en músculo liso vascular. Sin embargo, esta expresión es relativamente baja (Barresi et al, 2000). Por otro lado, Matheuws indica que la expresión y la localización de este sarcoglicano se limita al músculo esquelético al igual que alfa sarcoglicano (Matheuws et al., 2003). Adicionalmente, se han identificado mutaciones en el gen δ -sarcoglicano en pacientes con miocardiopatía dilatada familiar o esporádica en los que no se manifestó ningún tipo de distrofia (Tsubata et al, 2000).

El uso de modelos animales para distrofias musculares causadas por mutaciones en δ y β -sarcoglicano han puesto de manifiesto la importancia del complejo SG-SSPN en el músculo liso vascular. La pérdida del complejo en este tejido en ratones que carecen de δ y β -sarcoglicano respectivamente causa alteración en la función vascular de las arterias coronarias, con presencia de constricciones en la microvasculatura que inducen eventos isquémicos intermitentes (Coral-Vazquez et al, 1999, Durbeej et al, 2000). Esto a su vez inicia el desarrollo de miocardiopatía, que se ve favorecida por la inestabilidad de la membrana del miocardiocito debido a la deficiencia del complejo SG-SSPN (Coral et al, 1999). Contrariamente, los ratones deficientes en α -sarcoglicano no muestran este tipo de alteraciones cuando se realiza perfusión vascular (Coral.Vazquez et al, 1999; Duclos et al, 1998), lo cual concuerda con ausencia de este sarcoglicano en el músculo liso sano (Noguchi et al, 1995). Ratones deficientes en γ -sarcoglicano también desarrollan cardiomiopatía en asociación con la distrofia muscular (Hack et al, 1998). La explicación para este fenómeno podría derivar de la observación de que este sarcoglicano también se expresa en el músculo liso vascular (Barresi et al, 2000). Sin embargo, se ha encontrado que γ -sarcoglicano no esta presente en el complejo de músculo liso vascular (Matheuws et al., 2003).

Distrofia muscular congénita causada por Laminina α -2 (merosina).

Aproximadamente el 50% de los pacientes diagnosticados con distrofia muscular congénita (DMC) muestran una deficiencia primaria de laminina cadena α -2 (Tome et al., 1998; Voit, 1997), Sin embargo, estudios recientes muestran que una ausencia parcial del extremo amino terminal de laminina α -2 puede estar asociada con formas menos graves de distrofias

musculares, con un inicio tardío al compararse con la forma clásica de la distrofia muscular congénita (Allamand et al., 1997; Cohn et al., 1998; Tan et al., 1997). Un hallazgo interesante en pacientes con deficiencia de laminina α -2 es el cambio en la materia blanca del cerebro observado por imagen de resonancia magnética (Dubowitz, 1996; Dubowitz, 1995; Tan et al., 1997). El mecanismo responsable del desarrollo de estas alteraciones no se ha entendido completamente.

La proteína laminina α -2 junto con laminina β 1 y γ 1 forman laminina 2, la cual es la laminina específica para el basamento de las membranas de las fibras del músculo esquelético de adulto, células de Schwann y trofoblastos (Leivo et al., 1988). Esta laminina, junto con colágena IV, nidogéno y perlecan, forman el esqueleto estructural del sostén de las membranas. En músculo esquelético laminina α -2 interactúa con α -dystroglicano, un componente del DGC y con el complejo transmembranal integrina α 7 β 1. La ausencia primaria de laminina α -2 promueve cambios secundarios en la composición de proteínas en el sarcolema y la matriz extracelular, de esta forma se ha observado que existe una pérdida secundaria de α 7 integrina. En consecuencia, es probable que existan en la miofibras al menos dos sistemas de anclaje paralelos, pero independientes: el primero formado por el basamento laminina-DGC (Figura 1), y el segundo constituido por el sistema de anclaje laminina-2- integrina α 7 β 1 (Figura 2). Es posible que ambos sistemas confieran estabilidad físico mecánica y participen en funciones de señalización.

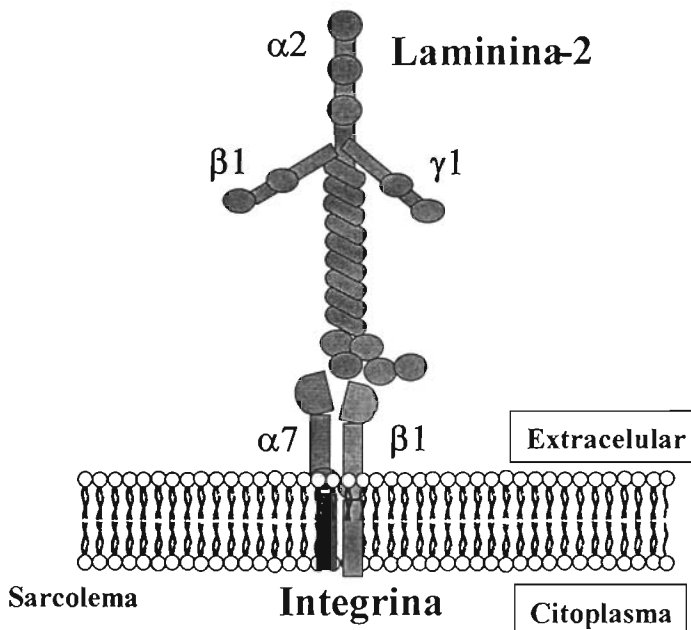


Figura 2. Sistema de anclaje constituido por el complejo laminina-integrina. Posiblemente este sistema confiera estabilidad físico mecánica y tenga funciones de señalización.

Variación intrafamiliar e interfamiliar.

Los distintos fenotipos observados en las diferentes distrofias musculares representan un serio problema para su clasificación y estudio. Esto se agrava cuando se descubre que una mutación específica resulta con diferente fenotipo dentro de una misma familia. Como un ejemplo claro de ello Bonne y cols. (2000) reportan una familia con una mutación en el gene de lamina A/C en la que algunos miembros desarrollan distrofia muscular mientras que otros han desarrollado únicamente cardiomiopatía. También han sido reportadas familias en las cual una misma mutación en disferlina resulta en distrofia muscular de cintura 2B y donde otros miembros de la misma familia desarrollan distrofia muscular distal tipo Miyoshi (Ueyama et al., 2001). En otros casos diferentes mutaciones en LMNA

pueden presentar no solo la distrofia muscular Emery-Dreifuss sino también cardiomiopatía dilatada con defectos en la conducción sin relación con la musculatura (Fatkin et al., 1999). La respuesta al fenómeno puede ser explicada por genes modificadores (Pennachio et al., 2001) que haya posiblemente retrotransposones que interactúan (Whitelaw et al 2001), por modificación de proteínas en el plegamiento o uniones diferentes entre ellas (Norwood et al., 2000) o en respuesta a los efectos de ciertos agentes infecciosos (Emery, 2002).

Incidencia

La DMD ha sido definida claramente en años recientes, la incidencia ha sido establecida sobre la base de unos 40 estudios incluyendo varios millones de varones vivos y esta es de 300×10^{-6} y en términos de población total de niños es de 60×10^{-6} (Emery, 1991). La incidencia para otras distrofias no ha sido establecida con certeza aunque clínica y genéticamente han sido definidas (Darin et al., 2000).

Justificación

Las distrofias musculares son un grupo de enfermedades genéticamente heterogéneas, poseen una variabilidad fenotípica amplia aun dentro de una misma familia y tiene una similitud de signos y síntomas, lo cual dificulta el diagnóstico clínico para identificarlas. Por otra parte, en los últimos diez años se ha incrementado a más de treinta el número de genes responsables de distintas distrofias. Lo anterior ha propiciado que se busquen alternativas para un mejor diagnóstico y una mayor comprensión de la fisiopatología de estas enfermedades. Una de las herramientas que se han estado utilizando con éste fin es la producción y utilización de anticuerpos dirigidos contra las distintas proteínas involucradas en distrofias musculares. Mediante el empleo de pruebas inmunohistoquímicas es posible identificar en primera instancia la proteína ausente o defectuosa. Este es un paso previo

muy importante para el análisis posterior del gen y la determinación de la mutación responsable de la enfermedad. Juntando todos estos datos es posible llegar a un diagnóstico más certero, y hacer la correlación de las observaciones clínicas del padecimiento con el defecto molecular. Con lo anterior se puede obtener la información que permita conocer más sobre los mecanismos moleculares de las distintas distrofias musculares.

En México se ha hecho poco con respecto al estudio de pacientes con distrofias musculares. El realizar estos estudios en nuestro país sentaría las bases para el análisis molecular de estas patologías, ya que permitiría conocer las mutaciones y el efecto de éstas en la expresión de las proteínas, así como la correlación entre el daño molecular y las características clínicas de la enfermedad en los distintos pacientes. Además, esta información resultaría de suma importancia para conocer más sobre la fisiopatología de las distrofias musculares y aportaría conocimientos nuevos en cuanto a su asociación con las cardiomiopatías.

Hipótesis.

En los pacientes diagnosticados clínicamente con distrofia muscular y con deficiencia o ausencia de alguno de las de los miembros del DGC existe una mutación a nivel de DNA.

Objetivo General

Analizar bioquímica y molecularmente la expresión de complejo distrofina-glicoproteínas en un grupo de pacientes diagnosticado clínicamente con distrofia muscular.

Objetivos particulares

- * Clasificar a un grupo de pacientes con distrofias musculares de acuerdo al patrón de herencia y las características clínicas de la enfermedad.
- * Creación de un banco de muestras, DNA y biopsias musculares, de aquellos individuos con distrofia muscular.
- * Análisis de las biopsias de músculo mediante pruebas, bioquímicas e inmunohistoquímicas para determinar la ausencia o reducción de las proteínas que se han asociado a distrofia muscular.

Estrategia Experimental:

Pacientes:

Los pacientes diagnosticados clínicamente con distrofia muscular, fueron captados en diferentes hospitales del sector salud; Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional siglo XXI-IMSS, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Dr. Manuel Velasco Suárez (INNyN), Hospital Infantil de México, Instituto Nacional de Pediatría (INP), Instituto Nacional de Ortopedia (INO), Hospital General de México y Centro Médico 20 de Noviembre del ISSSTE.

Criterios de inclusión de pacientes

- Cuadro clínico compatible con distrofia muscular.
- Músculos involucrados.
- Niveles elevados de CPK.

- Biopsias muscular de cuádriceps o deltoides que histológicamente presente variación en el tamaño de las fibras, necrosis y eventualmente reemplazo por grasa y tejido conectivo y en algunos casos núcleos centrales.
- Árbol genealógico que muestra una segregación sugestiva de herencia autosómica recesiva o antecedente de padres consanguíneos, herencia autosómica dominante o herencia ligada al cromosoma X, que constituyen los modelos de herencia conocidos en la distrofias musculares. Se incluyen también los casos aparentemente esporádicos o casos aislados.

Biopsias musculares

Se tomaron biopsias musculares del cuádriceps o deltoides, de tamaño mayor a 5 mm de diámetro y longitud. Las biopsias se montaron sobre corcho, donde la orientación de las fibras musculares serán orientadas perpendicularmente, para que los cortes fueran transversales. Las biopsias de músculo esquelético de los pacientes y los controles, se fijaron con medio de congelamiento Tissue Tek (JUNG), se sumergieron en isopentano (2-Metilbutano, SIGMA) enfriado con nitrógeno líquido.

Inmunofluorescencia

Los cortes de músculo esquelético de 4 a 7 μ de ancho se realizaron transversalmente en un criostato MICROM HM550. Se colocaron en portaobjetos previamente tratados con Poli L Lisina (SIGMA-ALDRICH). Se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 5% (SIGMA-Fraccion V), en Buffer de fosfato (PBS) al 10% por 1hr, se incubaron con diferentes anticuerpos primarios por 3 hr a temperatura ambiente o durante 12 hr a 4 °C. Se realizaron tres lavados posteriores con BSA al 1 % PBS al 10 %. El anticuerpo secundario

(CY-3 anti-raton y anti-cabra, Jackson ImmunoResearch) se incubó en los cortes de músculo esquelético por 1 hr, se lavaron nuevamente tres veces y finalmente se preservaron las muestras con Vectashield (Vector white DAPI) y finalmente se observaron en un microscopio de fluorescencia (Olympus BX60).

Anticuerpos

Se usaron anticuerpos monoclonales anti-raton acoplados al fluorocromo Cy3 α -Sarcoglicano (1:200) (NCL-a-SARC, Novocastra), β -Sarcoglicano (1:200) (NCL-b-SARC, Novocastra), γ -Sarcoglicano (1:200) (NCL-g-SARC, Novocastra), δ -Sarcoglicano (1:200) (NCL-d-SARC, Novocastra), Distrofina N-terminal (1:200) (NCL-DYS-3, Novocastra), Distrofina, C-terminal (1:200) (NCL-DYS2, Novocastra, y Laminina α -2 (1:1000) (NCL-MEROSIN, Novocastra. Las diluciones se llevaron a cabo en PBS/BSA al 1%.

Extracción de DNA

El DNA genómico fue extraído de linfocitos de sangre periférica por el siguiente método: Se centrifugaron 5 ml de sangre por 10 minutos a 2500 rpm, se recuperó los linfocitos y se lavaron con buffer de lisis de células rojas (RCLB) hasta que se observaron sólo linfocitos. Posteriormente se resuspendió la pastilla en 180 μ l de NaCl 5mM y 90 μ l de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% agitando vigorosamente. Se incubó a temperatura ambiente cinco minutos y posteriormente se agregaron 615.9 μ l de NaCl saturado, se incubó por 5 min a temperatura ambiente, nuevamente se centrifugó a 15 mil rpm por 15 min. Se recuperó el sobrenadante, y el DNA se precipitó y se homogenizó con dos volúmenes de etanol absoluto, para incubarse otros 5 min a temperatura ambiente, el DNA precipitado se lavó con etanol al 70%, tres veces a 15 Krpm durante 5 min, se removió el alcohol y se resuspendió la pastilla con 60 μ l agua destilada.

El DNA se cuantificó en un espectrofotómetro (Ultrospec 2000 Pharmacia-biotech) a una longitud de onda de 260nm y se verificó el grado de pureza con la relación de longitudes de onda 260/280 nm. La integridad se verificó en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio.

Análisis molecular de *LAMA2*

Una vez obtenido el DNA se amplificaron por PCR (Touchdown) (Don et al., 1991;Hecker and Roux 1996) los 64 exones del gen *LAMA2*. Cada amplificación fue hecha usando 100ng de DNA genómico en reacciones de 25 µl. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% y purificados por un sistema de extracción rápida a través de gel (Marligen Bioscience). Los productos fueron secuenciados usando el Big Dye (Applied Biosystems) y secuenciados automáticamente el equipo Applied Biosystems Automated Sequencer 3700 y usando primers para la secuenciación, (Guicheney et al., 1998)

Para la amplificación de exón 54 del gen *LAMA2*, las condiciones de PCR fueron, desnaturalización 94 °C por 30s, alineamiento 58 °C por 30 s, polimerización 72 °C por 30 s, durante 32 ciclos, los oligonucleotidos 5' TGT CTA CTC TTC CTT TTC CT 3' F y para el R fue 5'TGC ATT ATC AGC TAG GTG TG 3', que pertenecen al exón 54 del gene *LAMA-2*

Secuenciación radiactiva.

Con el fin de realizar la secuenciación manual, el primer 5' se marcó γ^{32} (PerkinElmer) para esto fue utilizada la cinasa T4 (BioLabs), incubando 10 min a 37 °C y posteriormente durante 5 min a 90 °C para desnaturalizar la enzima. Posteriormente se realizó PCR en las

condiciones antes mencionadas. La secuenciación se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 8% con medidas de 20 cm de ancho por 45 cm de largo. Se le agregaron 4 μ de muestra a cada carril, se corrió durante tres horas a 1900 Volts / 70 Wats. Finalmente el gel se transfirió a un papel filtro el cual se puso en contacto con una placa autoradiográfica.

Resultados

En este trabajo se reunieron los datos clínicos de 74 pacientes con diagnóstico sugerente de distrofia muscular. Se tomaron biopsias de músculo deltoides o cuádriceps para analizar el patrón de expresión de algunas de las proteínas que integran el DGC, específicamente las proteínas del complejo sarcoglicano, distrofina y laminina. Las biopsias también se sometieron a tinción con Hematoxilina y Eosina para distinguir algunas de sus características a nivel celular.

Se estudiaron 49 pacientes masculinos y 25 femeninos, de un total de 74 pacientes: de los cuales 37 corresponden a edad pediátrica (0-15 años), y 35 adultos.

Del total de pacientes analizados por inmunofluorescencia con anticuerpos para detección de α , $-\beta$, $-\gamma$, $-\delta$ sarcoglicanos, laminina alfa 2 y distrofina (Tabla 2), se detectaron 13 pacientes con ausencia de distrofina, 12 con deficiencia de esta misma proteína ya sea por el extremo amino, carboxilo o en ambos extremos (Tabla 3). Se detectó un paciente con ausencia de laminina, 6 pacientes con disminución de alguno de los sarcoglicanos (Sarcoglicanopatías), 6 pacientes con ausencia de fibras musculares, así como 36 pacientes que presentaban las proteínas estudiadas normales y un paciente con ausencia de laminina.

Cantidad de pacientes	Estado de las proteínas estudiadas.
13	Ausencia de la proteína distrofina
12	Disminución de la proteína distrofina en los extremo amino, carboxilo o en ambos.
6	Disminución de las proteínas sarcoglicanos
1	Ausencia de la proteína laminina
6	Sin fibras musculares
36	Presencia de todas las proteínas estudiadas.
74	Total de pacientes estudiados.

Tabla 2. Total de pacientes estudiados. Columna uno, número de pacientes estudiados; columna dos estado de las proteínas estudiadas.

Pacientes con ausencia de la proteína distrofina

Los 13 pacientes que no presentaron la proteína distrofina son del género masculino (Tabla 3), el intervalo de edad es entre los 7 meses y los 15 años de edad, la musculatura involucrada fue en extremidades distales y proximales, la mayoría contaba con parámetros de CPK altos y el diagnóstico clínico fué acertado, en algunos de ellos se detectó la disminución de inmunofluorescencia de las proteínas sarcoglicanos.

Numero de paciente	Figuras	Edad años	CPK (U/L)	Músculos involucrados	Dx	observaciones
1	3	15	2800	Distal / Proximal	DMD	Bajo en SG
2	4	5	Alta	ND	Distrofia	
3	5	9	25270	Distal / Proximal	DMD	Bajo en SG
4	6	7 meses	ND	No Determinado	Distrofia	
5	7	6	260	Hipotonía	Dis/Congénita	
6	8	7	4500	Proximal	Distrofia	Bajo en SG
7	9	3	ND	Distal / Proximal	DMD	
8	10	14	3865	Distal / Proximal	Distrofia	Bajo en SG
9	11	6	ND	Proximal	DMD	Bajo en SG
10	12	14	ND	Proximal	Cinturas	Bajo en Gama-SG
11	13	6	ND	Proximal y Distal	Distrofia	Bajo en SG
12	14	9	10214	Proximal y Distal	DMD	Bajo en SG
13	15	7	6385	Proximal y Distal	DMD	Bajo en SG

Tabla 3. Pacientes con ausencia de la proteína distrofina. Primera columna numero de paciente; segunda columna edad de los pacientes en años; tercera columna fosfoquinasa de creatinina; Cuarta columna Dx diagnóstico previo y última columna presencia o ausencia de otras proteínas del DGC.

En estos pacientes se encontró un patrón de inmunofluorescencia anormal compatible con distrofia muscular de Duchenne. Nueve de los pacientes con ausencia de la proteína distrofina, (1, 3, 6, 8, 9, 10, 11, 12 y 13; figuras 3, 5, 8, 10, 12, 13, 14, y 15

respectivamente) también presentan deficiencias en las proteínas del complejo sarcoglicano. Los pacientes 1, 3, 6, 9, 11, 12 y 13 (figuras 3, 5, 8, 11, 13, 14 y 15 respectivamente) presentan deficiencia de los cuatro sarcoglicanos en grados diferentes (Tabla 4). Una deficiencia marcada se observó en las cuatro proteínas de los pacientes 9 y 13 figuras. Respecto al paciente 3 presenta disminución en sarcoglicanos pero con una mayor disminución en beta y delta sarcoglicanos. El paciente número 6 presenta disminución en los cuatro sarcoglicanos pero en mayor proporción beta sarcoglicano.

Número de paciente	Deficiente en α -SG	Deficiente en β -SG	Deficiente en γ -SG	Deficiente en δ -SG
1	++	++	++	++
3	++	+	+	++
6	++	+	++	++
8	+	+	+++	+++
9	+	+	+	+
10	+++	+++	+	+++
11	++	++	++	++
12	++	++	++	++
13	+	+	+	+

Tabla 4. Pacientes sin distrofina y bajos en Sarcoglicanos. Tres cruces inmunofluorescencia normal (+++). Dos cruces señal de inmunofluorescencia bajo (++). Una cruz señal de inmunofluorescencia escasa (+).

El paciente 8 presenta disminución en alfa y beta sarcoglicanos y finalmente el paciente 10 presenta disminución solo en gama sarcoglicano.

Paciente 1

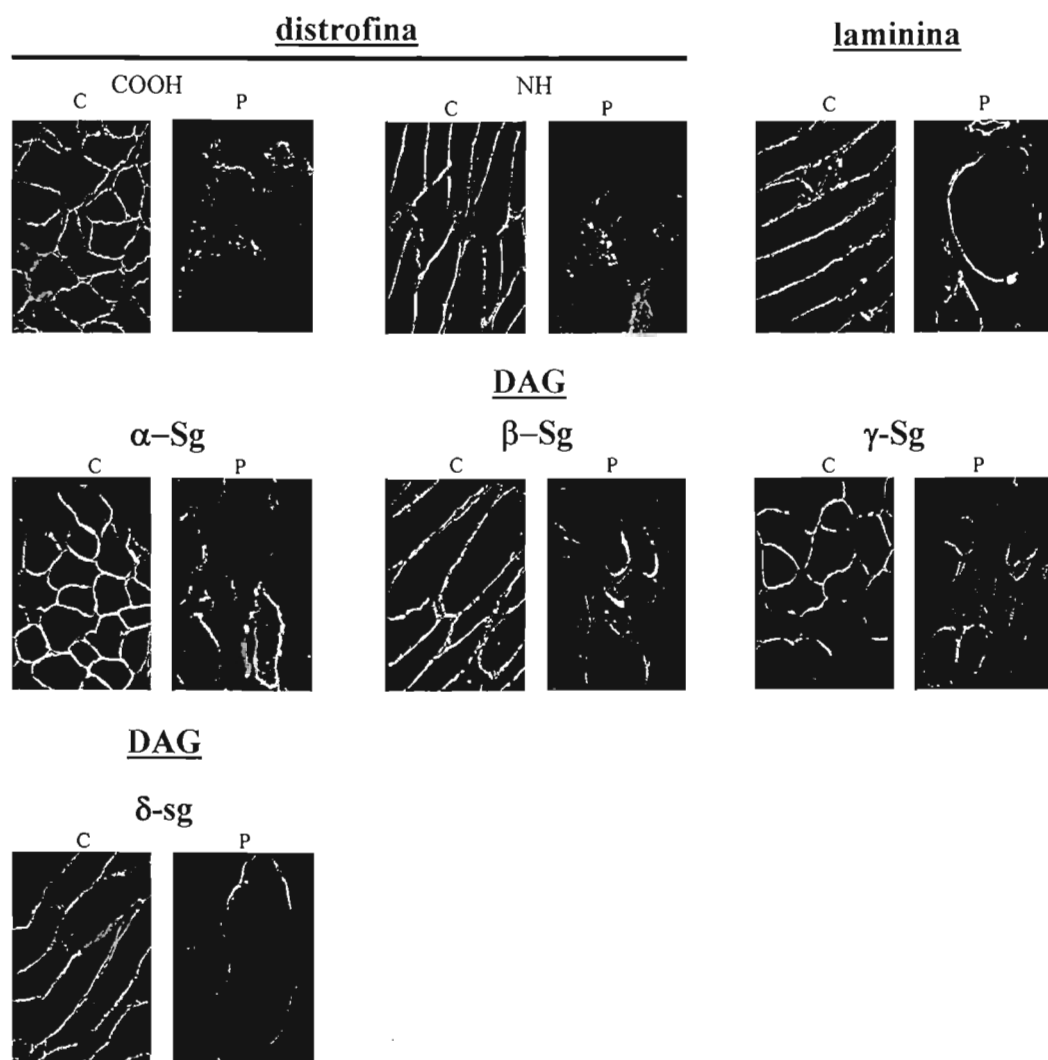


Figura 3. Inmunofluorescencia indirecta del paciente 1. Varón de 15 años de edad, con debilidad generalizada, CPK de 2800. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran la proteína ausente para distrofina, extremo amino (NH) y carboxilo (COOH), además deficiente en la tinción para las cuatro proteínas sarcoglicanos α , β , γ y δ , para merosina normal. C: músculo normal P: músculo paciente. Caso único en la familia.

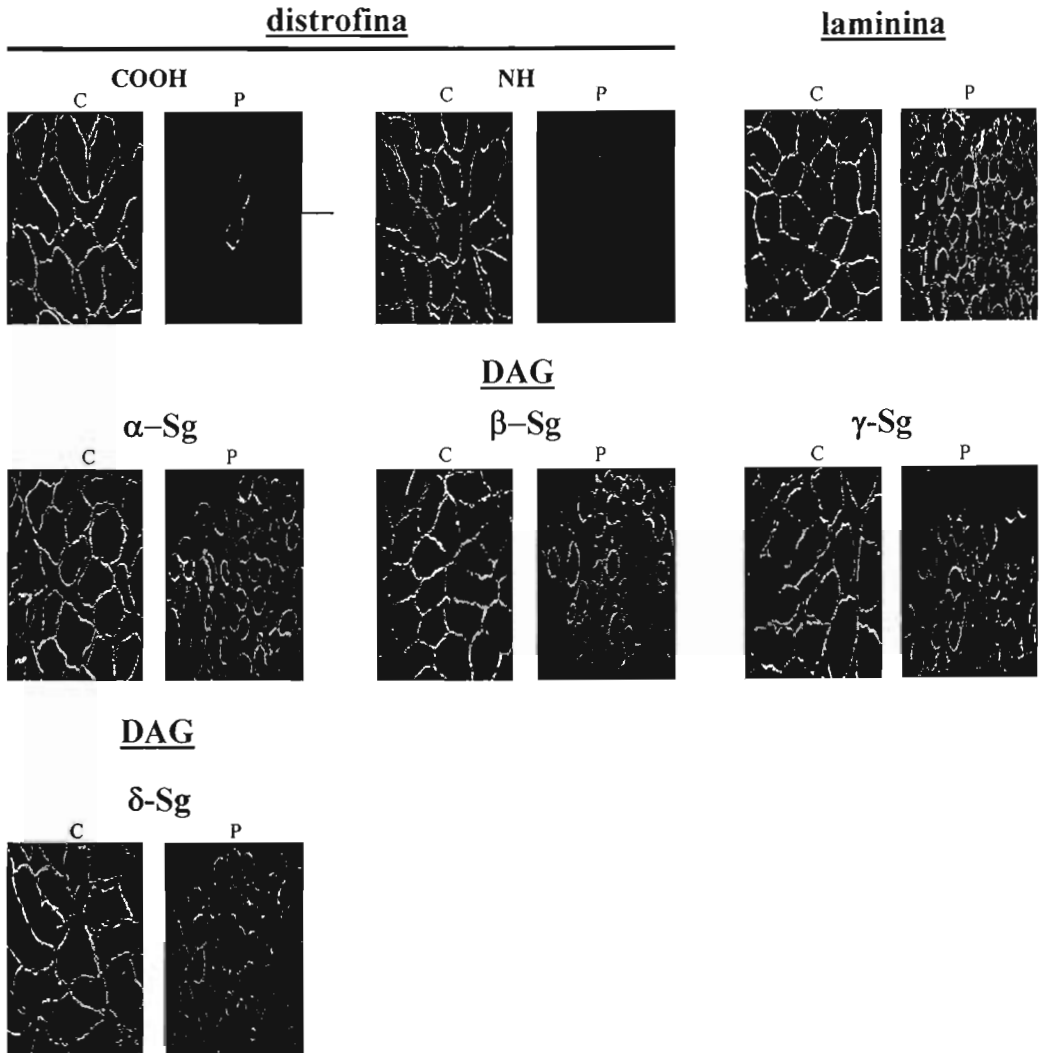


Figura 4. Inmunofluorescencia indirecta del paciente 2. Varón de cinco años de edad, las imágenes de inmunofluorescencia muestra ausencia de la proteína distrofina, el extremo amino (NH) y en el extremocarboxilo (COOH) presenta dos células revertantes marcadas con una flecha, las demás imágenes para las diferentes proteínas α -, β -, γ y δ sarcoglicanos observa tinción normal, al igual que laminina. P: músculo paciente C:musculo normal, caso único en la familia.

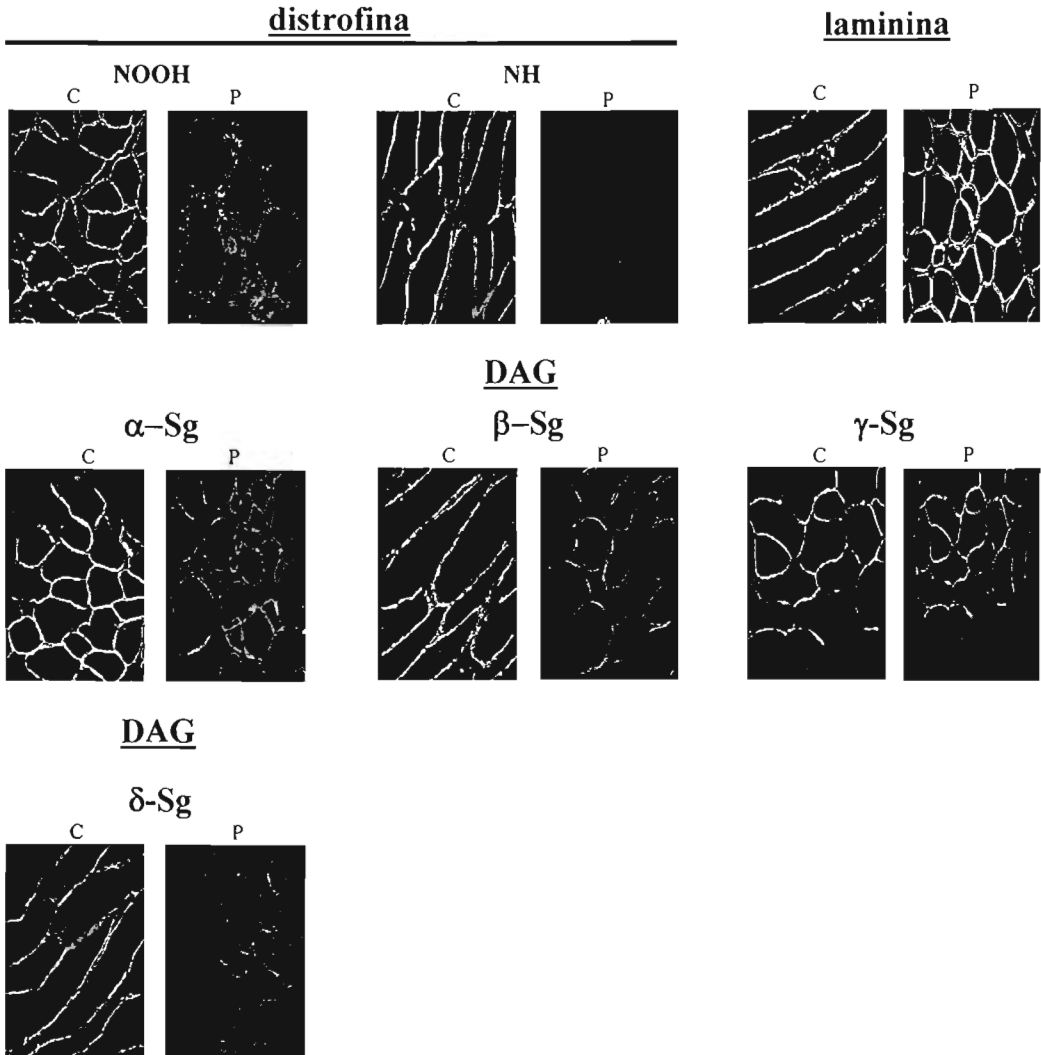


Figura 5. Imágenes de inmunofluorescencia del paciente 3. Varón de 9 años con CPK de 25270 y debilidad generalizada,. Imágenes de Inmunofluorescencia muestran ausencia total de la proteína distrofina en ambos extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), con deficiencia en los cuatro sarcoglicanos pero mas marcado en beta (β) y gama (γ) sarcoglicanos, para la proteína laminina se encuentra normal. P: músculo del paciente C: músculo normal. Caso único en la familia.

Paciente - 4

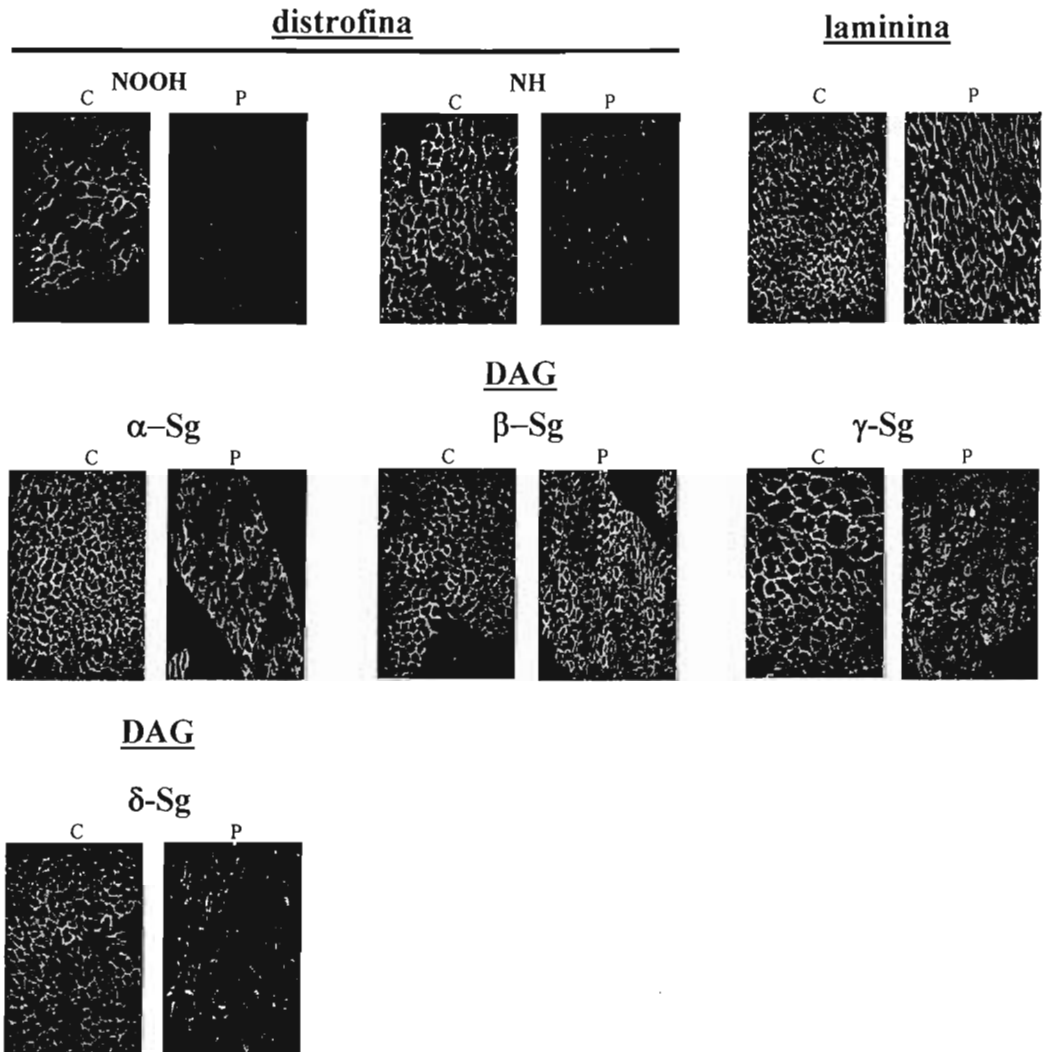


Figura 6. Imágenes de inmunofluorescencia del paciente 4. Varón de 7 meses de edad. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran ausencia de la proteína distrofina extremo amino (NH) y carboxilo (COOH), para laminina y los cuatro sarcoglicanos- α , - β , - γ y - δ la tinción fue normal. C: músculo normal. P: músculo de paciente. Caso único en la familia

distrofina

laminina

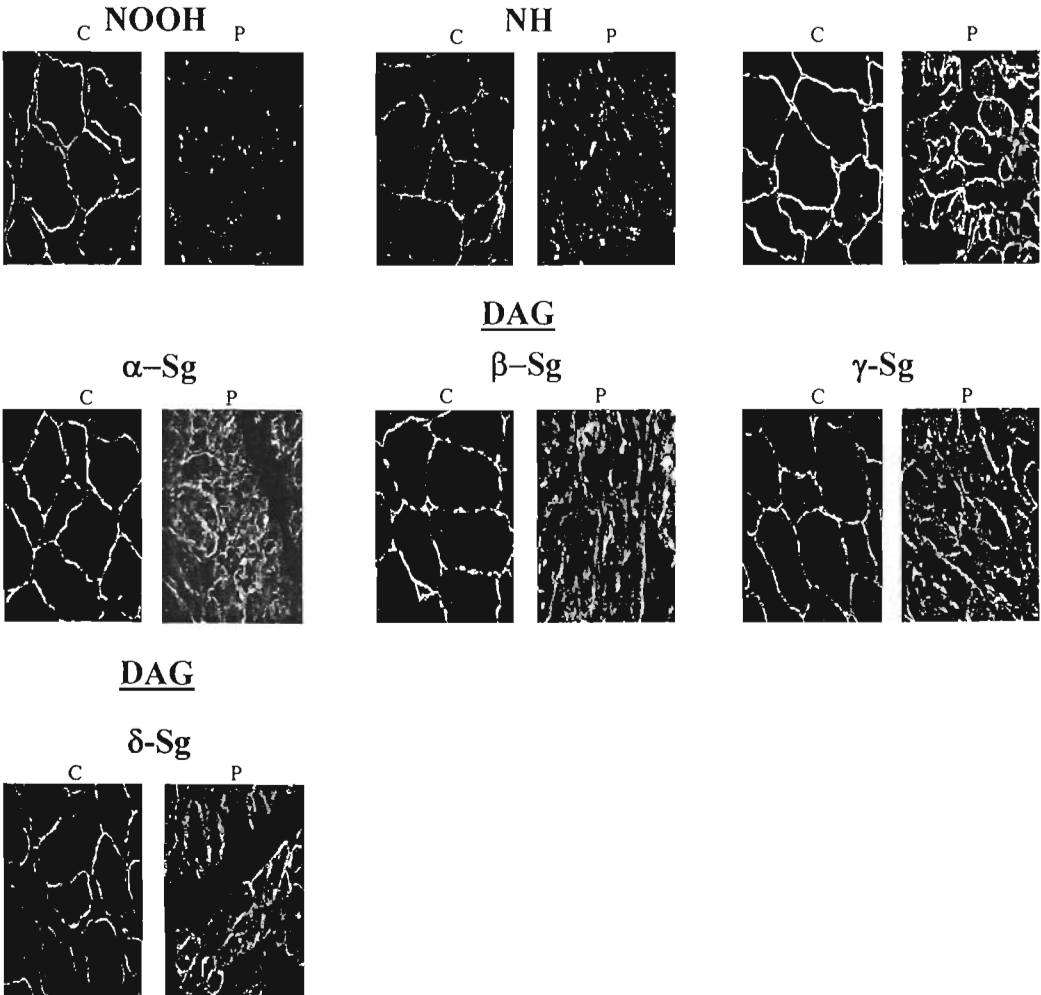


Figura 7. Imágenes de inmunofluorescencia del paciente 5. Varón de 6 años, las imágenes de inmunofluorescencia muestran la tinción para la proteína distrofina es ausente para el extremo amino (NH) y carboxilo (COOH), para los cuatro sarcoglicanos α -, β -, γ y δ , para laminina es normal. P: músculo paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

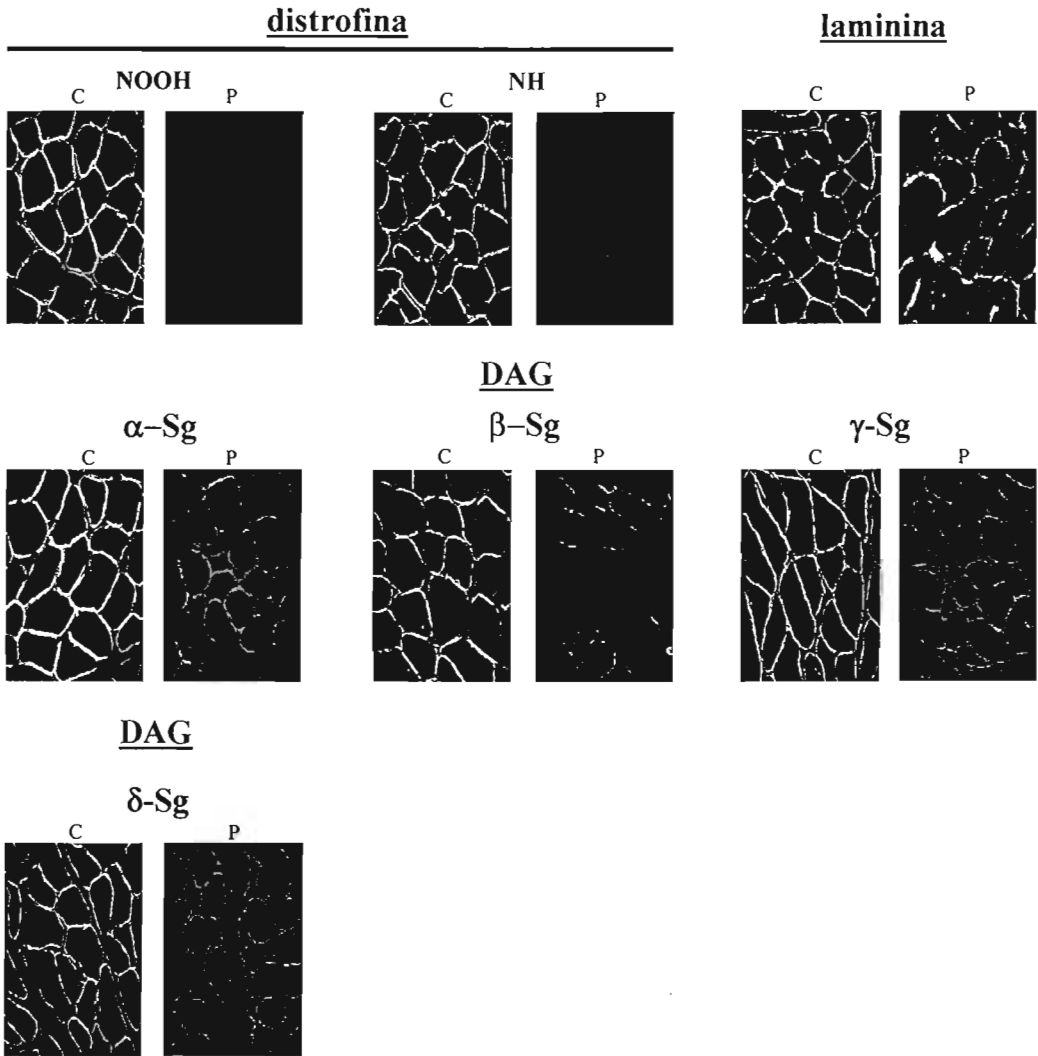


Figura 8. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 6. Varón de 7 años de edad, con CPK 4500, con musculatura proximal afectada. Imágenes de inmunofluorescencia muestran ausencia de la proteína distrofina para ambos extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), los cuatro sarcoglicanos α -, β -, γ y δ presentan disminución en la tinción, en la proteína beta sarcoglicano se acentúa la disminución. Para la proteína laminina se presenta una tinción normal. C: músculo normal P: músculo paciente. Caso único en la familia.

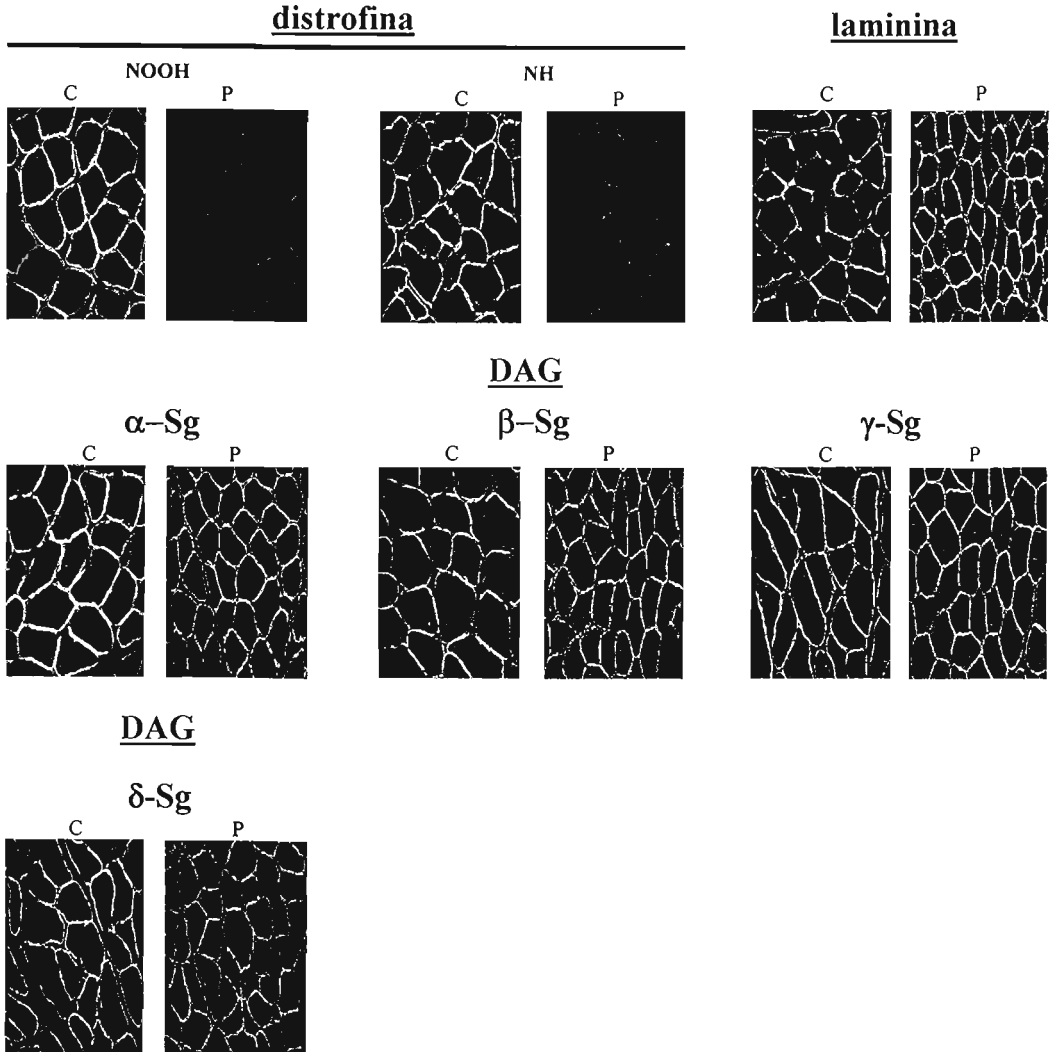
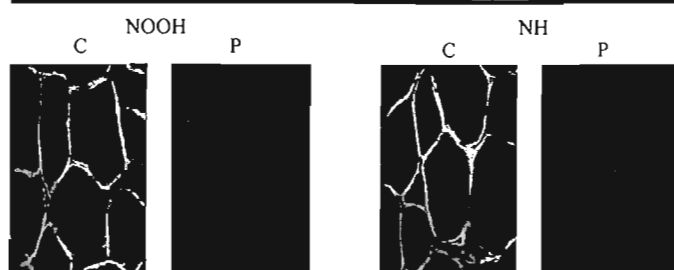
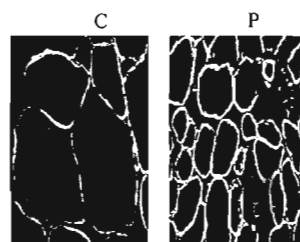


Figura 9. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 7. Varón de 3 años, con debilidad generalizada. Las imágenes de inmunofluorescencia se observan con ausencia total de la proteína distrofina extremo amino (NH) y extremo carboxilo (COOH), la tinción es normal para laminina y los cuatro sarcoglicanos α -, β -, γ y δ . C: músculo normal. P: músculo del paciente. Caso único en la familia.

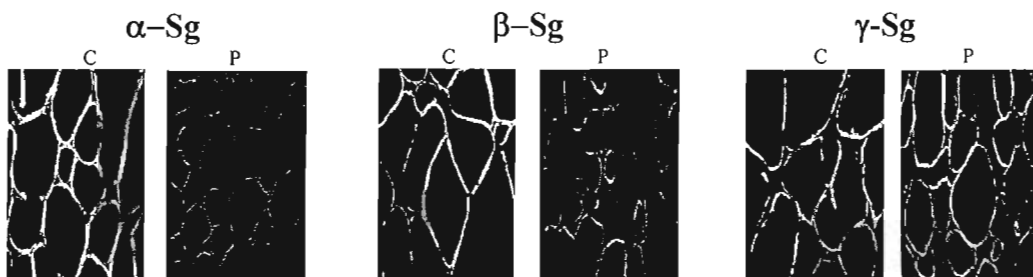
Distrofina



Laminina



DAG



DAG

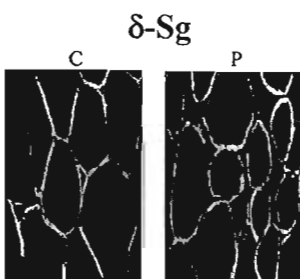
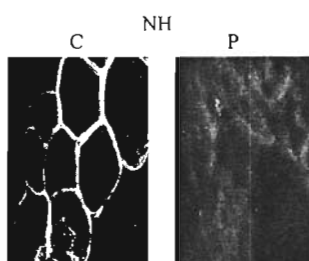
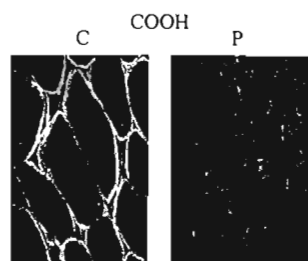
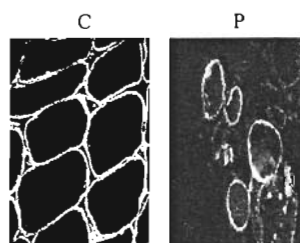


Figura 10. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 8. Vaarón de 14 años, con musculatura proximal y distal afectada con 3865 de CPK. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran la ausencia de la proteína distrofina extremo amino (NH) y extremo carboxilo (COOH). Los sarcoglicanos alfa (α) y beta (β) se encuentran disminuidos, para gama (γ) y delta (δ) normales al igual que la tinción para la proteína laminina. C: músculo normal. P: músculo del paciente. Caso único en la familia.

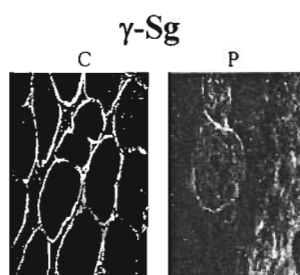
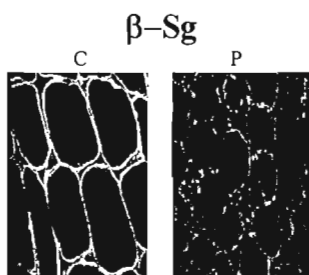
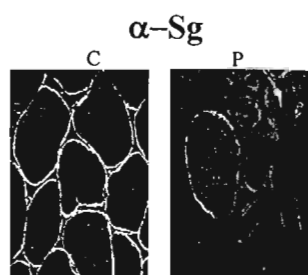
distrofina



laminina



DAG



DAG

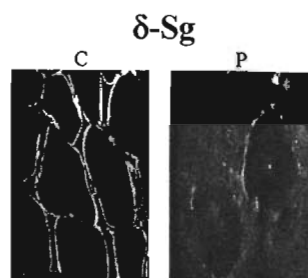
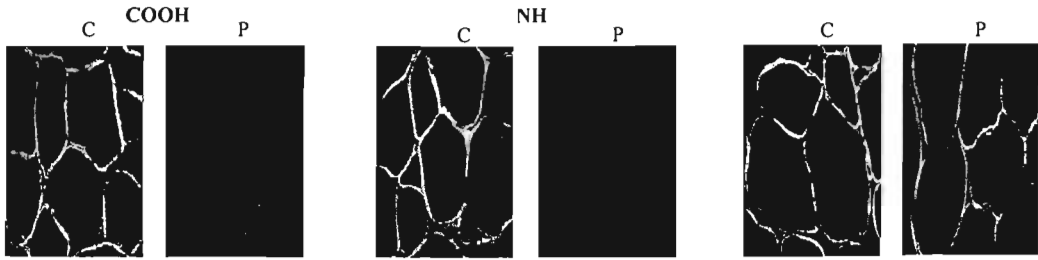


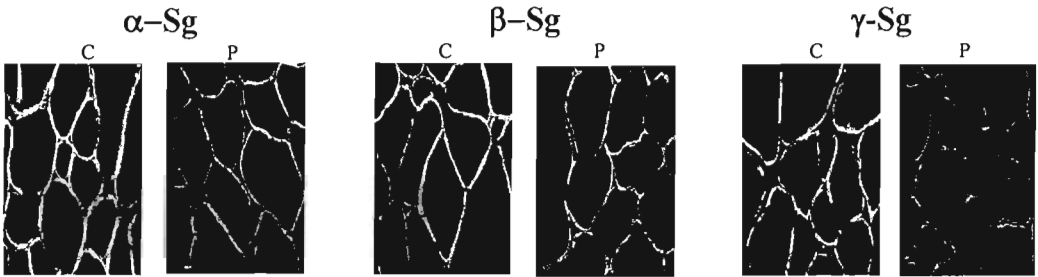
Figura 11. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 9. Varón de 6 años con musculatura proximal afectada. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran la ausencia de la proteína distrofina en el extremo amino (NH) y el extremo carboxilo (COOH), los cuatro sarcoglicanos α -, β -, δ y γ con deficiencias severas, para laminina la tinción es normal. P: músculo de paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

distrofina

laminina



DAG



DAG

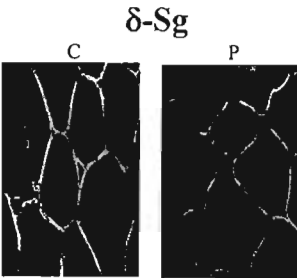


Figura 12. Inmunofluorescencia indirecta del paciente 10. Varón de 14 años, con afección proximal de la musculatura. Imágenes de inmunofluorescencia muestran la ausencia de la proteína distrofina en su extremo amino (NH) y carboxilo (COOH), para la proteína gama (γ) sarcoglicano la tinción es deficiente, para alfa (α), beta (β) y delta (δ) sarcoglicanos y laminina la tinción es normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

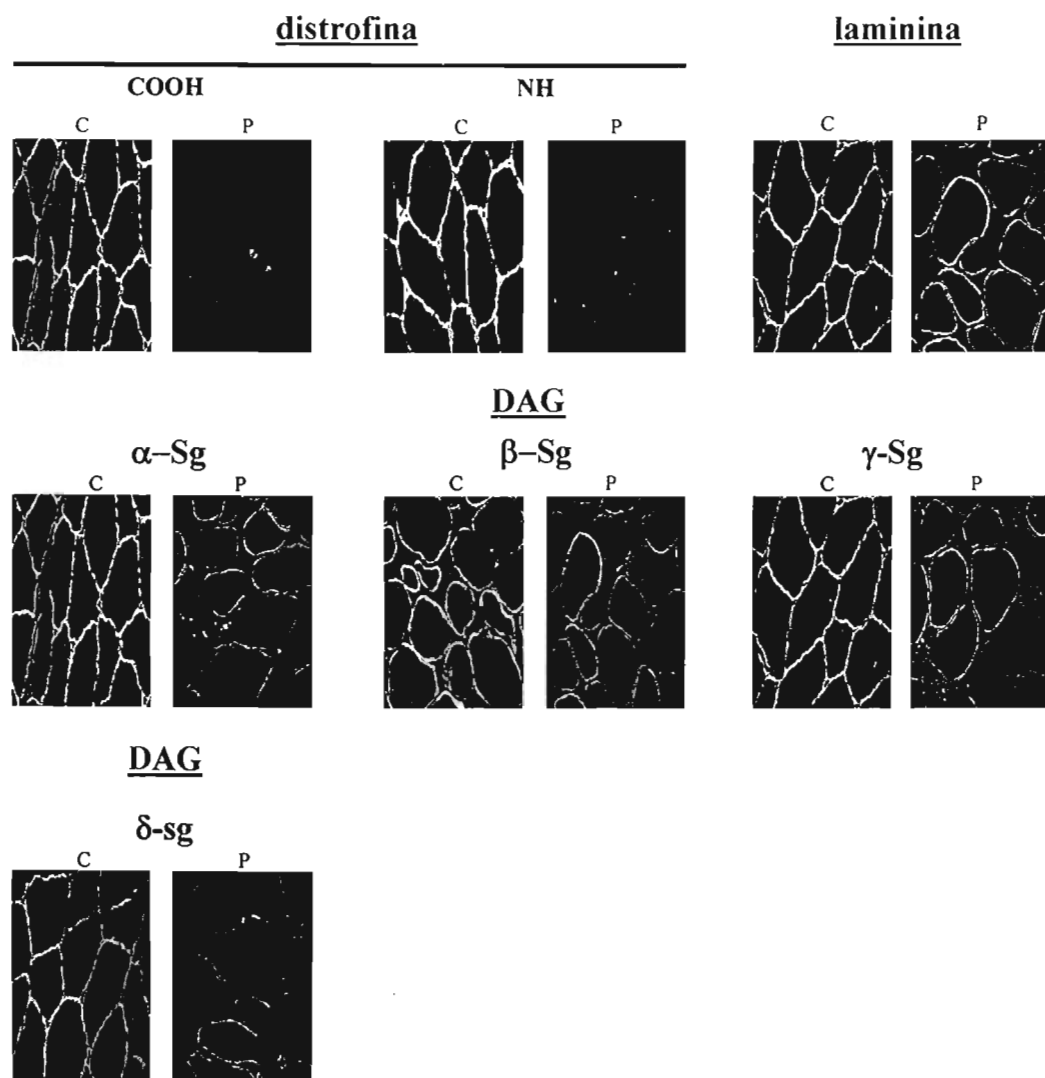


Figura 13. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 11. Varón de 6 años con musculatura proximal y distal afectada. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran la ausencia de la proteína distrofina extremo amino (NH) y carboxilo (COOH), las tinción de alfa (α), beta (β), gama (γ) y delta (δ) sarcoglicanos se encuentra disminuida a diferencia de laminina que se encuentra normal. C: músculo normal. P: músculo del paciente. Caso único en la familia.

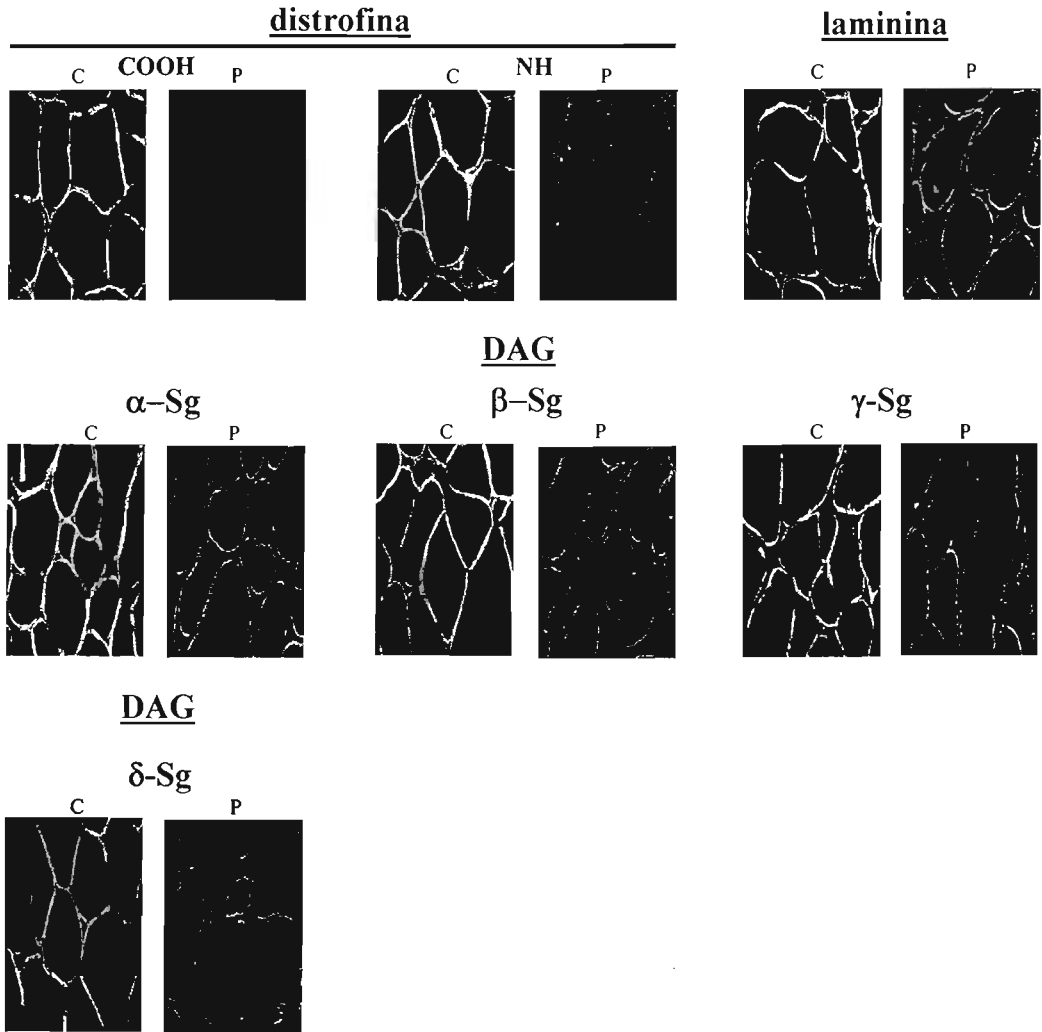
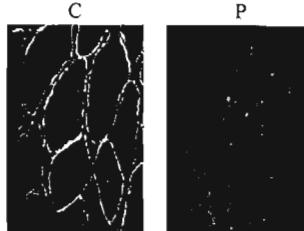


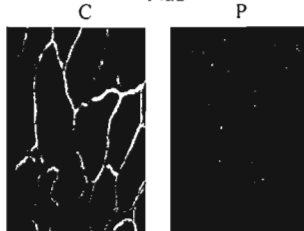
Figura 14. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 12, Varón de 9 años con CPK de 10214 con musculatura distal y proximal afectada. Imágenes de inmunofluorescencia muestran ausencia de la proteína distrofina extremo amino (NH) y extremo carboxilo (COOH), con deficiencia en la tinción para las cuatro proteínas de los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ , para laminina la fluorescencia es normal. C: músculo normal. P: músculo del paciente. Caso único en la familia.

distrofina

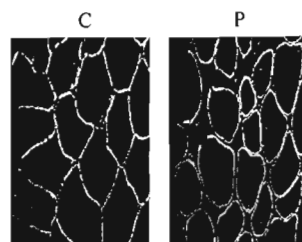
COOH



NH

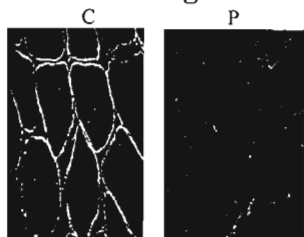


laminina

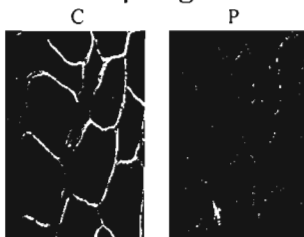


DAG

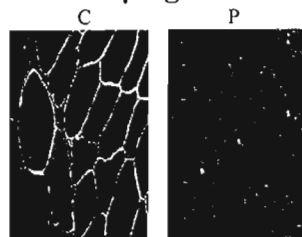
α -Sg



β -Sg



γ -Sg



DAG

δ -Sg

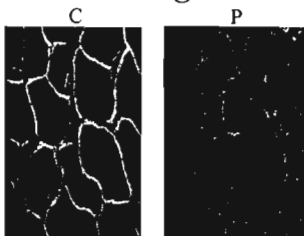


Figura 15. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 13. Varón de 7 años de edad, con CPK de 6385, con musculatura proximal y distal afectada. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran la ausencia de la proteína distrofina extremo amino (NH) y extremo carboxilo (COOH), las cuatro proteínas de los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ se encuentran deficientes y la tinción para laminina se encuentra normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

Pacientes con deficiencia de la proteína distrofina

Se analizaron 12 pacientes con disminución de la proteína distrofina, once del sexo masculino y un paciente femenino, el intervalo de edad de los pacientes con disminución de distrofina fue entre 5 y 37 años, la mayoría de los pacientes sufrían debilitamiento de extremidades proximales, la CPK detectada en sangre fue alta, el diagnóstico clínico previo en este caso 8 de 11 fueron acertados (Tabla 5).

Los pacientes que presentaron normal el extremo carboxilo de la proteína distrofina fueron 15, 21, 23 y 25 con disminución del extremo amino en igual proporción. Los pacientes 16 y 17 tienen disminución en los dos extremos acentuándose en el extremo amino. Los pacientes 18 y 19 mostraron disminución en los dos extremos de la proteína distrofina. El paciente 20 presentó deficiencia en los dos extremos, aunque más acentuado en el extremo carboxilo, finalmente el paciente 24 mostró ausencia del extremo amino y deficiente el extremo carboxilo (Tabla 6).

Paciente No.	figura	Edad	Genero	CPK (U/L)	Consanguinidad	Músculos afectados	Diagnóstico previo
14	16	11	M	4021	Negativo	P	Dist/Neuropatía
15	17	33	M	1521	No D	P	Cinturas
16	18	5	M	155	Negativo	P	Dist/Neuropatía
17	19	32	M	25270	Negativo	P	DMB/Cinturas
18	20	27	M	No D	Negativo	P	Dist
19	21	9	F	7717	No D	P	DMD o DMB
20	22	8	M	1375	No D	P	DMD
21	23	9	M	14050	Negativo	P	DMB
22	24	29	M	1086	Negativo	D/P	DMB
23	25	28	M	286	Negativo	P	DMB/Cinturas
24	26	15	M	No D	No D	No D	DMB
25	27	37	M	162	Negativo	D/P	DMB

Tabla 5. Características clínicas de pacientes con deficiencia en la proteína distrofina. Columna uno numero de paciente; Columna dos edad de los pacientes en años; columna tres genero; Columna cuatro CPK (fosfocinasa de creatinina); Columna cinco consanguinidad ND (no determinado); Columna seis musculatura afectada, P(proximal) y D (dital); Séptima columna, diagnostico previo.

No de paciente	NOOH	COOH	Observaciones
14	++	-	
15	++	+++	Bajo en γ,δ -SG
16	+	++	Bajo en SG
17	+	++	Bajo en SG
18	+	+	
19	+	+	Bajo en SG
20	++	+	
21	++	+++	
22	++	+	
23	+	+++	
24	-	++	
25	++	+++	

Tabla 6. Expresión del extremo amino y carboxilo en pacientes deficientes de distrofina; Columna uno, número de paciente; Columna dos, extremo amino (NOOH); Columna tres extremo carboxilo (COOH) ; Columna cuatro, expresión de otras proteínas.

En el grupo de pacientes que tuvieron disminución de la proteína distrofina, cuatro pacientes adicionalmente mostraron la expresión deficiente de los sarcoglicanos en diferentes grados, para las cuatro proteínas (pacientes 15, 16, 17 y 19).

El paciente 15 presentó disminución de gama sarcoglicano, los pacientes 16 y 17 presentaron disminución de las cuatro proteínas, acentuándose en alfa y delta sarcoglicanos, el paciente 19 tuvo disminución en los cuatro sarcoglicanos con mayor deficiencia en alfa sarcoglicano, el paciente 23 presentó la misma deficiencia para los cuatro sarcoglicanos (Tabla 7).

Número de paciente	Deficiente en α -SG	Deficiente en β -SG	Deficiente en γ -SG	Deficiente en δ -SG
15	+++	+++	++	++
16	+	++	++	+
17	+	++	++	+
19	+	++	++	++
23	++	++	++	++

Tabla 7. Pacientes con deficiencia de la proteína distrofina y bajos en Sarcoglicanos. Tres cruces inmunofluorescencia normal(+++), Dos cruces señal de inmunofluorescencia bajo (++), Una cruz, señal de inmunofluorescencia escasa (+).

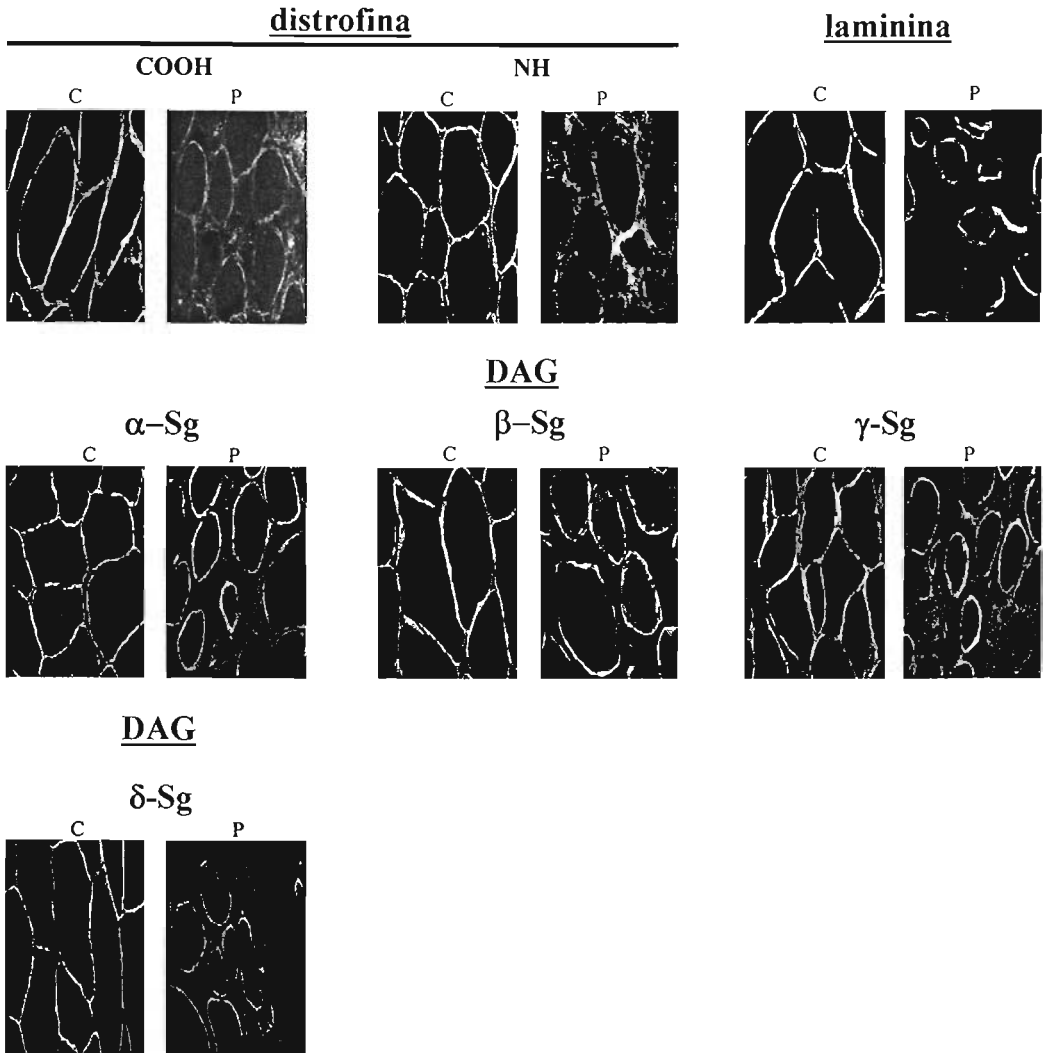


Figura 16. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 14. Varón de 11 años de edad con CPK de 402, imágenes de inmunofluorescencia muestran una ausencia de tinción para la proteína distrofina, para el extremo amino (NH) y una deficiencia para el extremo carboxilo (COOH). La fluorescencia normal para laminina y los cuatro sarcoglicanos α -, β -, γ y δ -. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

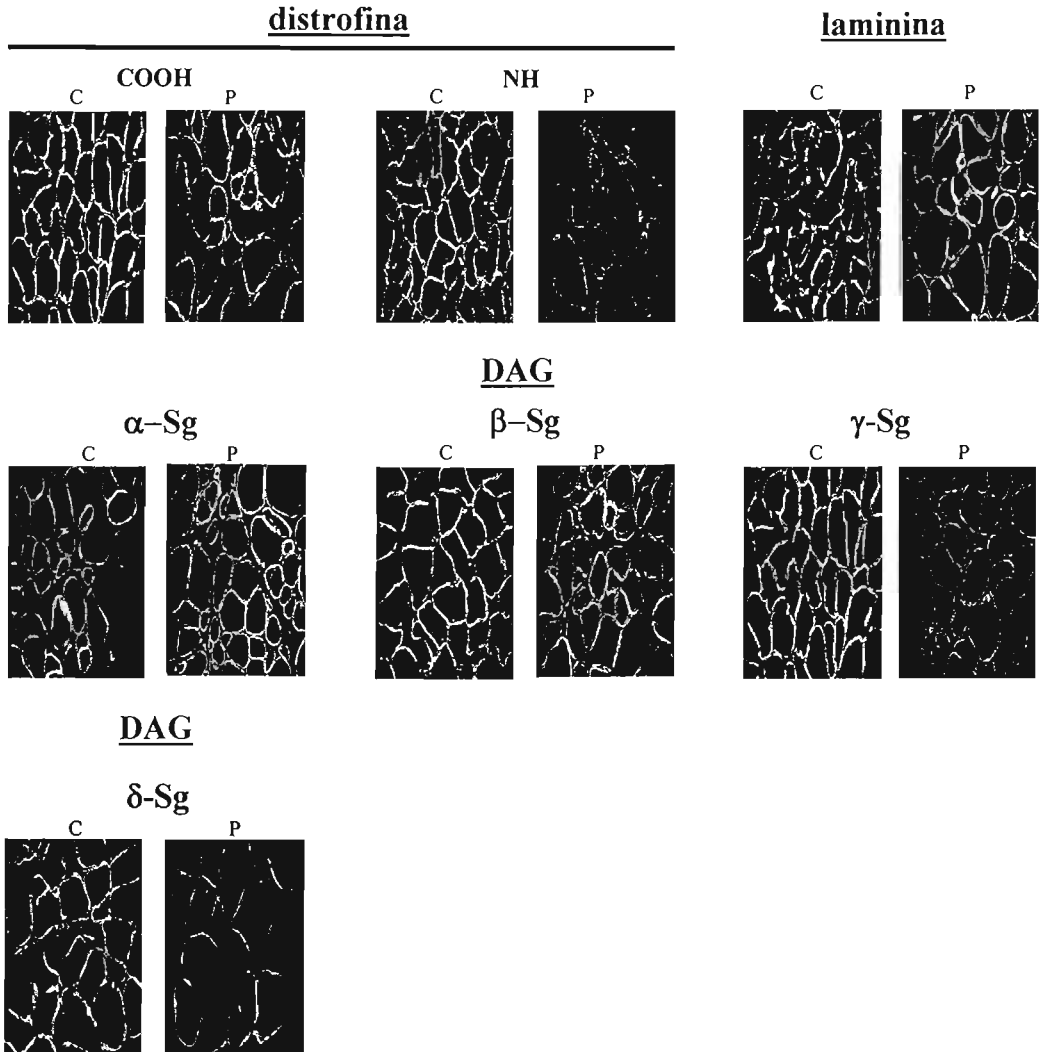
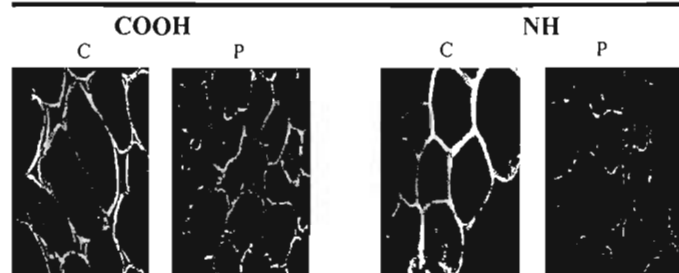
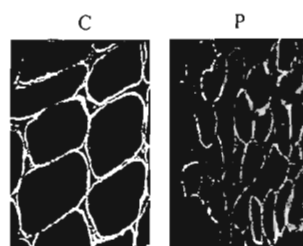


Figura 17. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 15. Varón de 33 años, con musculatura proximal afectada y CPK 2521. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran deficiencia del extremo amino (NH) de la proteína distrofina y una leve disminución del extremo carboxilo (COOH), la proteína gama (γ) y delta (δ) sarcoglicanos se encuentran disminuidos en comparación con alfa (α) y beta (β) sarcoglicanos que se encuentran normales, al igual que la proteína laminina. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

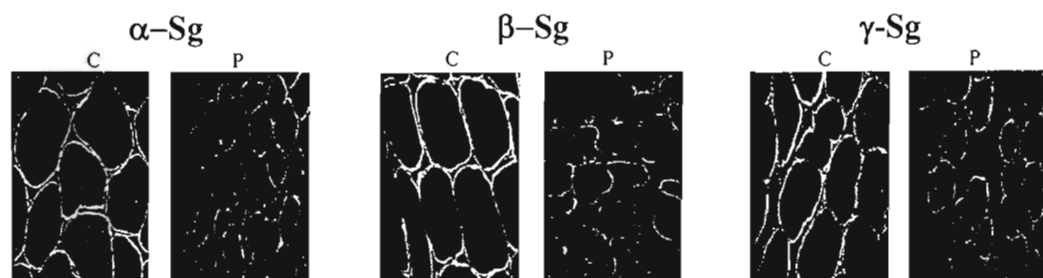
Distrofina



Laminina



DAG



DAG

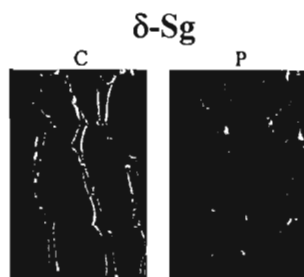


Figura 18. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 16. Varón de 5 años, con musculatura proximal afectada. Imágenes de inmunofluorescencia muestran deficiencia de la proteína distrofina presentando mayor deficiencia den el extremo amino (NH) que en el carboxilo (COOH), en los sarcoglicanos la deficiencia se observa en las cuatro proteínas α -, β -, γ y δ -, acentuándose mas en alfa (α) y delta (δ) sarcoglicanos, para laminina la tinción es normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

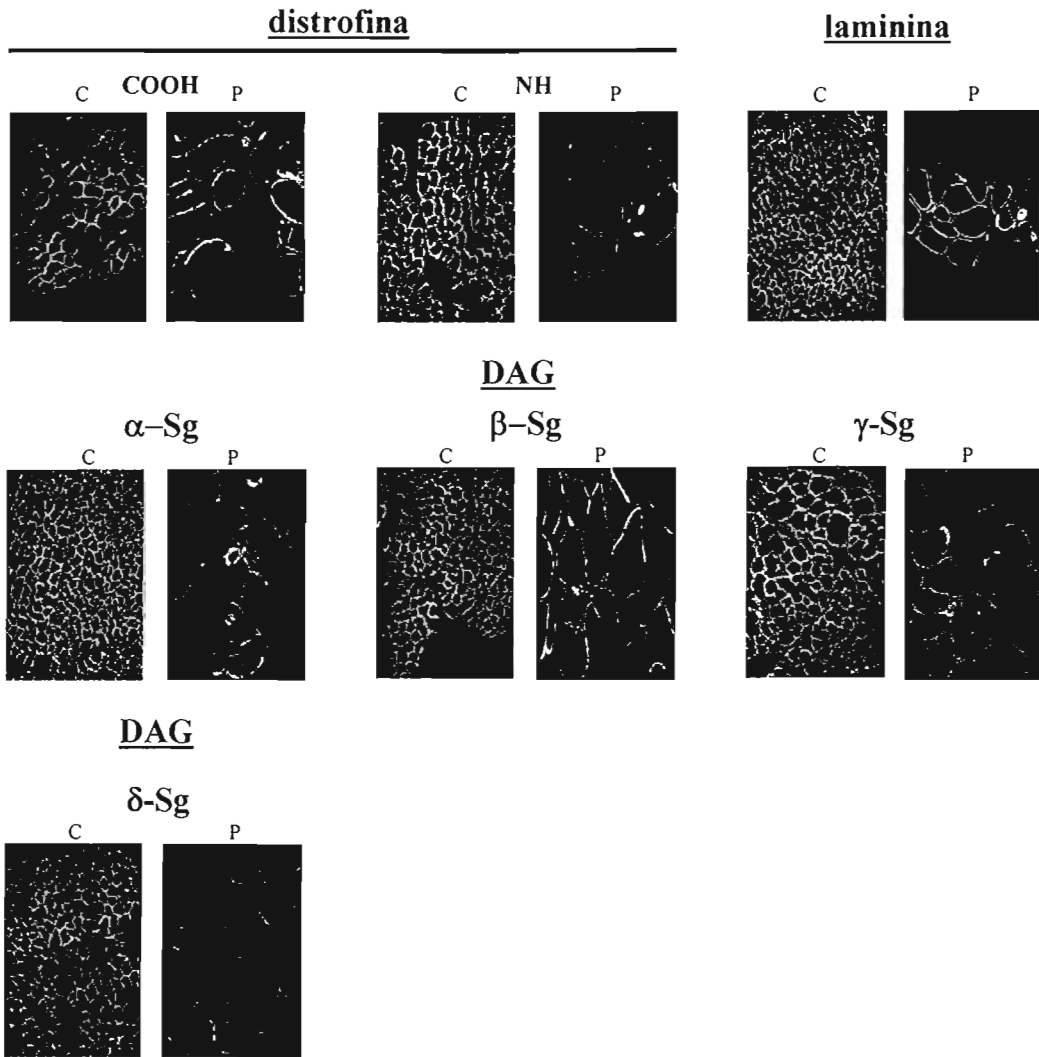


Figura 19. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 17. Varón de 32 años, con deficiencia de músculos proximales, CPK de 25270. Imágenes de inmunofluorescencia muestran deficiencia de la proteína distrofina con una menor tinción del extremo amino (NH) que del carboxilo (COOH), los sarcoglicanos deficientes alfa (α) y delta (δ), los sarcoglicanos beta (β) y gama (γ) con mayor presencia que los dos anteriores, para laminina la tinción es normal. C: músculo normal. P: músculo del paciente. Caso único en la familia.

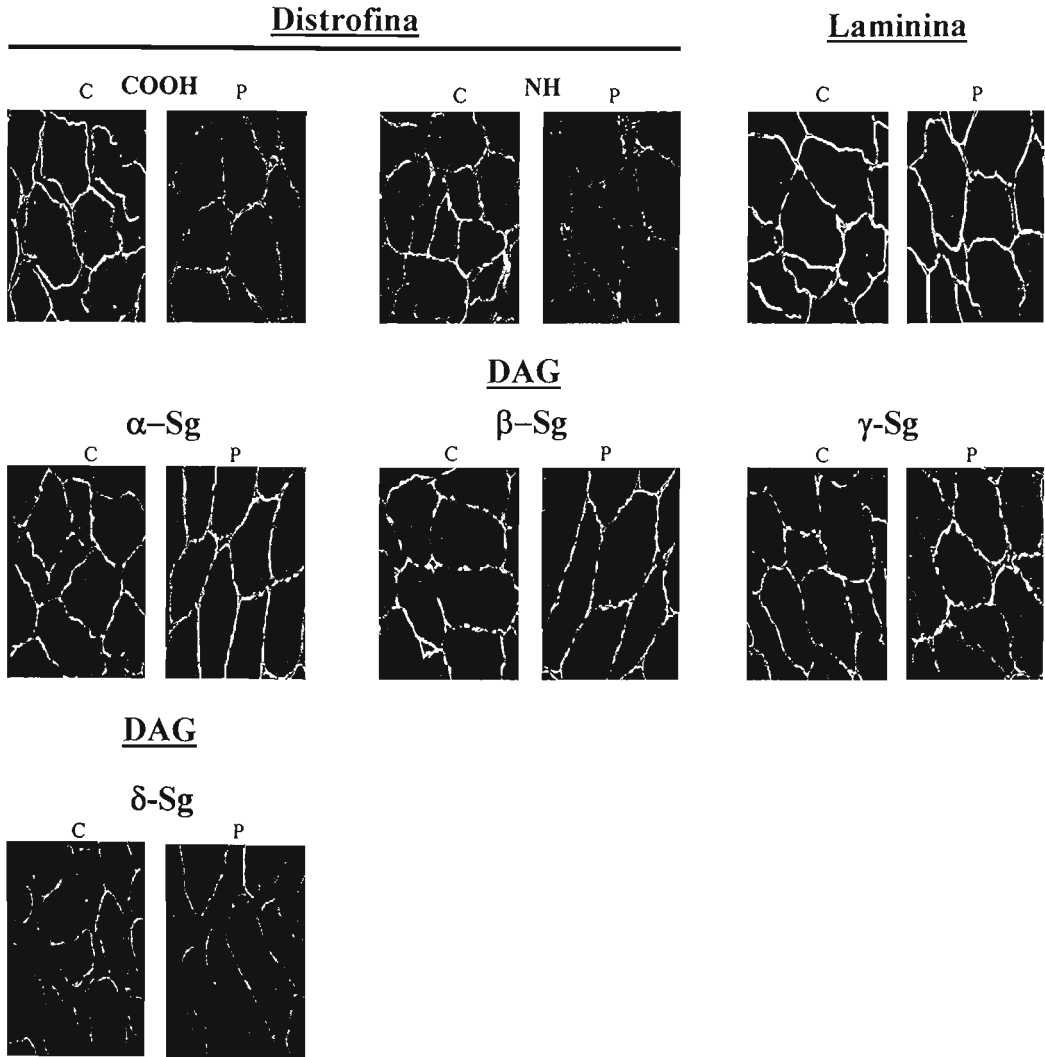


Figura 20. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 18. Varón de 27 años, con deficiencia de musculatura proximal. Imágenes de inmunofluorescencia muestran deficiencia de la proteína distrofina en igual proporción para el extremo amino (NH) y el extremo carboxilo (COOH), los sarcoglicanos – α -, β -, γ y δ se encuentran con una tinción normal, al igual que laminina. C: músculo normal. P: músculo del paciente. Caso único en la familia.

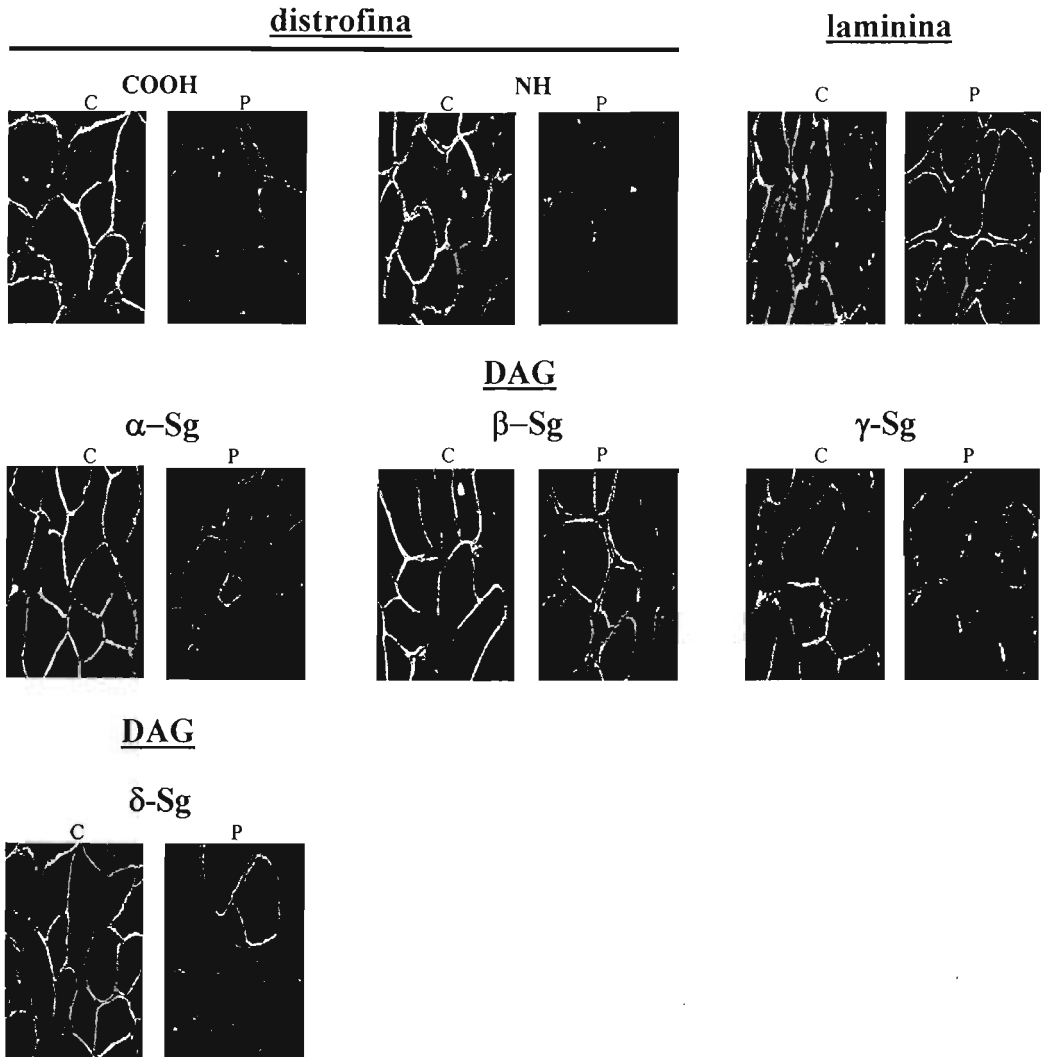


Figura 21. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 19. Femenino de 9 años, con musculatura proximal afectada, CPK de 7717. Imágenes de inmunofluorescencia de la distrofina en ambos extremos de la proteína extremo amino (NH) y carboxilo (COOH), los cuatro sarcoglicanos deficientes, aunque alfa (α) se observa más deficiente que beta (β), gama (γ) y delta (δ) sarcoglicano, para la proteína laminina la fluorescencia se presenta normal. C: músculo normal. P: músculo del paciente. Caso único en la familia.

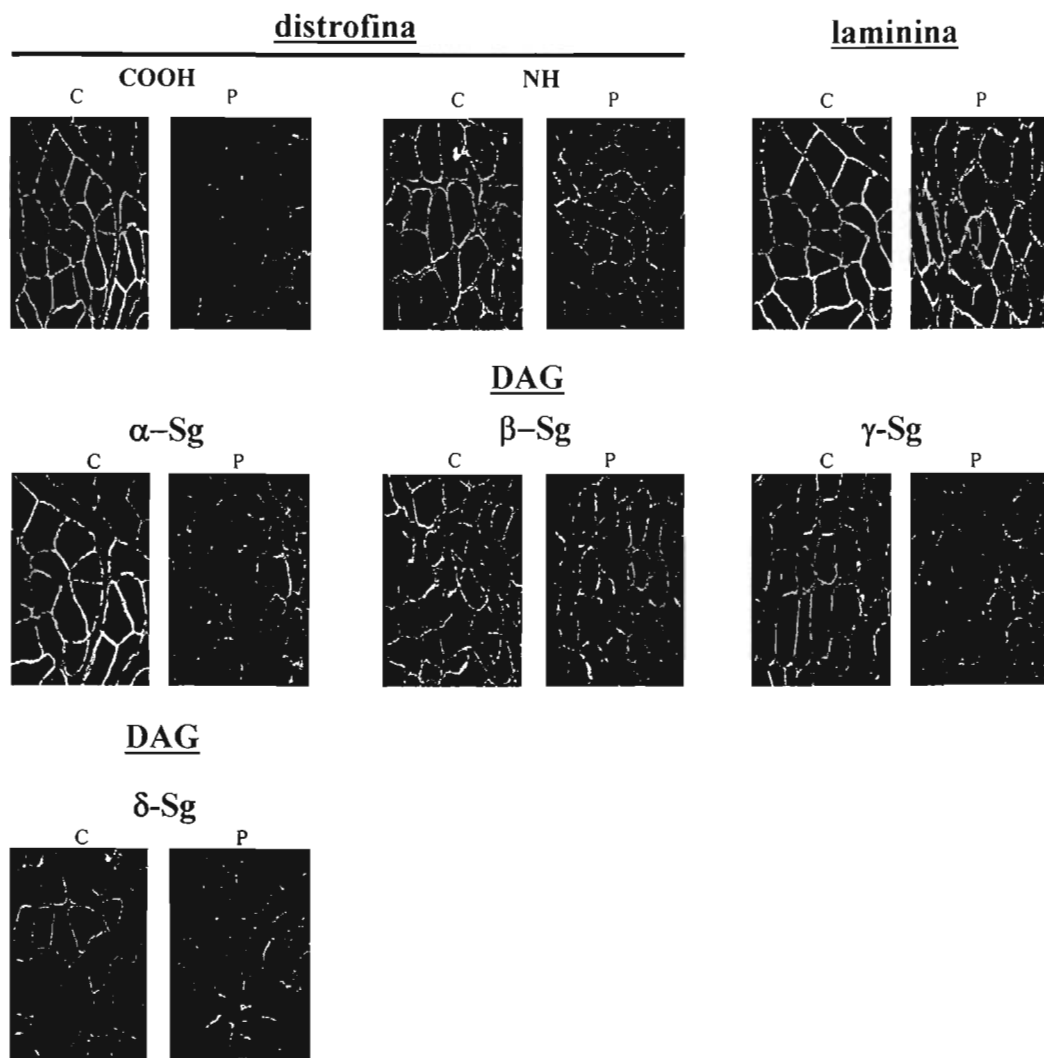


Figura 22. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 20. Varón de 8 años, musculatura proximal afectada, CPK de 1375. Imágenes de inmunofluorescencia muestran a la proteína distrofina deficiente para el extremo amino (NH) y con menor intensidad el extremo carboxilo (COOH), para los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ es normal, al igual que para laminina. C: músculo normal. P: músculo del paciente. Caso único en la familia.

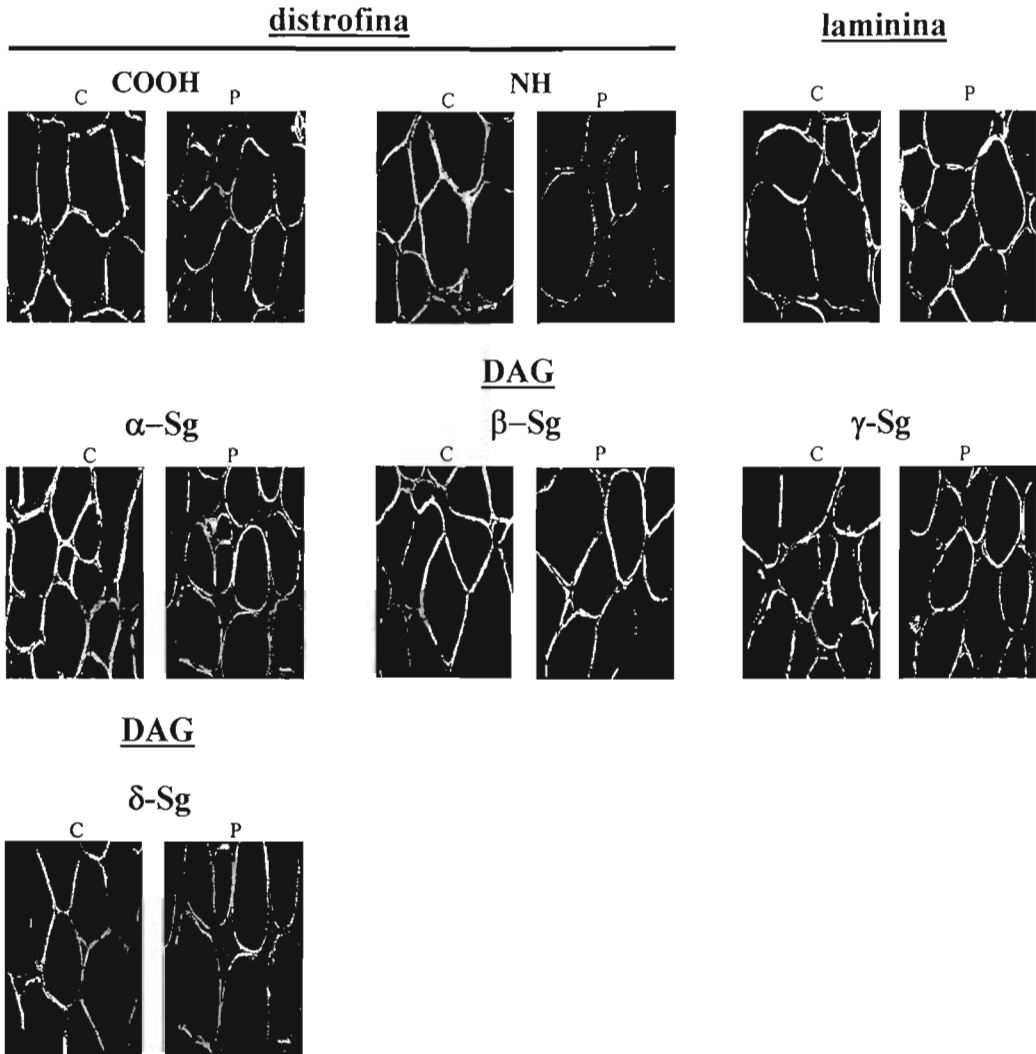


Figura 23. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 21. Varón de 9 años, musculatura afectada proximal, CPK 14050. Imágenes de inmunofluorescencia muestran deficiencia de la proteína distrofina para el extremo amino (NH) de la proteína, para el carboxilo (COOH) es normal, los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ se observan normales al igual que para la proteína laminina. C: músculo normal. P: músculo del paciente. Caso único en la familia.

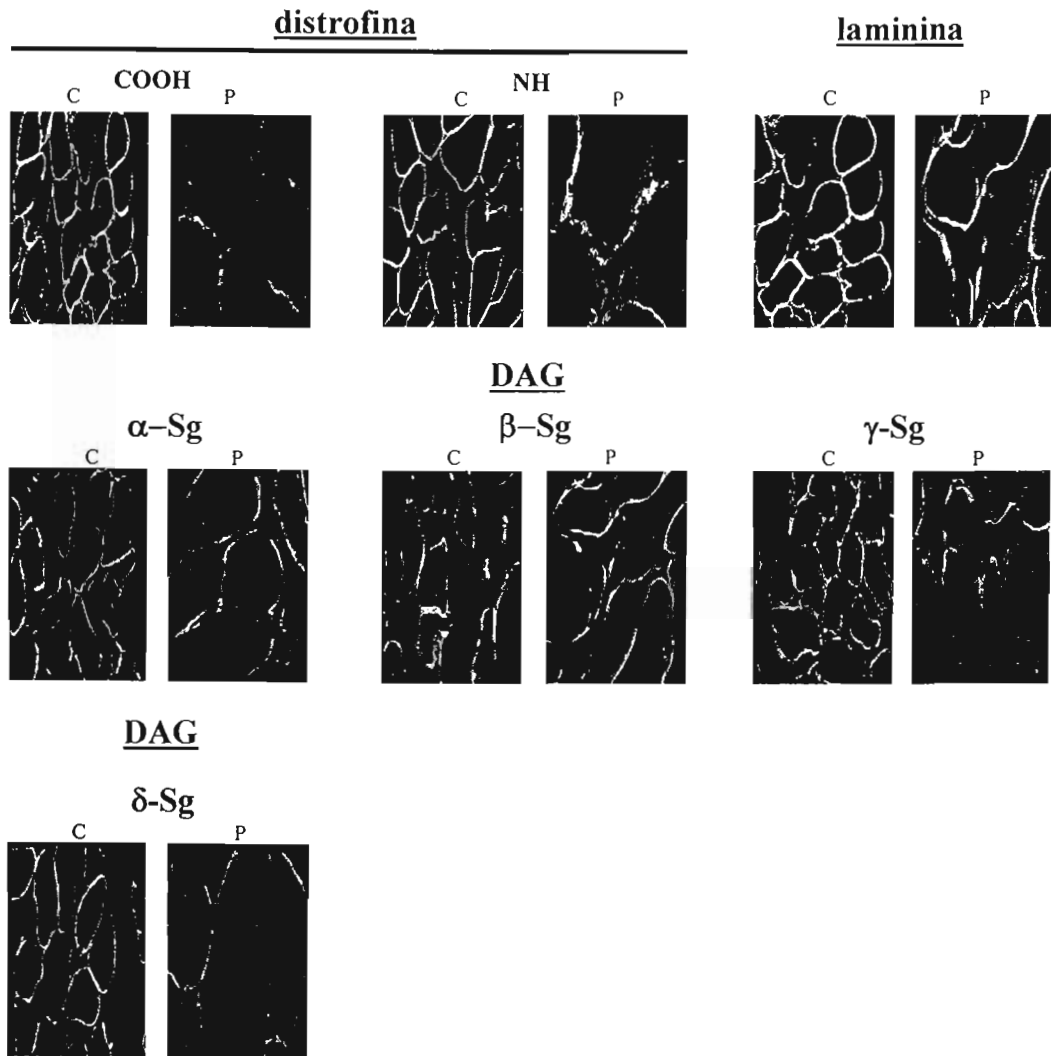


Figura 24. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 22. Varón de 29 años, con musculatura proximal y distal afectados, CPK 1086. Imágenes de inmunofluorescencia muestran que el extremo amino (NH) de la proteína distrofina se encuentra afectado, para el extremo carboxilo (COOH) en mayor proporción. Los sarcoglicanos α -, β -, γ - y δ - se encuentran normales, al igual que la tinción para la proteína laminina. C: músculo normal. P: músculo del paciente. Caso único en la familia.

Paciente 23

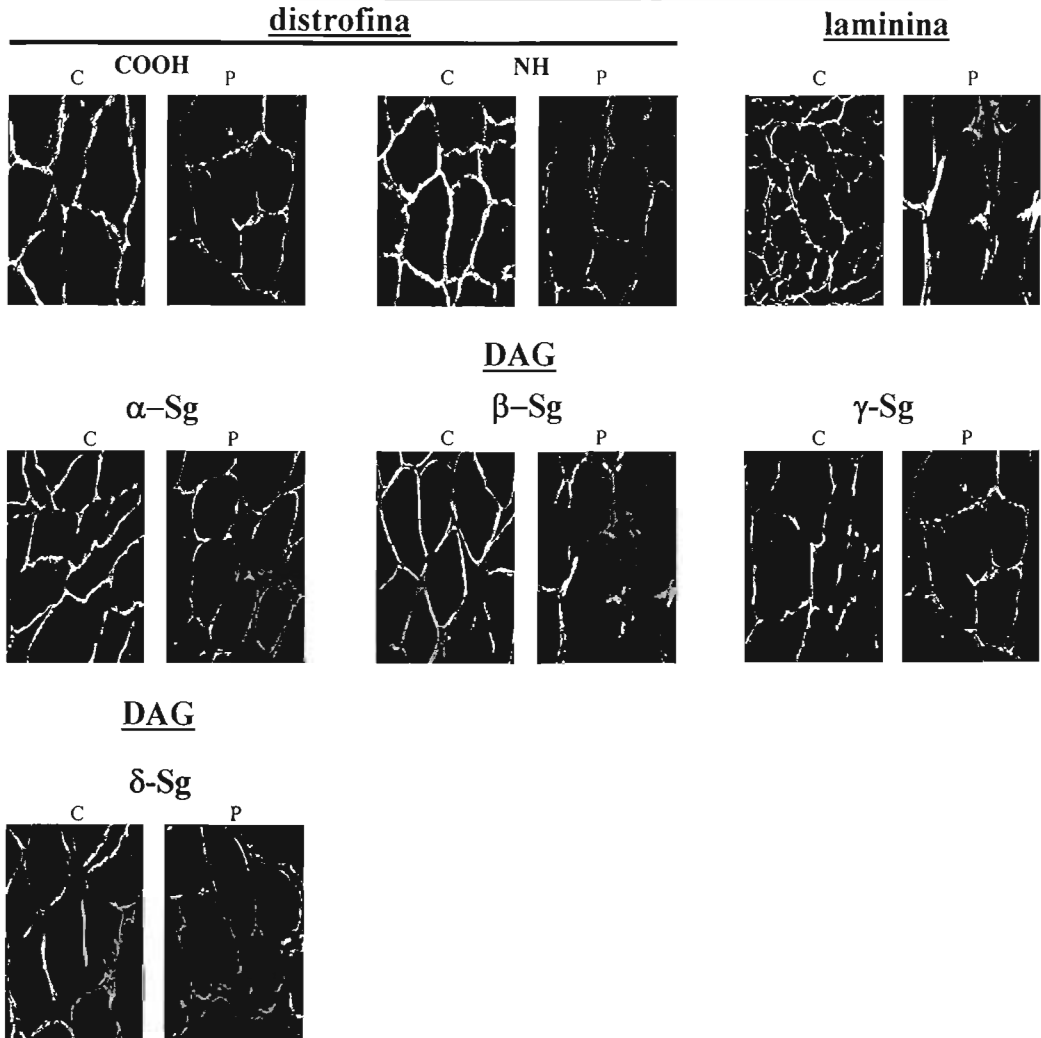


Figura 25. Inmunofluorescencia indirecta del paciente 23. Varón de 28 años de edad, con CPK de 286, sin consanguinidad, y musculatura proximal afectada. Imágenes de inmunofluorescencia muestran señal para las proteínas estudiadas α -, β -, γ y δ sarcoglicanos y laminina) excepto para los extremos amino (NH) y carboxilo de la proteína distrofina (COOH) que presentan disminución en la tinción. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

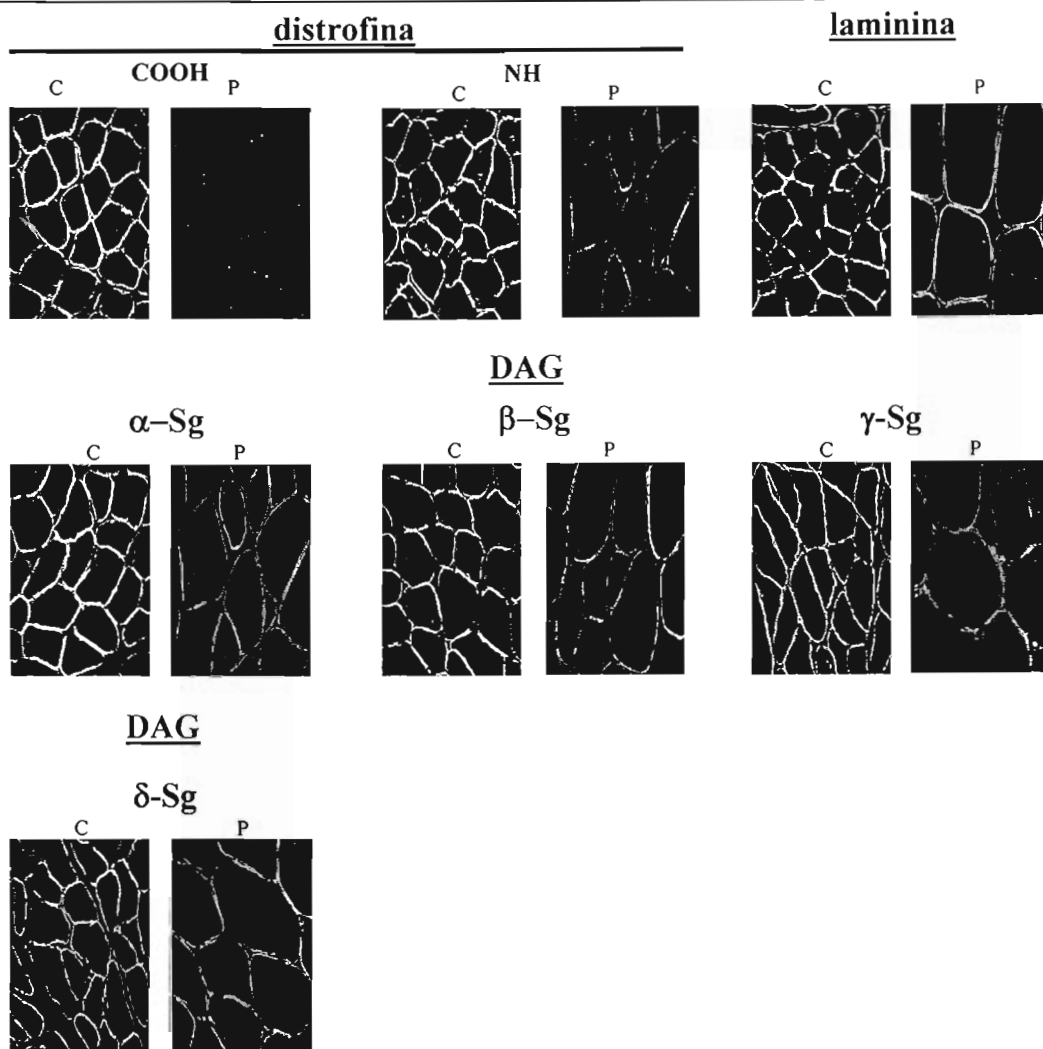


Figura 26. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 24. Varón de 15 años, sin consanguinidad, con progresión lenta de la enfermedad. Imágenes de inmunofluorescencia muestran deficiencia para distrofina en su extremo amino (NH) y ausencia en el extremo carboxilo (COOH) en contraste con la presencia de los sarcoglicanos α -, β -, γ -y δ al igual que laminina. C: músculo normal. P: músculo del paciente. Caso único en la familia.

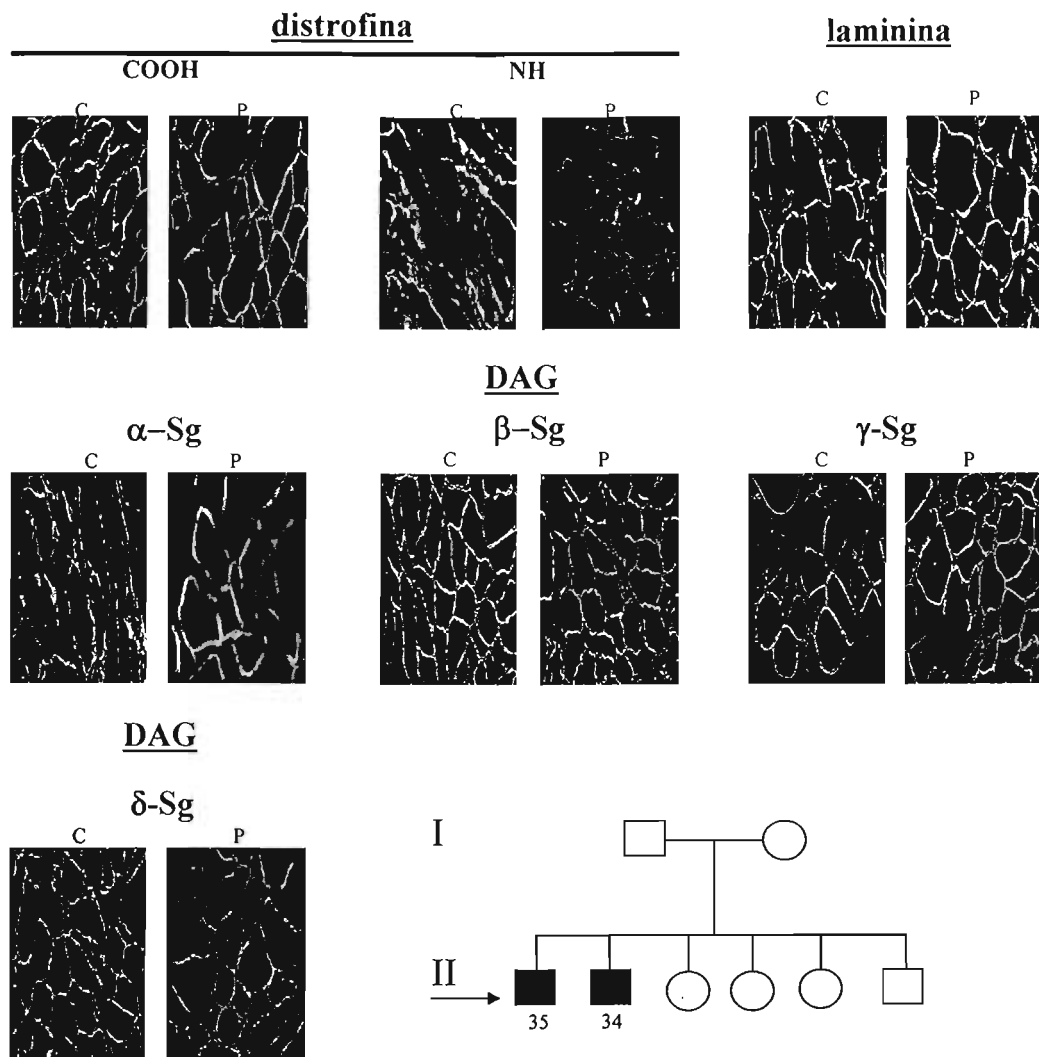


Figura 27. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 25. Varón de 35 años, CPK 162, con musculatura distal y proximal afectada, con progresión lenta de la enfermedad, con un hermano afectado. Imágenes de inmunofluorescencia muestran la presencia de todas las proteínas estudiadas (α -, β -, γ y δ sarcoglicanos y laminina) excepto para proteína distrofina en el extremo amino (NH) de la proteína, para el extremo carboxilo (COOH) se encuentra normal. C: músculo normal. P: músculo del paciente.

Pacientes con deficiencia en las proteínas sarcoglicanos

De los seis pacientes con deficiencia de las proteínas sarcoglicanos, cuatro son femeninos y las edades oscilan entre los 17 y los 54 años, la CPK es elevada, la musculatura involucrada no es específica de alguna región, la evolución de los pacientes es lenta en la mayoría de los casos (tabla 8).

Paciente	figuras	CPK	Musculatura afectada	Evolución de la enfermedad
26	28	N/D	P	Lenta
27	29	N/D	P y D	No determinada
28	30	1375	P	Lenta
29	31	N/D	D y P	Lenta
30	32	10370	P	Lenta
31	33	3691	P	Lenta

Tabla 8. Pacientes con deficiencia en las proteínas sarcoglicanos; columna uno número de pacientes; columna dos figuras; columna tres CPK (fosfoquinasa de creatinina); columna cuatro musculatura afectada P (proximal) y D (distal); columna cinco evolución de la enfermedad.

Los pacientes deficientes de las proteínas sarcoglicanos muestran resultados completamente diferentes entre sí. El paciente número 26 presenta ausencia de la proteína gama sarcoglicano, los sarcoglicanos β y δ con disminución al igual que en los extremos amino y carboxilo de distrofina, las pacientes 27 únicamente tiene deficiencia en beta sarcoglicano. El paciente 28 presenta las cuatro proteínas sarcoglicanos con deficiencia pero, con una marcada deficiencia en la proteína alfa sarcoglicano. El paciente 29 sólo se encontró deficiencia de alfa sarcoglicano. El paciente 30 presenta deficiencia en alfa y gama sarcoglicano a diferencia del paciente 31 que sólo presentó deficiencia acentuada en delta sarcoglicano (Tabla 9).

No de paciente	Edad	Genero	α -SG	β -SG	γ -SG	δ -SG
26	17	M	+++	++	-	++
27	34	F	+++	+	+++	+++
28	54	F	+	++	++	++
29	25	F	+	+++	+++	+++
30	18	F	++	+++	++	+++
31	31	M	+++	+++	+++	+

Tabla 9. Expresión de sarcoglicanos en pacientes deficientes de estas proteínas , columna uno número de paciente; columna dos edad en años; columna tres género M (masculino) y F (femenino); columnas cuatro, cinco, seis y siete, expresión de sarcoglicanos, (-) ausente, Tres cruces inmunofluorescencia normal(+++), Dos cruces señal de inmunofluorescencia bajo (++), Una cruz, señal de inmunofluorescencia escasa (+).

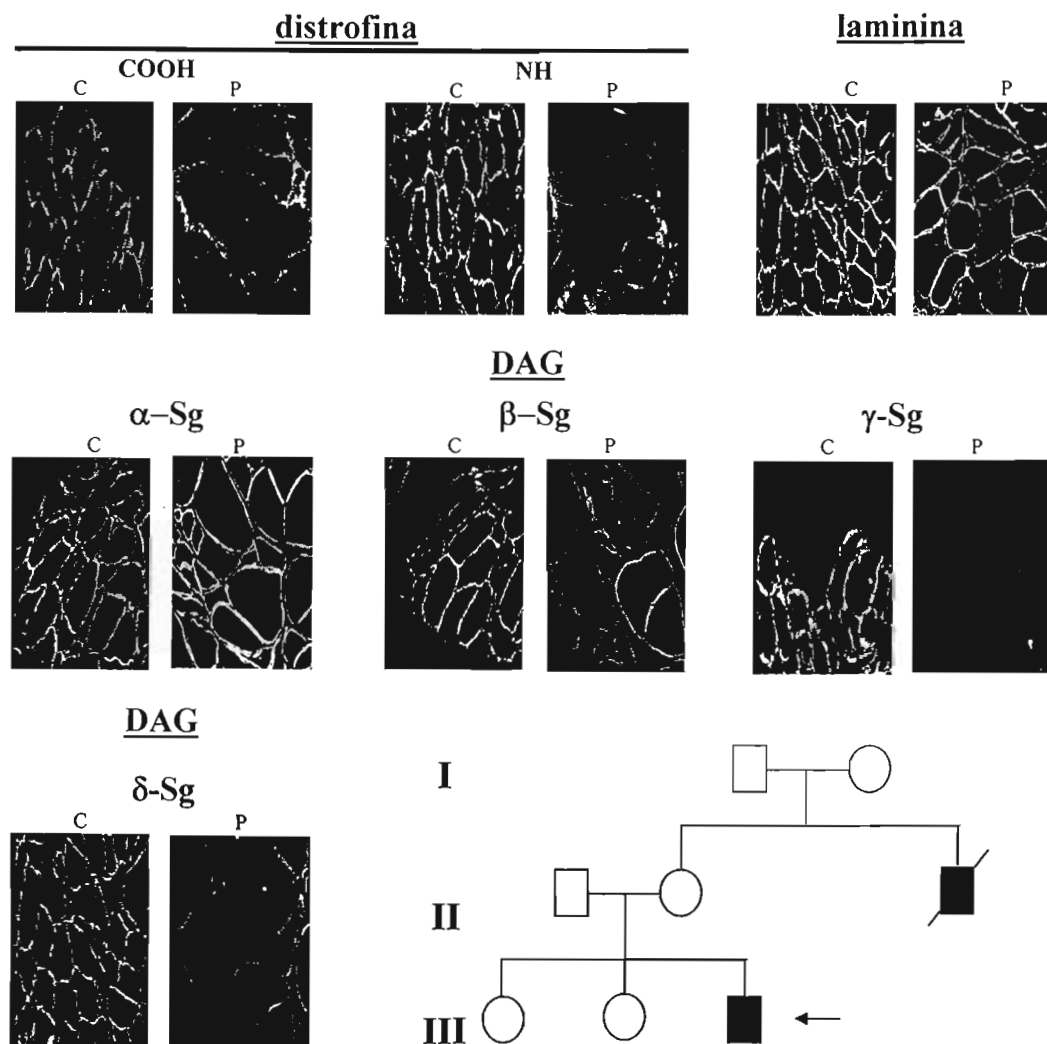
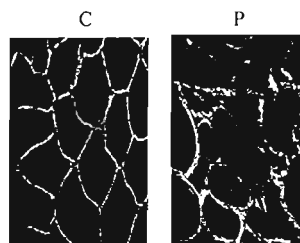
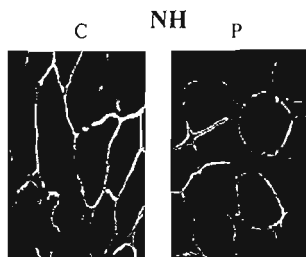
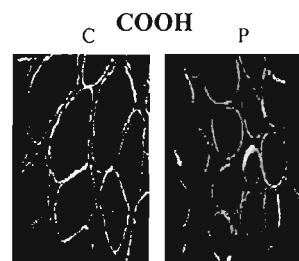


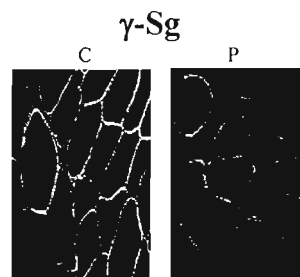
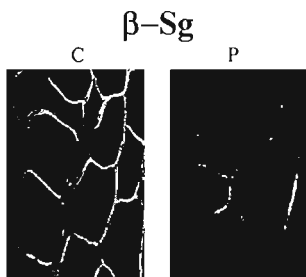
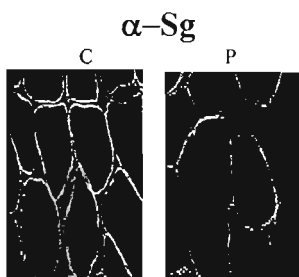
Figura 28. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 26. Varón de 17 años, con musculatura proximal afectada con evolución lenta de la enfermedad, Imágenes de inmunofluorescencia muestran normales a todas las proteínas, distrofina extremo amino (NH) y carboxilo (COOH), laminina y alfa (α) sarcoglicano, en comparación con beta (β) al y delta (δ) sarcoglicanos que se encuentran disminuidos, finalmente gama (γ) sarcoglicano que se encuentra ausente de tinción. El árbol genealógico muestra antecedentes de una generación anterior. C: músculo normal. P: músculo del paciente.

distrofina

laminina



DAG



DAG

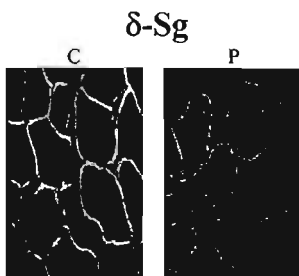


Figura 29. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 27. Femenino de 34 años. Imágenes de inmunofluorescencia muestran a la proteína distrofina extremo amino (NH) y extremo carboxilo (COOH) con tinción normal al igual que laminina, a diferencia de la proteína beta (β) sarcoglicano que se encuentra deficiente, alfa (α), delta(δ) y gama (γ) sarcoglicanos con tinción normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

distrofina

laminina

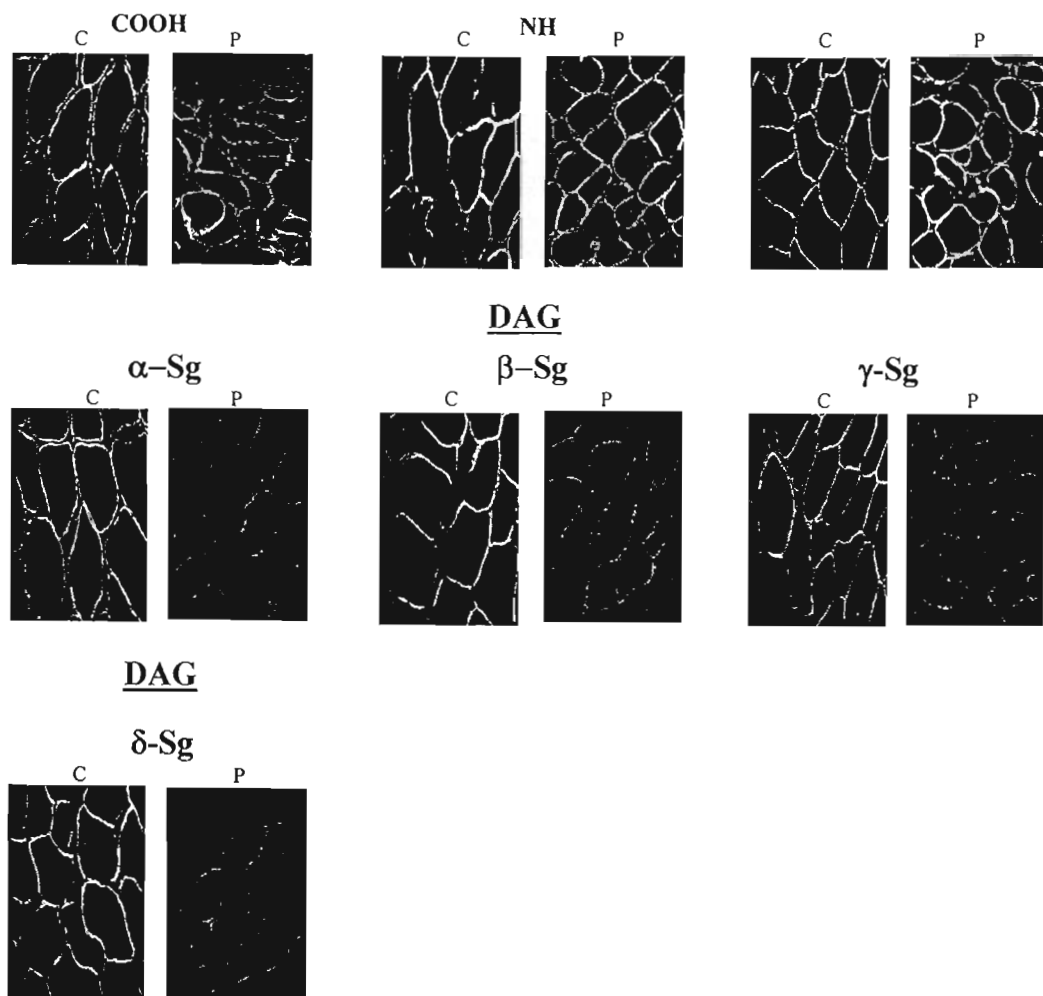
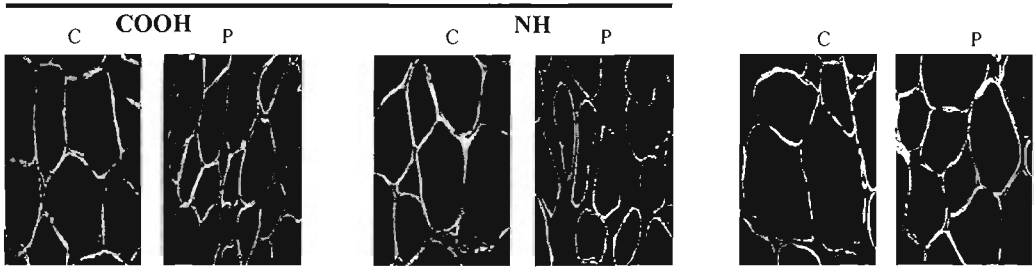


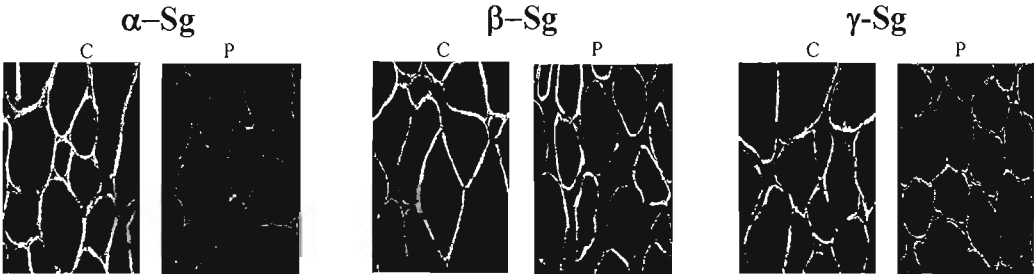
Figura 30. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 28. Femenino de 54 años de edad, CPK 1375, con musculatura proximal afectada, con evolución lenta de la enfermedad. Imágenes de inmunofluorescencia muestran a las proteína distrofina extremo amino (NH) y extremo carboxilo (COOH) con tinción normal al igual que laminina, para las proteínas sarcoglicanos deficientes en beta (β), delta (δ) y gama (γ) sarcoglicanos, con mayor deficiencia en alfa (α) sarcoglicano. C: músculo normal. P: músculo del paciente. Caso único en la familia

distrofina

laminina



DAG



DAG

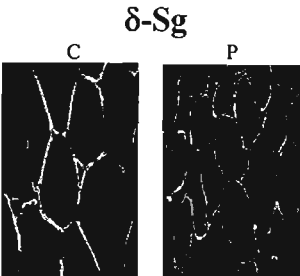
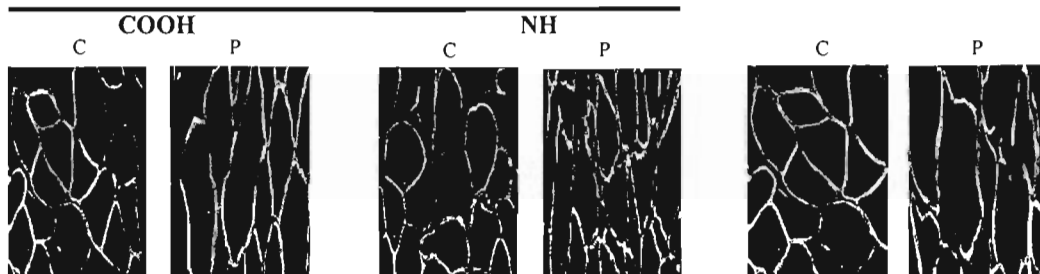


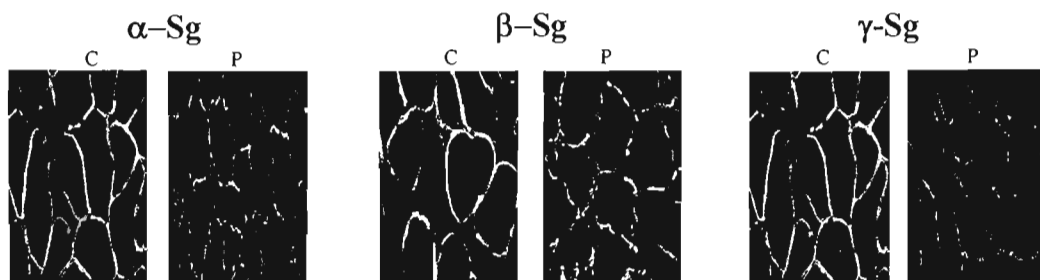
Figura 31. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 29. Femenino de 25 años, con musculatura distal y proximal afectada, con evolución lenta de la enfermedad. Imágenes de inmunofluorescencia muestran para la proteína distrofina extremo amino (NH) y carboxilo (COOH), laminina, -β, -γ y -δ sarcoglicanos con tinción normal, en contraste con α-sarcoglicano que se encuentra deficiente. C: músculo normal. P: músculo del paciente. Caso único en la familia.

distrofina

laminina



DAG



DAG

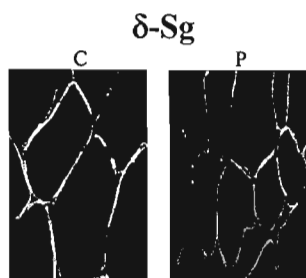


Figura 32. Inmunofluorescencia indirecta del paciente 30. Femenino de 18 años, CPK de 10370, con musculatura proximal afectada y evolución lenta de la enfermedad. Imágenes de inmunofluorescencia muestran la proteína distrofina extremo amino (NH) y extremo carboxilo (COOH), laminina, beta (β) y delta (δ) sarcoglicanos se encuentran con tinción normal, en contraste con alfa (α) y gama (γ) sarcoglicanos que se encuentran disminuida su tinción. C: músculo normal. P: músculo del paciente. Caso único en la familia.

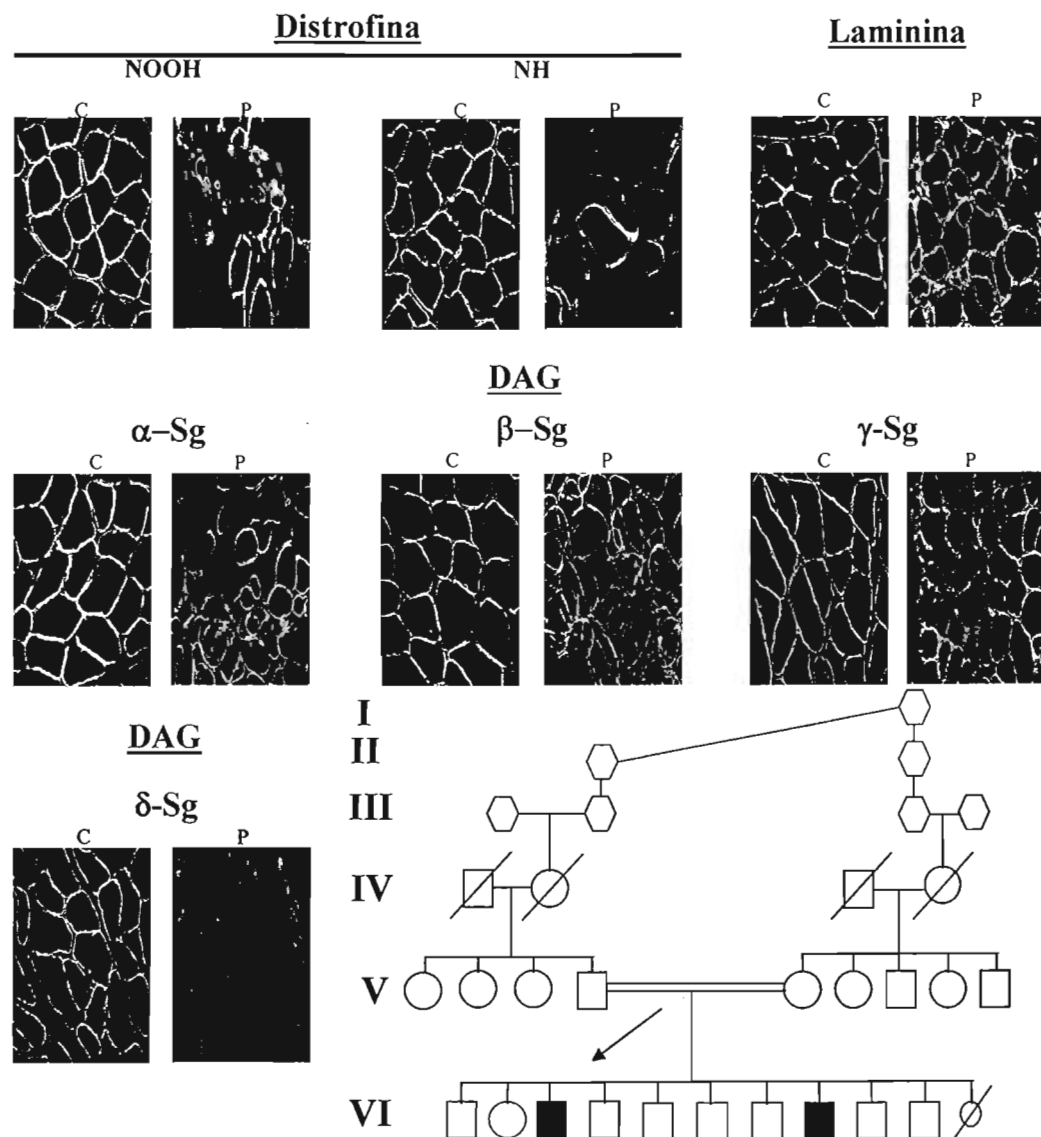


Figura 33. Inmunofluorescencia indirecta del paciente 31. Varón de 31 años, CPK 3691, con musculatura proximal afectada, evolución lenta de la enfermedad, con existencia de consanguinidad. Imágenes de inmunofluorescencia muestran la presencia normal de todas las proteínas estudiadas α -, β -y γ -sarcoglicanos, excepto para delta (δ) sarcoglicano que se encuentra disminuida la tinción. P: músculo del paciente. C: músculo normal.

Pacientes en los que no se encontró deficiencia para las proteínas estudiadas.

De los 36 pacientes incluidos en este apartado, 19 son masculinos y 17 femeninos la edad varía desde ocho meses hasta los 45 años, los datos de CPK siempre fueron elevados por encima de lo normal, la musculatura involucrada fué tanto proximal como distal, la evolución de la enfermedad se registra entre lenta y moderada, la consanguinidad sólo se presentó en el paciente 52, también se registraron los pacientes 63 y 65 con antecedentes de distrofia muscular. El diagnóstico final de los pacientes con presencia de todas las proteínas estudiadas no se ha podido concluir, debido a que no se cuenta con los anticuerpos específicos para otras proteínas involucradas con distrofia muscular (Tabla 10).

Paciente/ Figura	edad	Género	CPK (U/L)	Musculatura afectada	Progresión	Consanguinidad	Diagnóstico previo
32-34	8/12	F	Alta	D/P	lenta	no	Hipotonía
33-35	22	F	493	P	lenta	no	Distrofia
34-36	2	F	258	D/P	No D	No D	Distrofia
35-37	25	M	elevada	D/P	lenta	No D	Miyoshi
36-38	29	M	362	D	lenta	no	cinturas
37-39	35	M	162	P/D	lenta	no	Becker
38-40	8	F	137	P/D	No D	no	Cinturas
39-41	20	F	No D	?	No D	No D	Cinturas
40-42	8	F	979	P	Lenta	No	Distrofia
41-43	14	M	43	P	lenta	no	Miotónica
42-44	4	M	369	P	Moderada	No	Congénita
43-45	45	M	No D	P	lenta	no	Cinturas
44-46	29	M	10630	P	lenta	no	Cinturas
45-47	33	F	90	P	lenta	No	Cinturas
46-48	29	F	1115	P/D	Moderada	NO	Cintura
47-49	9	F	284	D/P	lenta	no	DMD
48-50	10	M	635	P/D	lenta	no	DMD
49-51	29	F	1115	P	Moderada	no	Cinturas
50-52	7	F	7273	P/D	No D	No D	miopatía
51-53	21	M	11674	P	Lenta	no	cintura
52-54	17	M	290	P	Lenta	no	distrofia
53-55	6	M	7293	No D	No D	No D	congénita
54-56	22	F	1358	P	lenta	si	Disferlinopatía

55-57	7	F	37	P	lenta	No D	DMB
56-58	33	M	1277	P/D	lenta	No	Cinturas
57-59	19	F	No D	P	lenta	No	Disferlinopatia
58-60	22	F	4600	D	lenta	No	cinturas
59-61	7	M	1569	P	lenta	No D	DMD
60-62	3	M	NO D	P	lenta	No D	DMD
61-63	29	M	1093	P / D	lenta	No	Distrofia cinturas
62-64	29	M	185	P/D	lenta	No	Distrofia
63-65	1	M	198	P/D	Moderada	No	DMD
64-66	43	M	2800	P	lenta	No	Distrofia miotonica
65-67	3	F	509	P/D	lenta	No	distrofia
66-68	6	M	390	P	Moderada	NO	DMD
67-69	22	F	6727	P/D	Moderada	No	Cintura

Tabla 10. Pacientes con presencia de todas las proteínas; columna uno, número de paciente; columna dos, edad en años; columna tres genero; columna cuatro, CPK (fosfocinasa de creatinina); columna cinco, musculatura afectada P (proximal) y D (distal); columna seis; progresión de la enfermedad; columna siete, consanguinidad ND (no determinada); columna ocho, diagnóstico previo.

Distrofina

Laminina

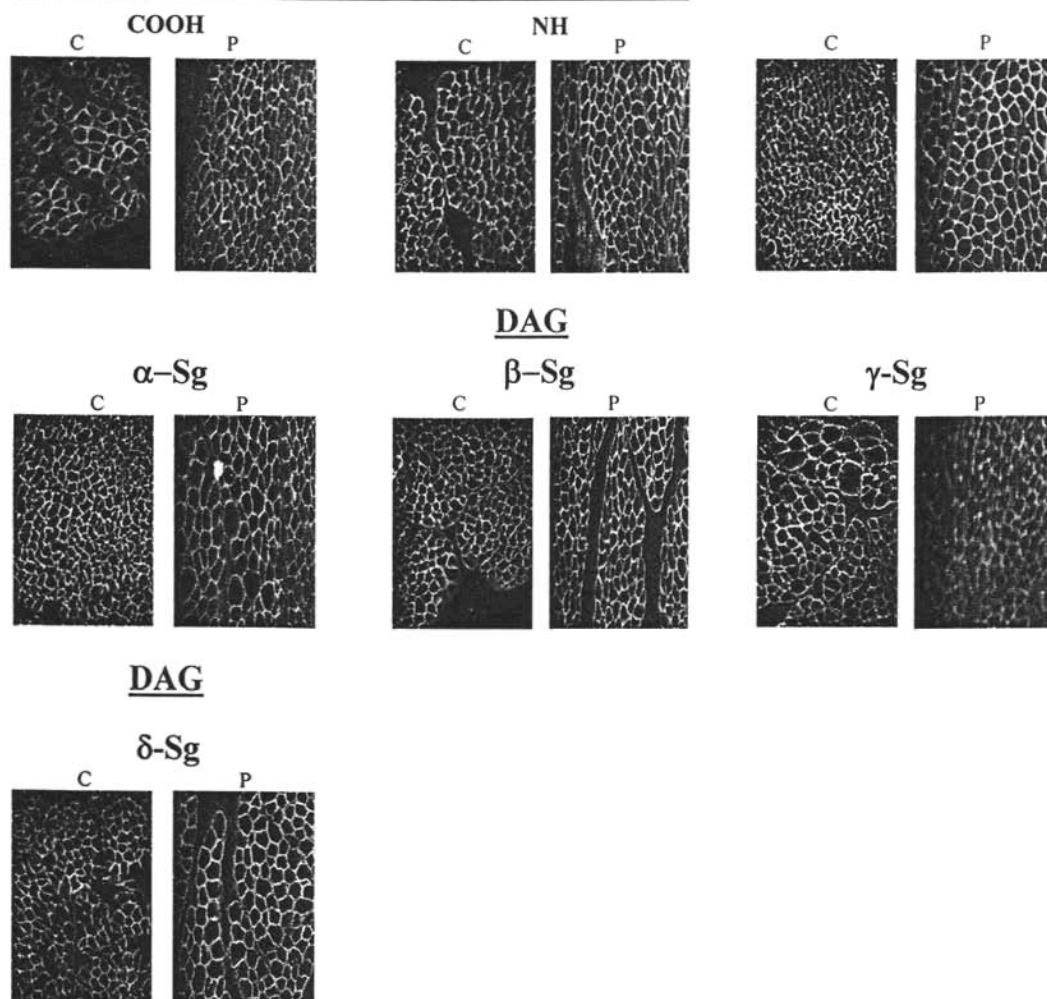


Figura 34. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 32. Femenino de 8 meses de edad, musculatura involucrada distal y proximal, con evolución rápida de la enfermedad. Imágenes de inmunofluorescencia muestran a todas las proteínas α -, β -, γ y δ sarcoglicanos, distrofina extremo amino (NH) y carboxilo (COOH) y laminina con tinciones normales. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

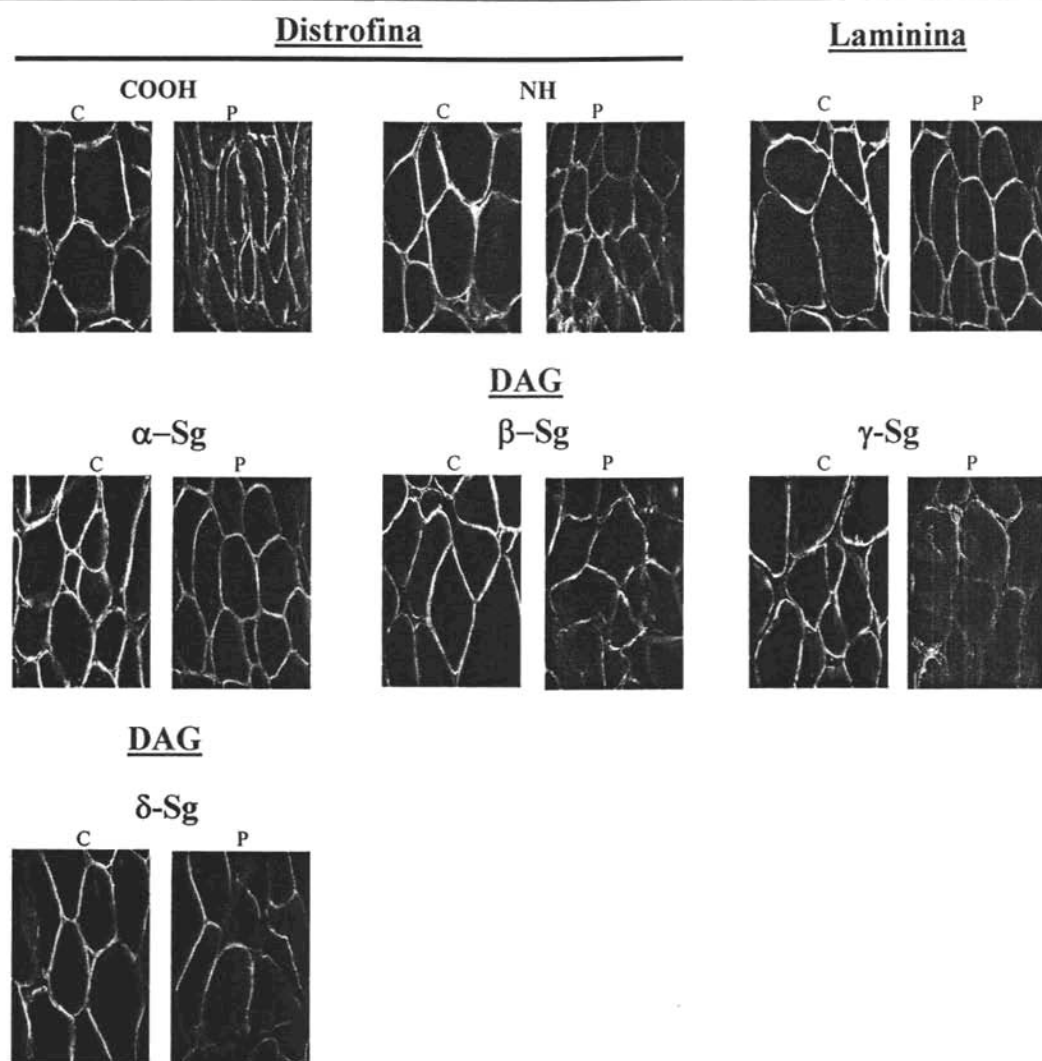
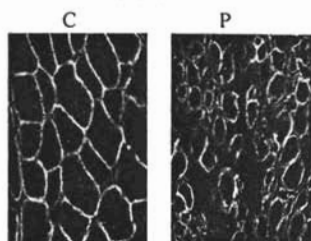


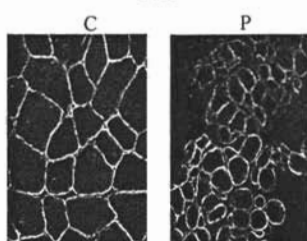
Figura 35. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 33. Femenino de 22 años, con musculatura proximal afectada, CPK de 943. Imágenes de inmunofluorescencia muestran los extremos de la proteína amino (NH) y carboxilo (COOH) distrofina normal, para los sarcoglicanos α -, β -, δ y γ la tinción es normal, al igual que para la proteína laminina. Ausente para la proteína disferlina (resultado no mostrado). C: músculo normal. P: músculo del paciente. Caso único en la familia.

Distrofina

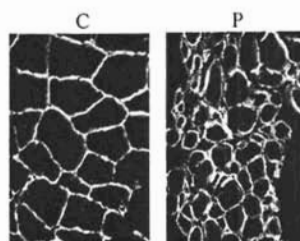
COOH



NH

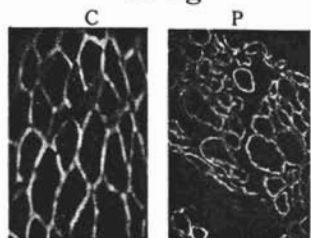


Laminina

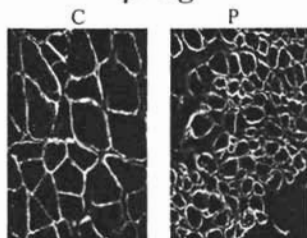


DAG

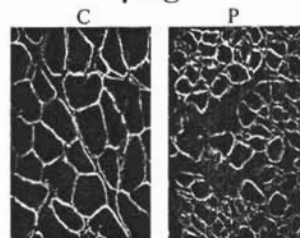
α -Sg



β -Sg



γ -Sg



DAG

δ -Sg

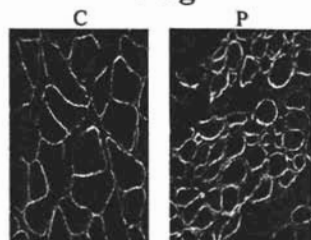


Figura 36. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 34. Femenino de dos años, con musculatura distal y proximal afectada, CPK de 258, Imágenes de inmunofluorescencia muestran que la proteína distrofina se presenta normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), al igual para los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ -, para la proteína laminina la tinción es normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

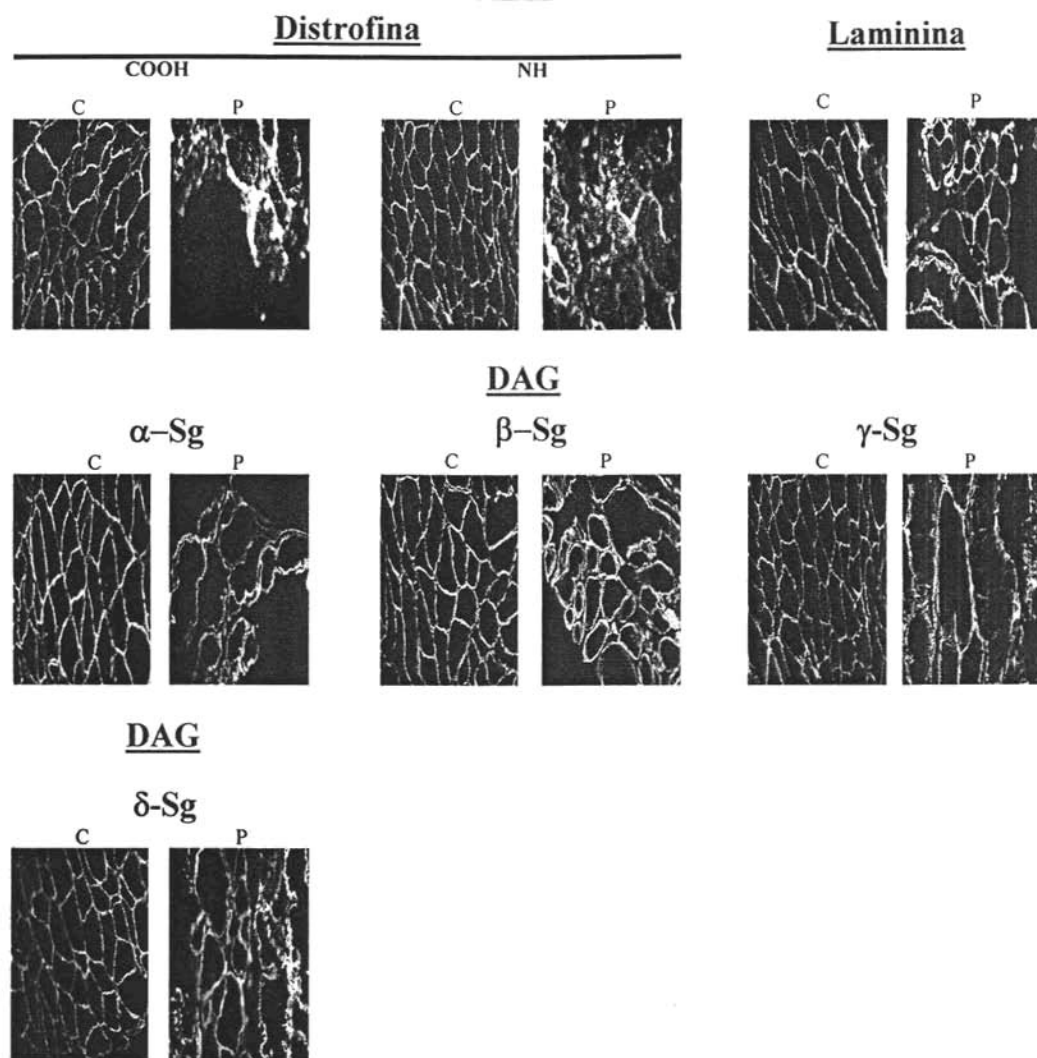


Figura 37. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 35. Varón de 25 años, con CPK elevada, musculatura involucrada distal y proximal, con progresión lenta de la enfermedad. Imágenes de inmunofluorescencia muestran la presencia de todas las proteínas estudiadas, distrofina extremos amino (NH) y carboxilo (COOH) de la proteína, al igual para los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ -, para la proteína laminina la tinción es normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

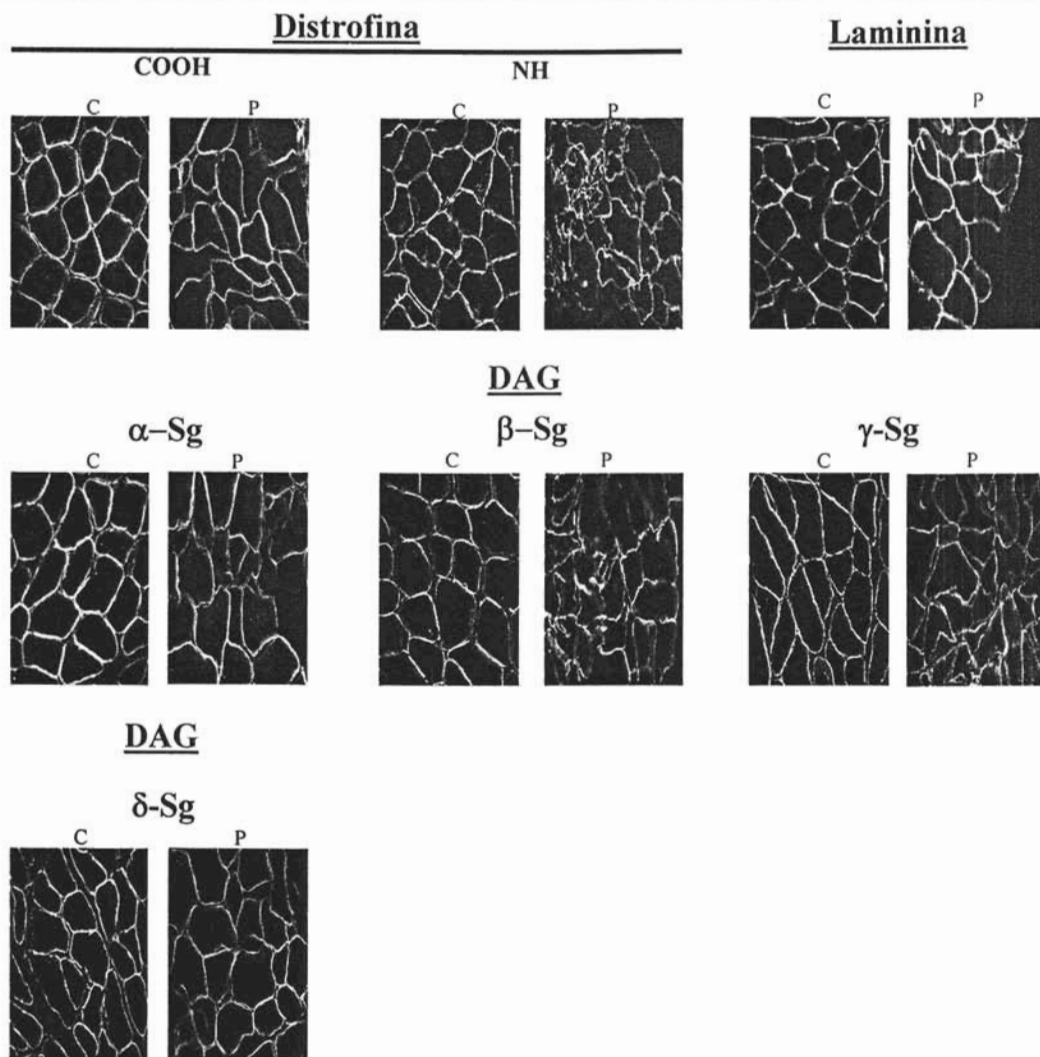


Figura 38. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 36. Varón de 29 años, CPK de 362, con musculatura involucrada distal, con progresión de la enfermedad lenta. Imágenes de inmunofluorescencia muestran que la proteína distrofina se presenta normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), al igual para los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ -, para la proteína laminina la tinción es normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

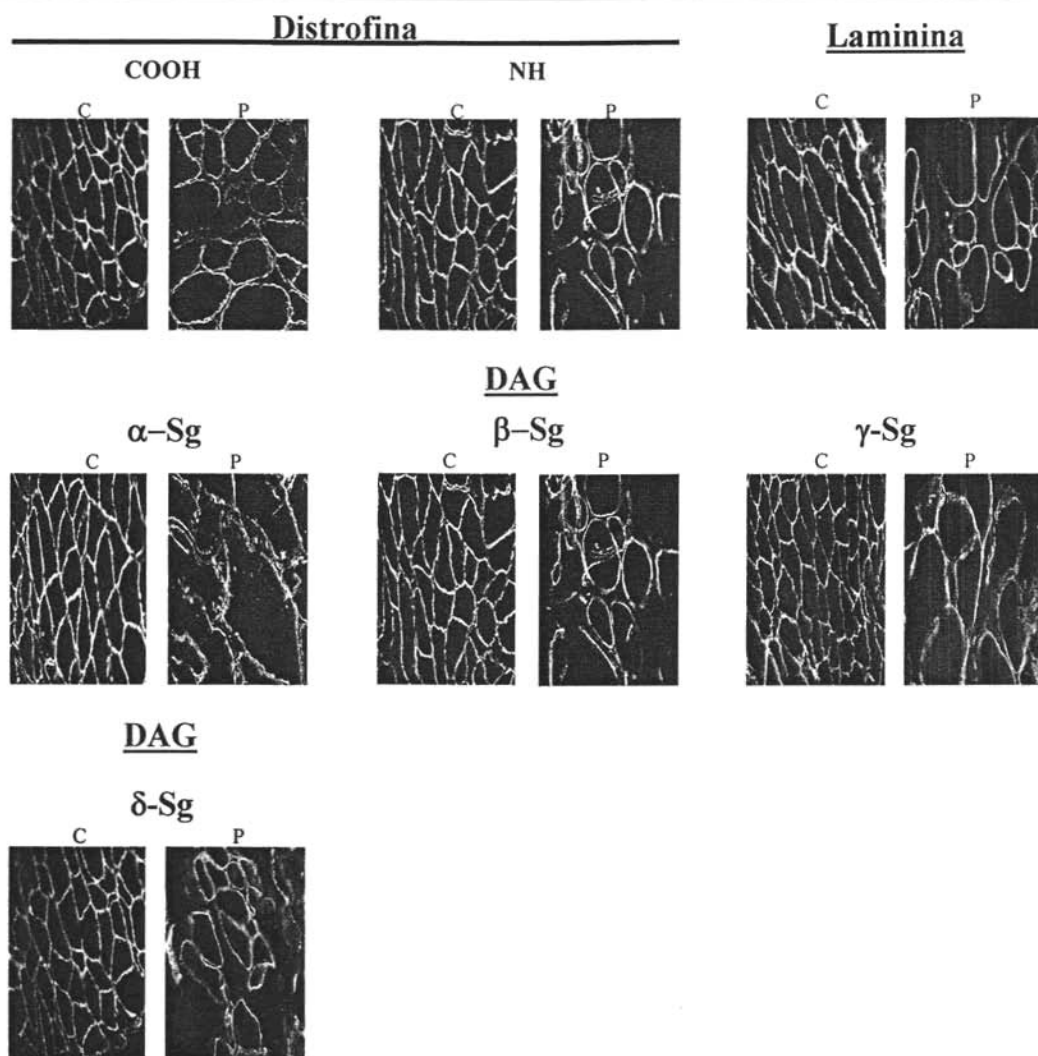


Figura 39. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 37. Varón de 9 años, CPK 867, musculatura involucrada proximal, con progresión lenta de la enfermedad, sin consanguinidad. Imágenes de inmunofluorescencia muestran que la proteína distrofina se presenta normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), al igual para los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ -, para la proteína laminina la tinción es normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

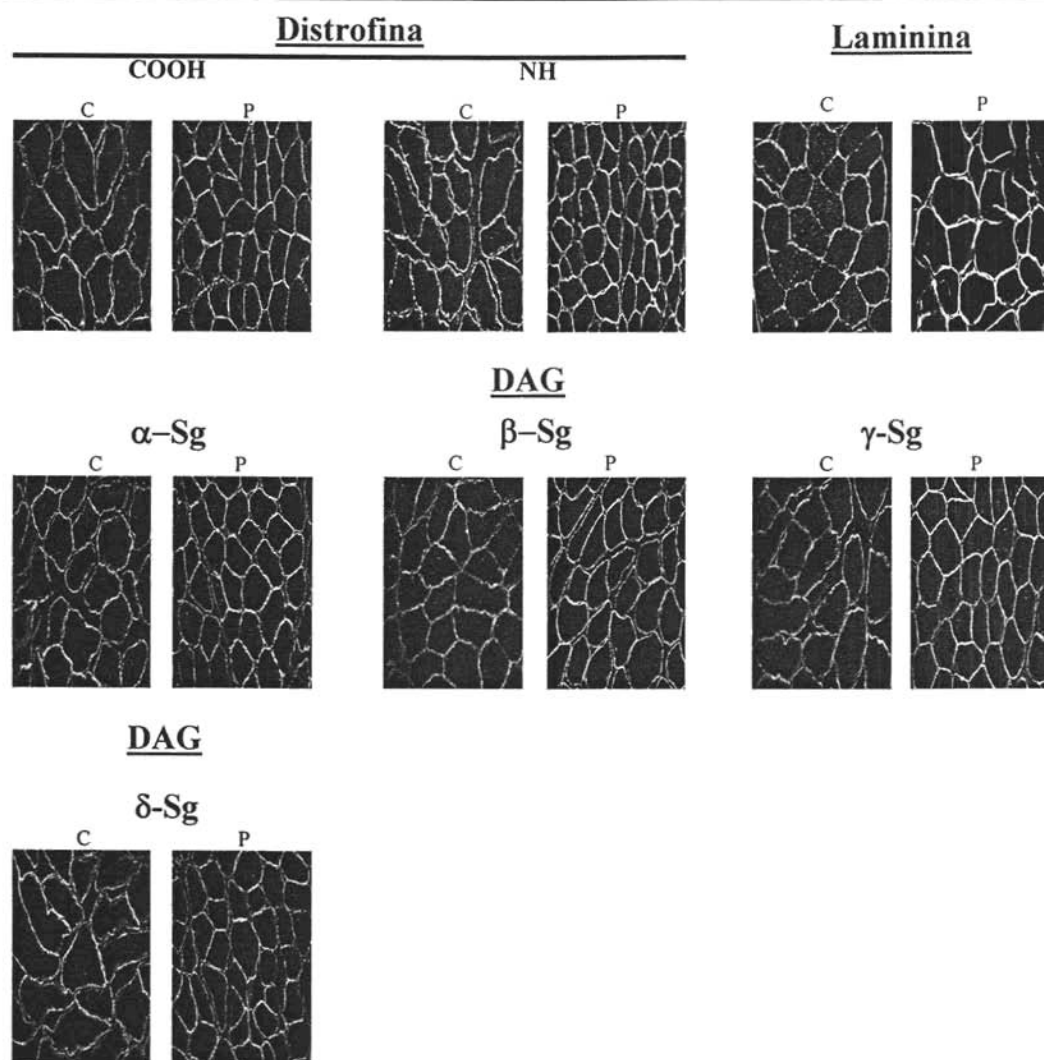


Figura 40. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 38. Femenino de 8 años, CPK 137, con musculatura distal y proximal afectada, con progresión lenta de la enfermedad, sin consanguinidad. Imágenes de inmunofluorescencia muestran que la proteína distrofina se presenta normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), al igual para los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ -, para la proteína laminina la tinción es normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

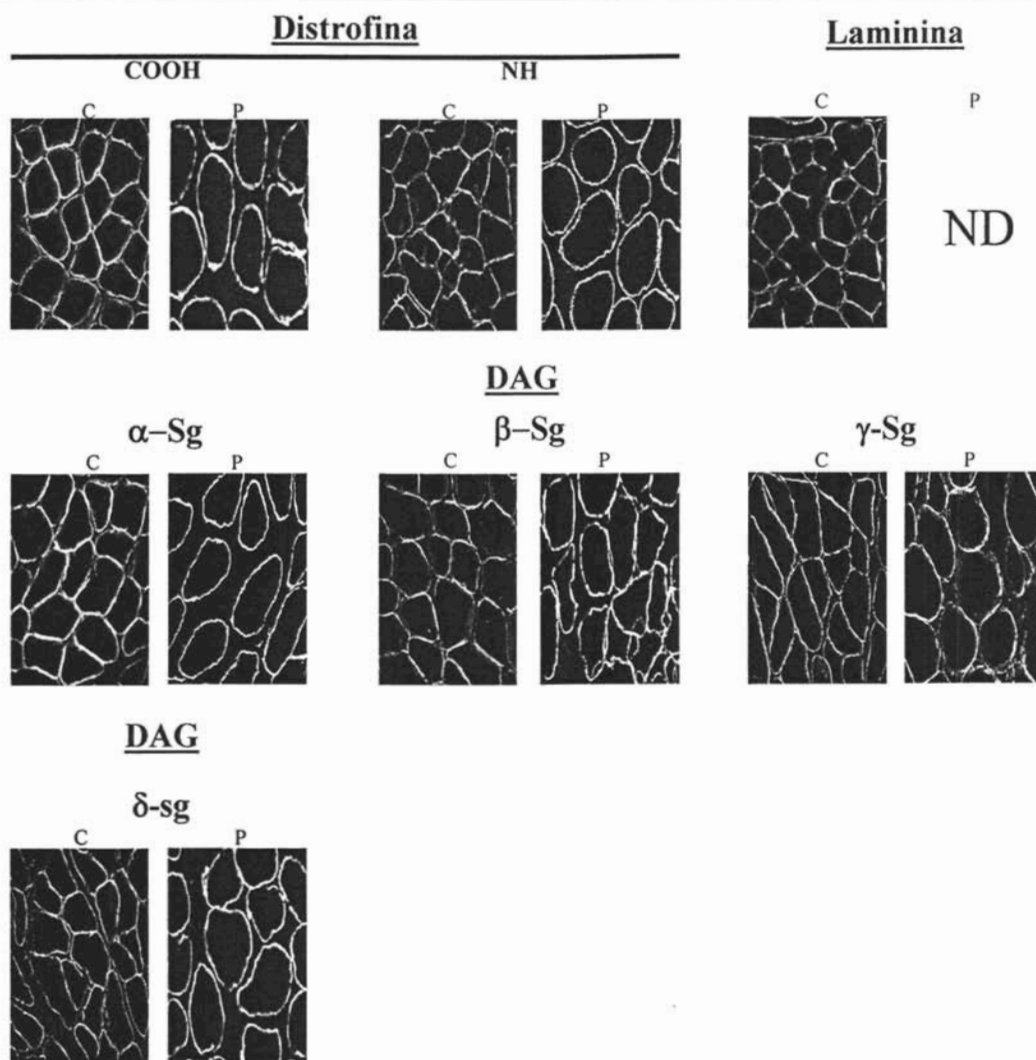
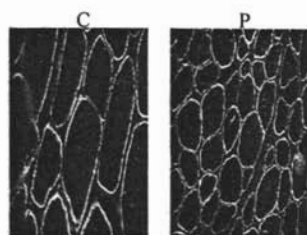


Figura 41. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 39. Femenino de 20 años. Imágenes de inmunofluorescencia muestran que la proteína distrofina se presenta normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), al igual para los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ -, excepto para laminina que no fue determinada. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

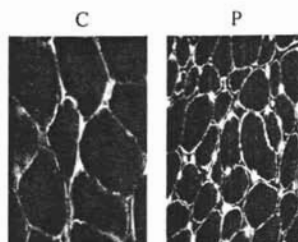
Distrofina

COOH

NH



Laminina

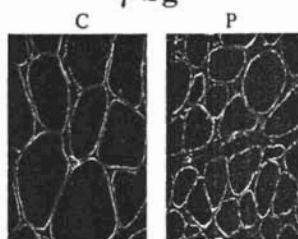
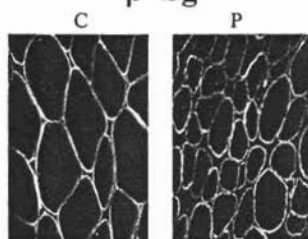
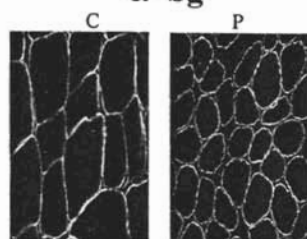


DAG

α -Sg

β -Sg

γ -Sg



DAG

δ -Sg

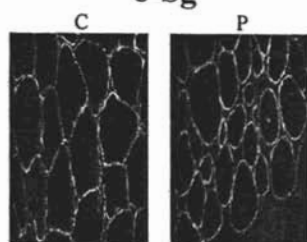


Figura 42. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 40. Femenino de 8 años, con debilidad proximal, progresión lenta de la enfermedad, CPK 509, sin consanguinidad. Imágenes de inmunofluorescencia muestran a la proteína distrofina normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), al igual para los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ -, para la proteína laminina la tinción es normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

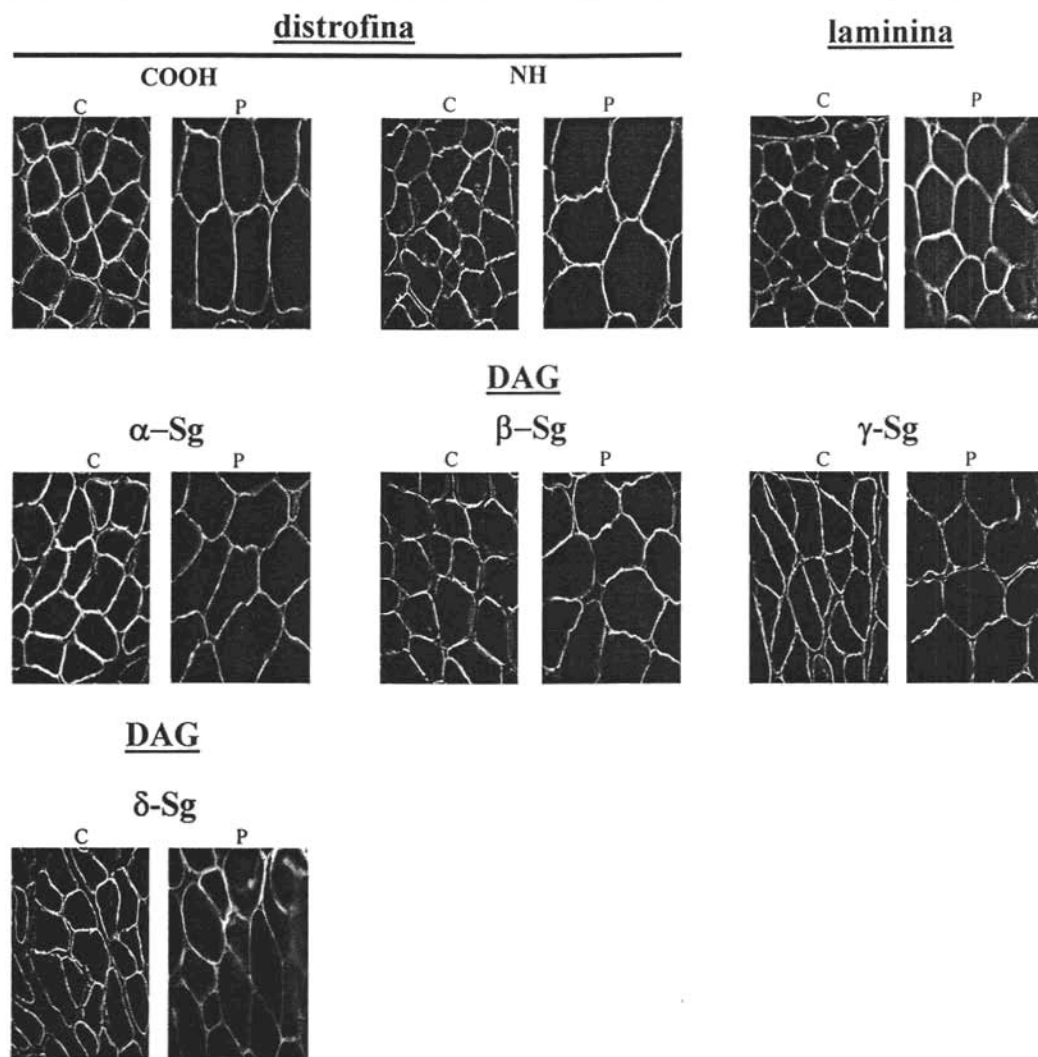


Figura 43. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 41. Varón de 14 años, con CPK normal, musculatura proximal afectada, con progresión lenta de la enfermedad, sin consanguinidad. Imágenes de inmunofluorescencia de la proteína distrofina se observa normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), al igual para los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ , para la proteína laminina la tinción es normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

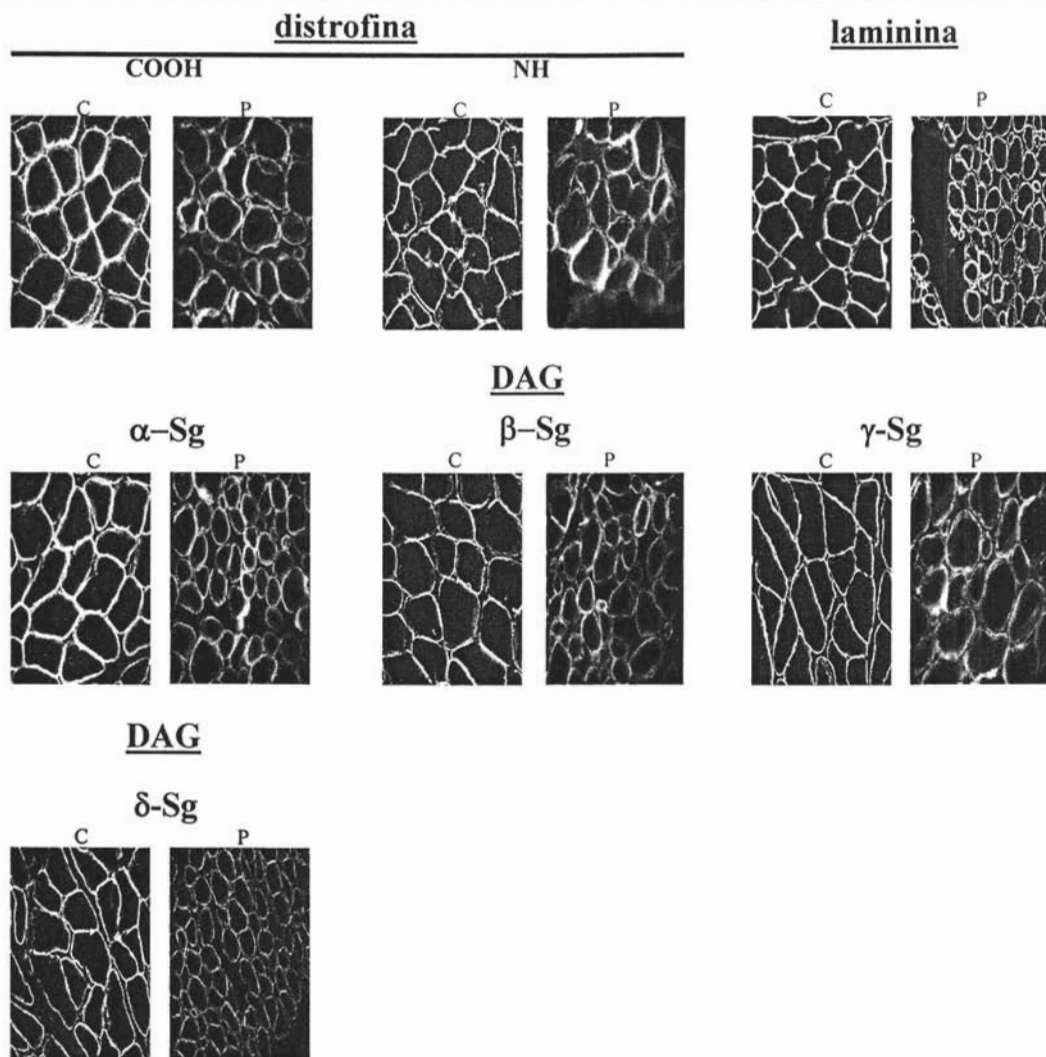


Figura 44. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 42. Varón de 4 años, CPK 369, musculatura proximal afectada, evolución de la enfermedad moderada, sin consanguinidad. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran a la proteína distrofina normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), para los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ la tinción es normal, para la proteína laminina se presenta normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

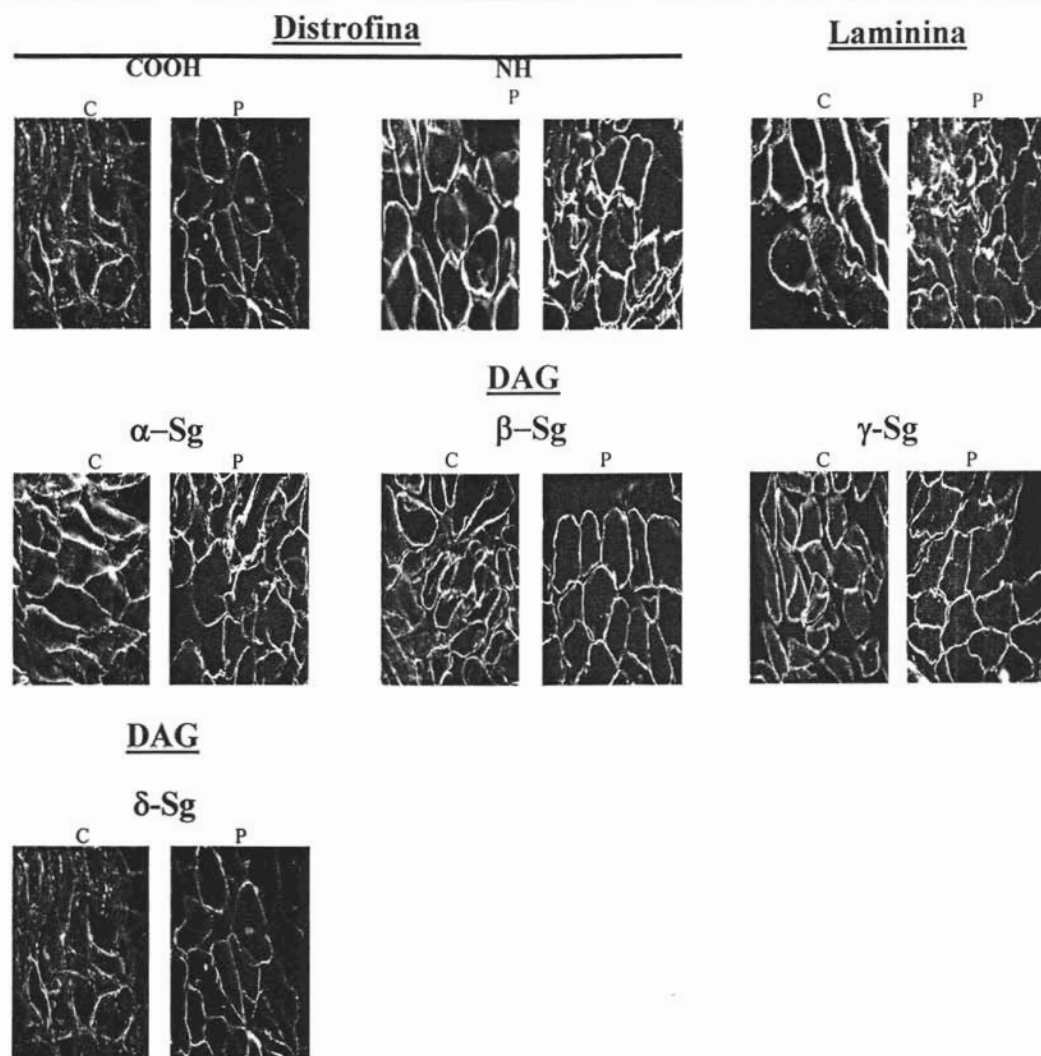
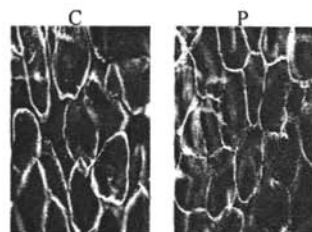


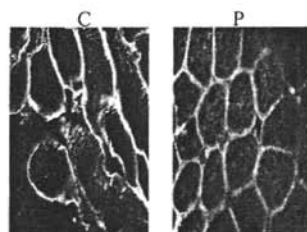
Figura 45. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 43. Varón de 45 años, musculatura proximal afectada, evolución de la enfermedad lenta, sin consanguinidad. Imágenes de inmunofluorescencia muestran la proteína distrofina normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), para los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ la tinción es normal, para la proteína laminina se presenta normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

Distrofina

COOH



NH



Laminina

C

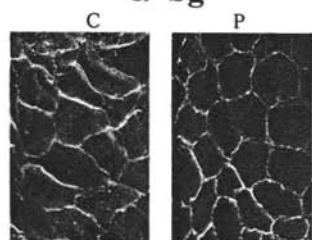


P

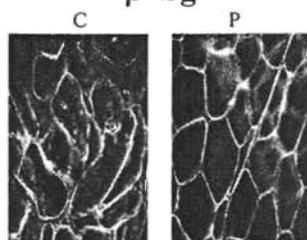


DAG

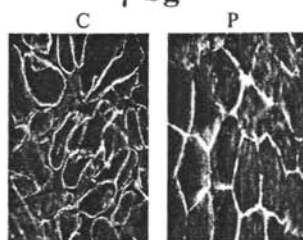
α -Sg



β -Sg



γ -Sg



DAG

δ -Sg

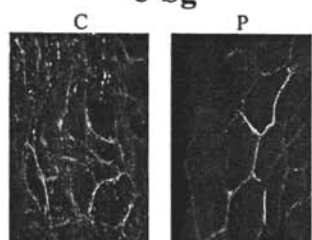


Figura 46. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 44, Varón de 29 años, con CPK de 10630, con musculatura proximal afectada, evolución de la enfermedad lenta, sin consanguinidad. Imágenes de inmunofluorescencia muestran a la proteína distrofina normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), para los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ la tinción es normal, para la proteína laminina se presenta normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

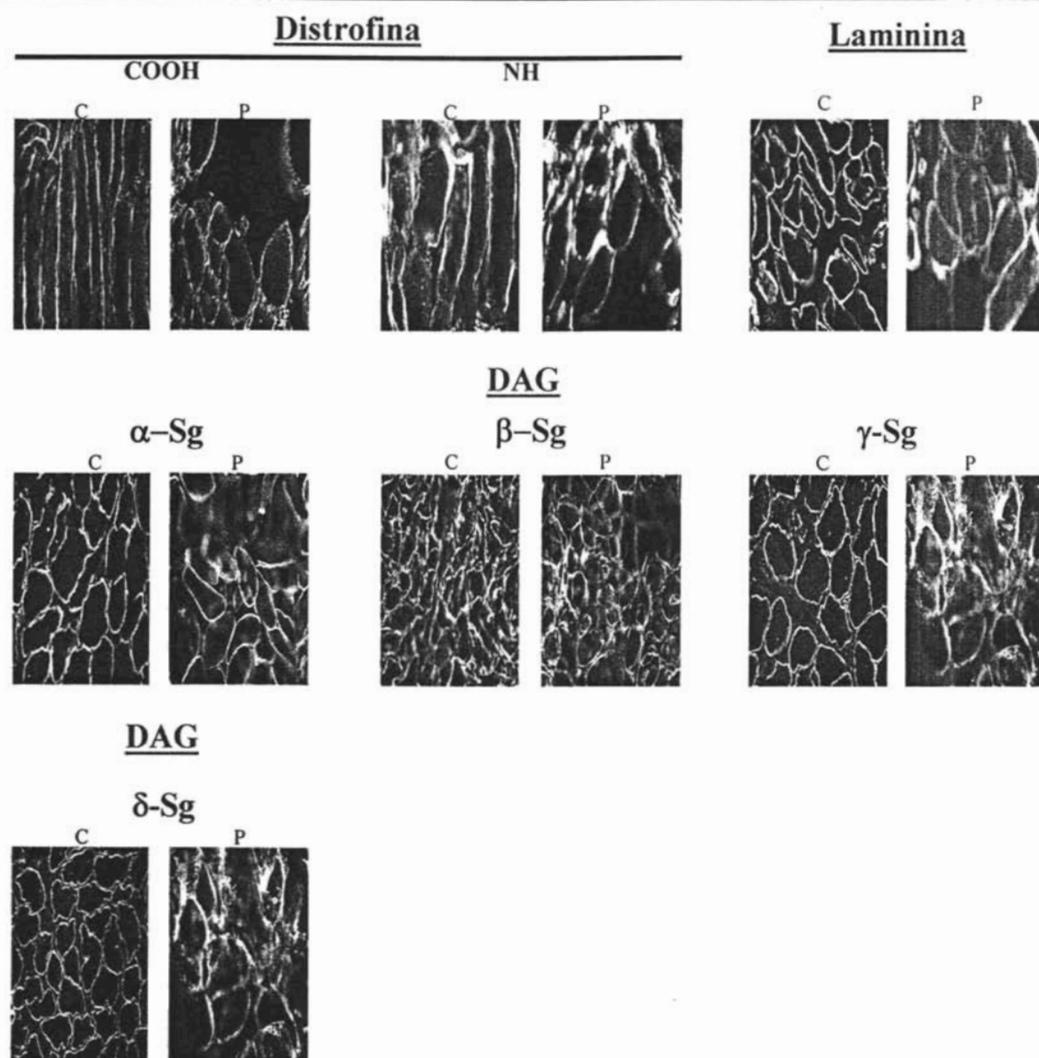


Figura 47. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 45. Femenino de 33 años, CPK de 90, con musculatura proximal afectada, evolución lenta de la enfermedad y sin consanguinidad. Imágenes de inmunofluorescencia muestran a la proteína distrofina normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), para los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ la tinción es normal, para la proteína laminina se presenta normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

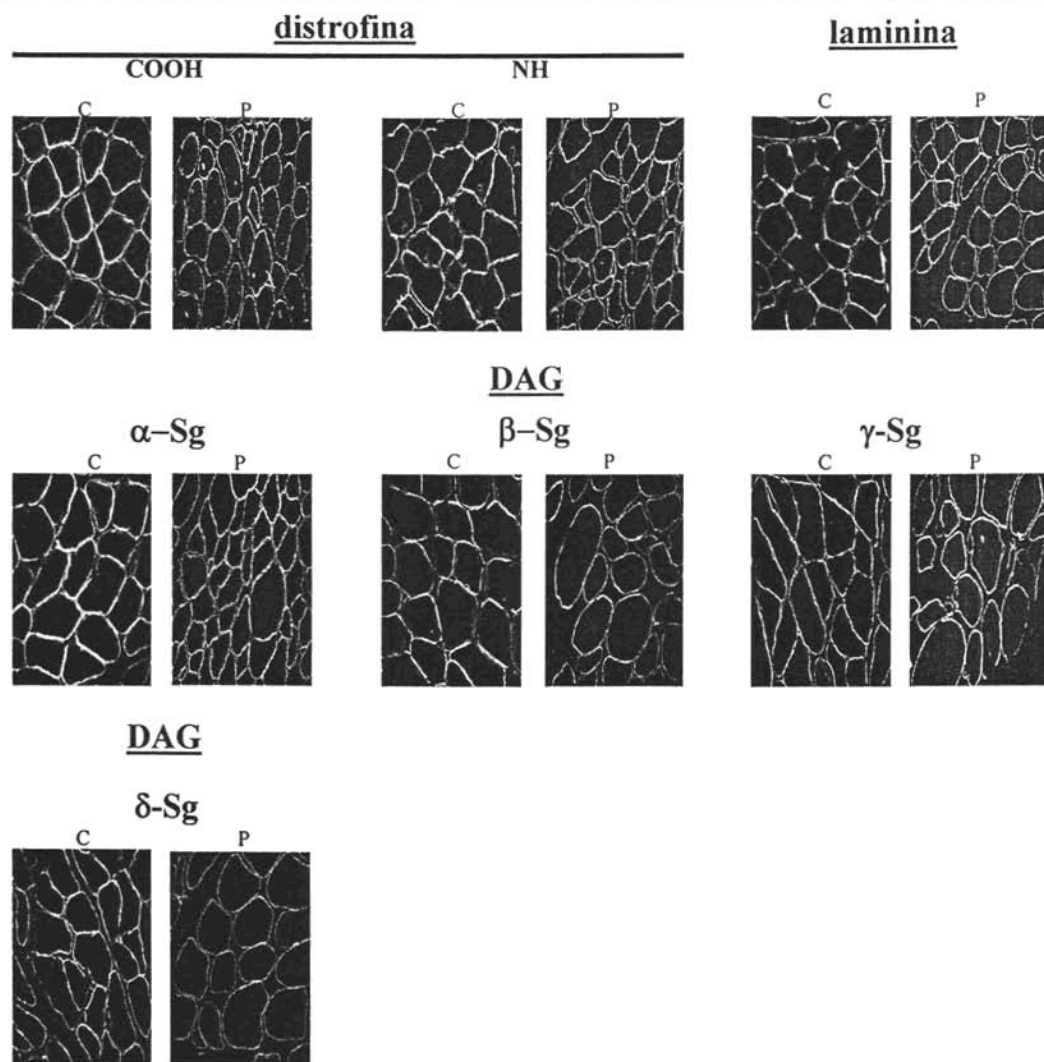


Figura 48. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 46. Femenino de 29 años, CPK 1115, musculatura distal y proximal afectada, con evolución de la enfermedad moderada y sin consanguinidad. Imágenes de inmunofluorescencia muestran a la proteína distrofina normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), para los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ la tinción es normal, para la proteína laminina se presenta normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

Distrofina

Laminina

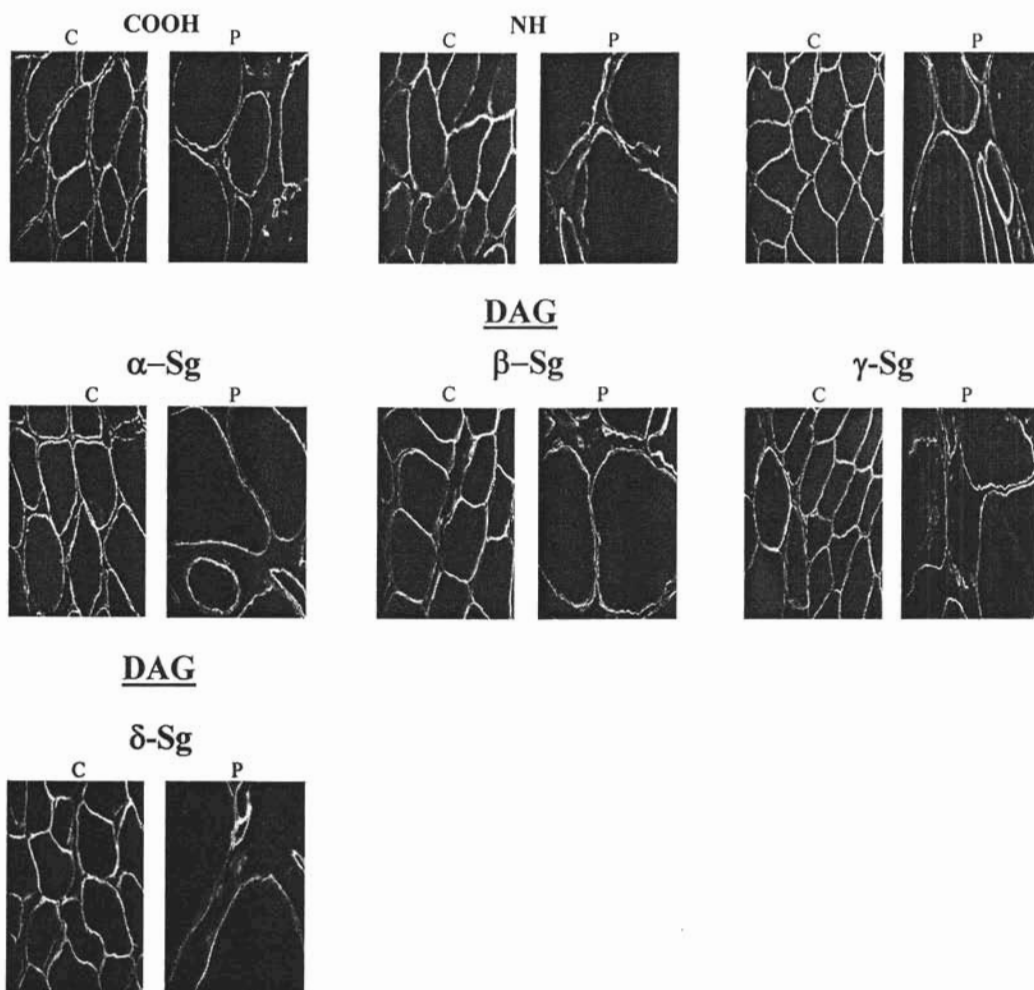


Figura 49. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 47. Femenino de 9 años, con musculatura afectada distal y proximal con evolución lenta de la enfermedad. Imágenes de inmunofluorescencia muestran a la proteína distrofina normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), para los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ la tinción es normal, para la proteína laminina se presenta normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

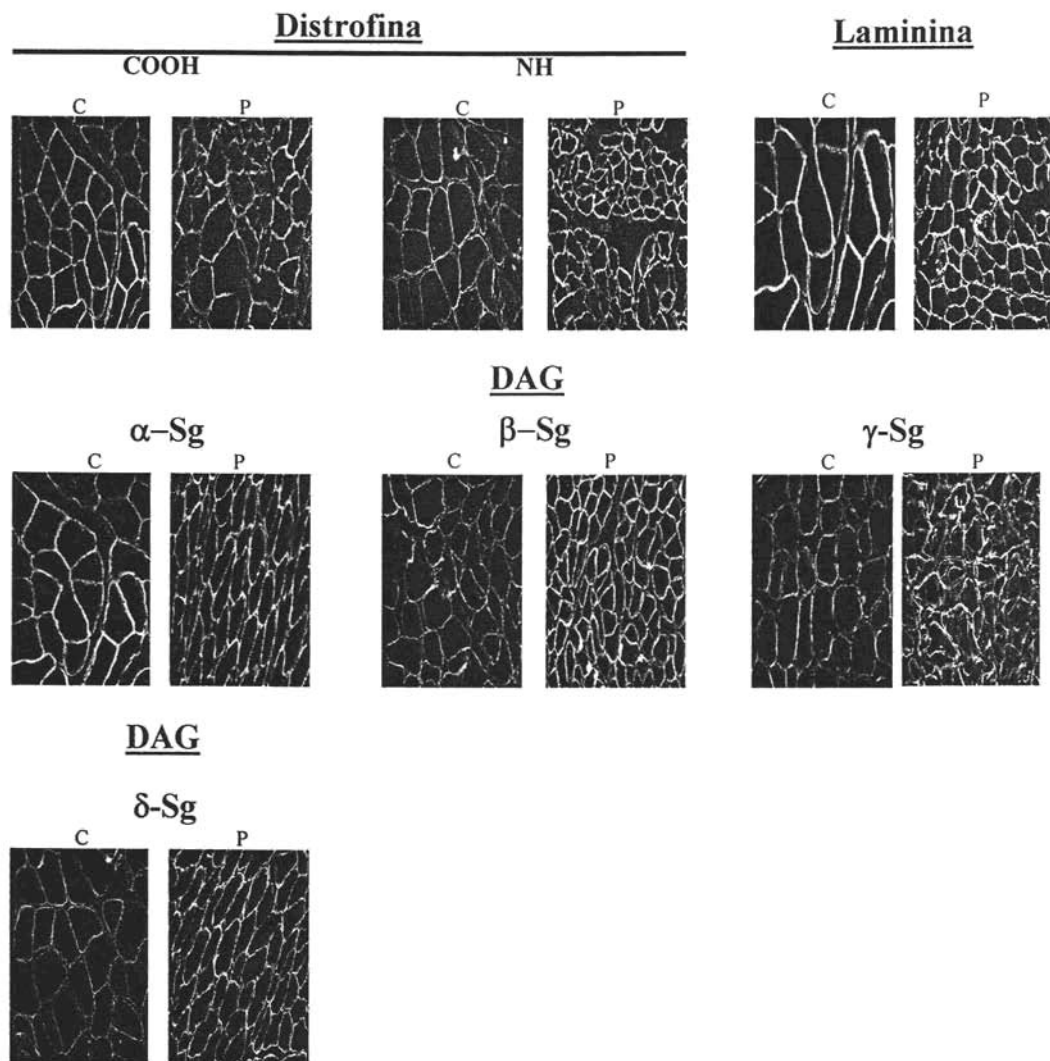


Figura 50. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 48. Varón de 10 años, CPK 635, musculatura involucrada distal y proximal, con evolución lenta de la enfermedad, sin consanguinidad. Imágenes de inmunofluorescencia muestran a la proteína distrofina normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), para los sarcoglicanos α -, β -, γ - y δ - la tinción es normal, para la proteína laminina se presenta normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

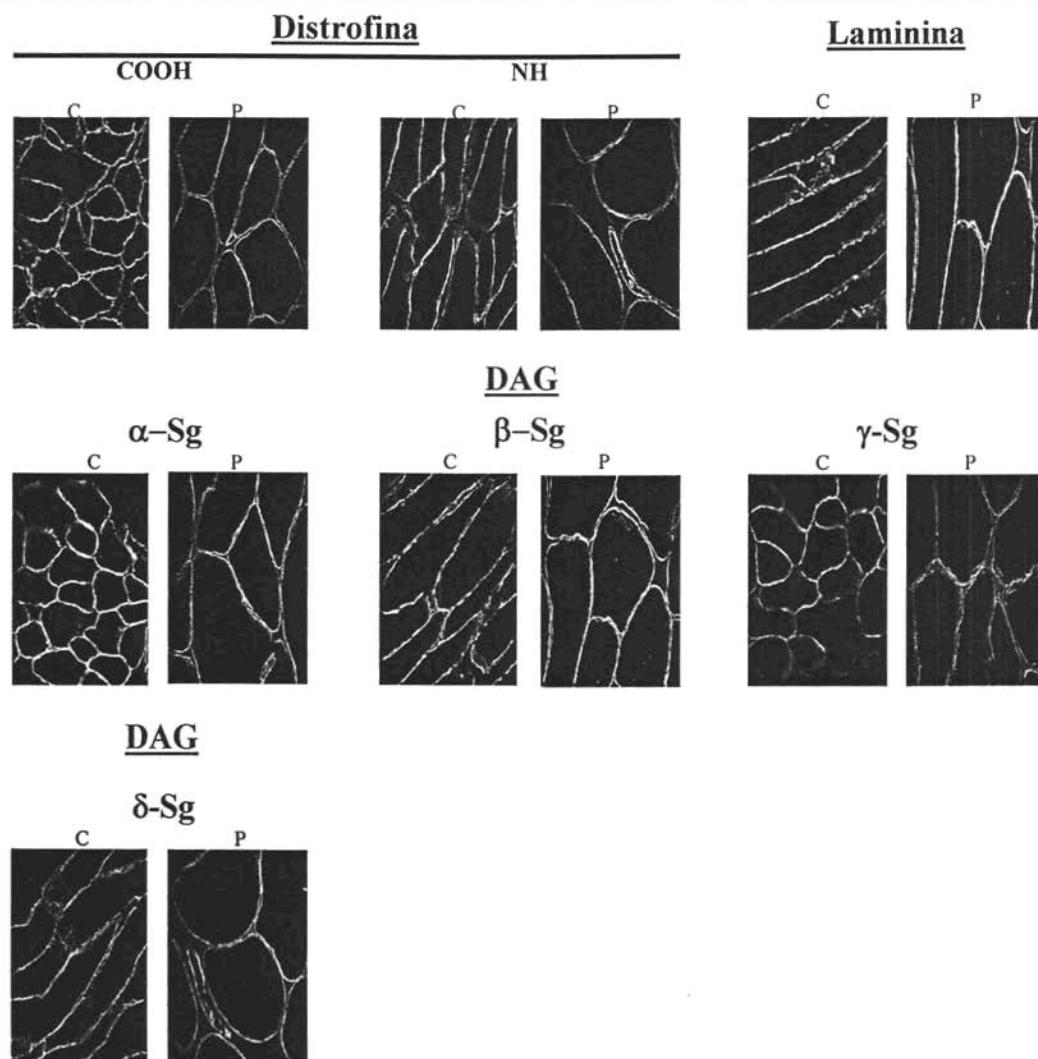


Figura 51. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 49. Femenino de 29 años, CPK 1115, con musculatura proximal afectada, con evolución de la enfermedad moderada, sin consanguinidad. Imágenes de inmunofluorescencia muestran a la proteína distrofina normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), para los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ la tinción es normal, para la proteína laminina se presenta normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

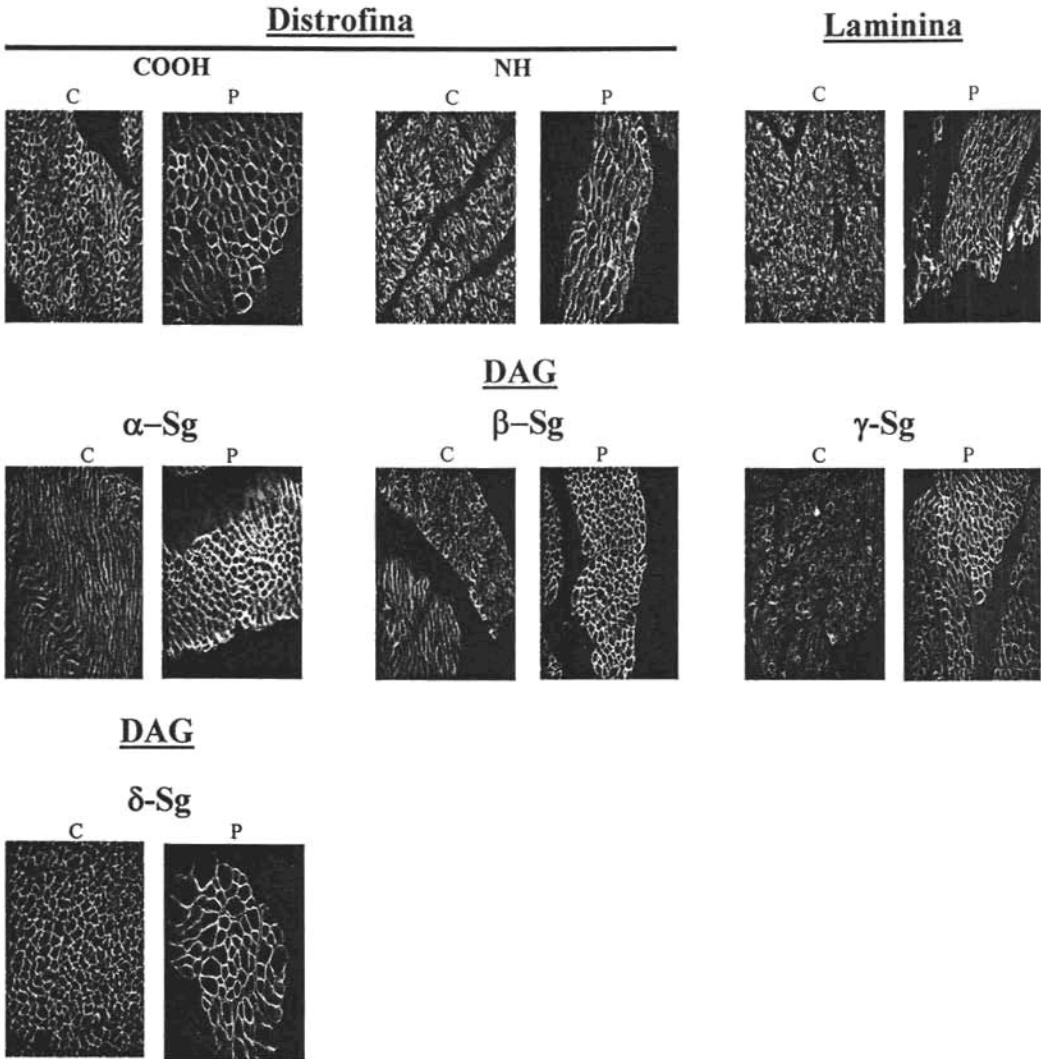


Figura 52. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 50. Femenino de 7 meses, CPK de 7273, con musculatura distal y proximal afectada. Imágenes de inmunofluorescencia muestran a la proteína distrofina normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), para los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ la tinción es normal, para la proteína laminina se presenta normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

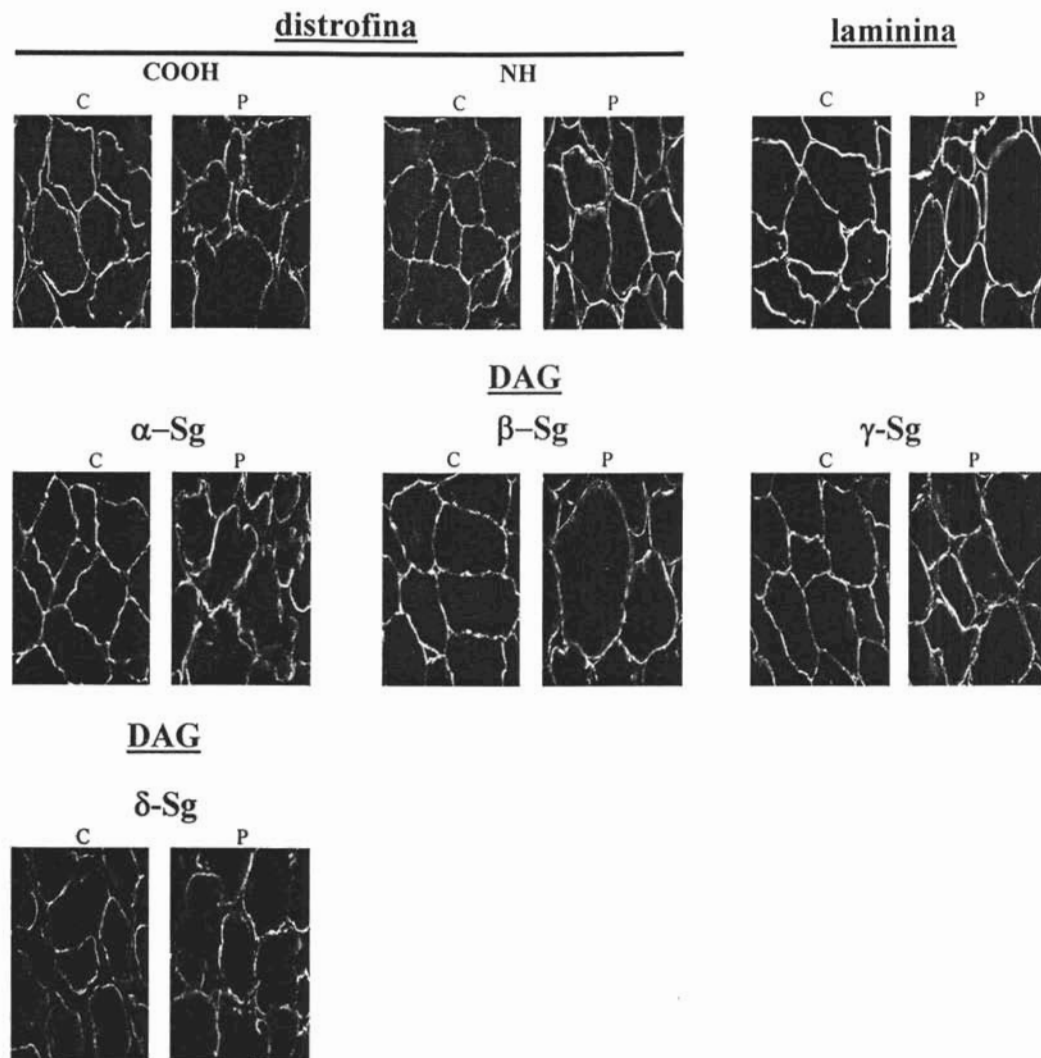


Figura 53. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 51. Varón de 22 años, CPK de 11674, con musculatura proximal afectada y evolución lenta de la enfermedad. Imágenes de inmunofluorescencia muestran a la proteína distrofina normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), para los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ la tinción es normal, para la proteína laminina se presenta normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

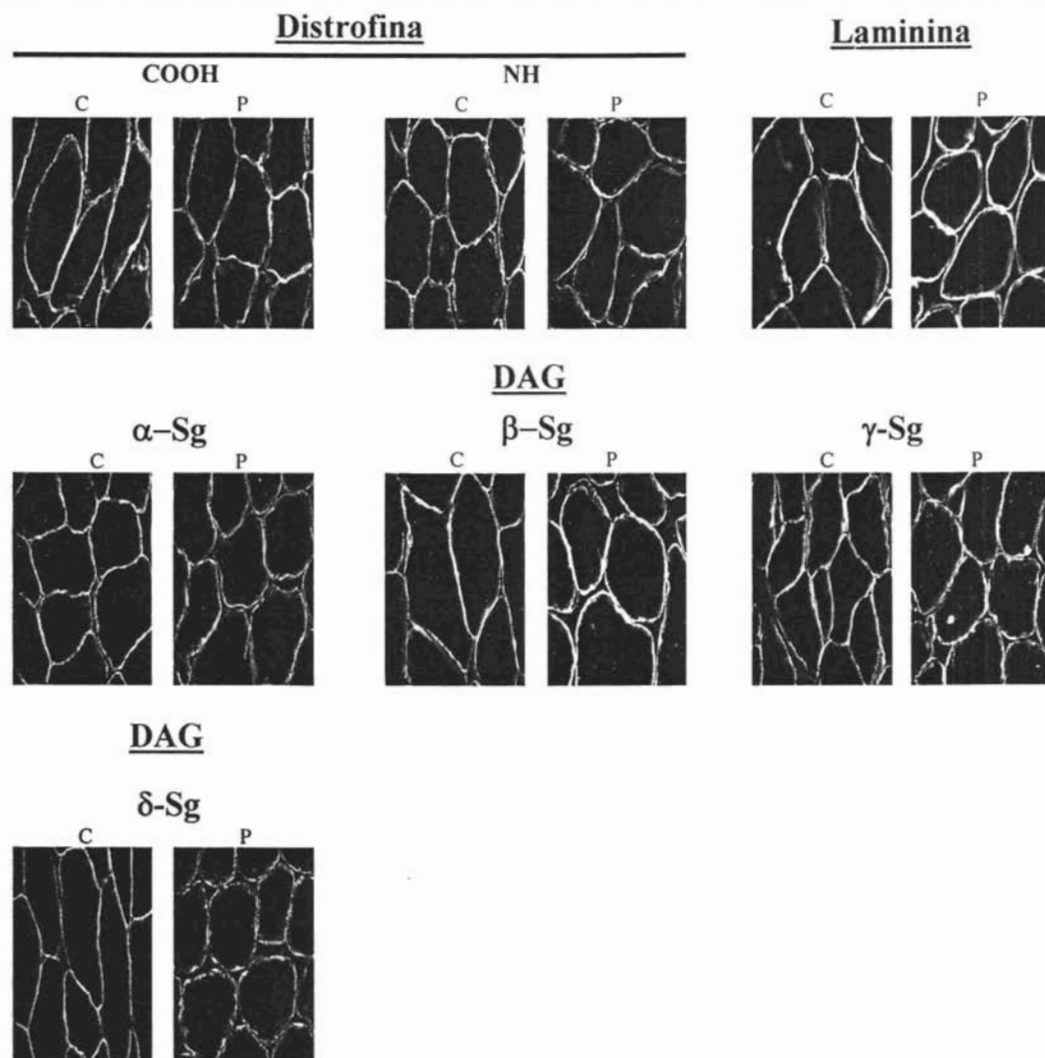


Figura 54. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 52. Varón de 17 años, CPK de 290, con musculatura proximal afectada, con evolución lenta de la enfermedad, sin consanguinidad. Imágenes de inmunofluorescencia muestran a la proteína distrofina normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), para los sarcoglicanos α -, β -, γ -y δ - la tinción es normal, para la proteína laminina se presenta normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

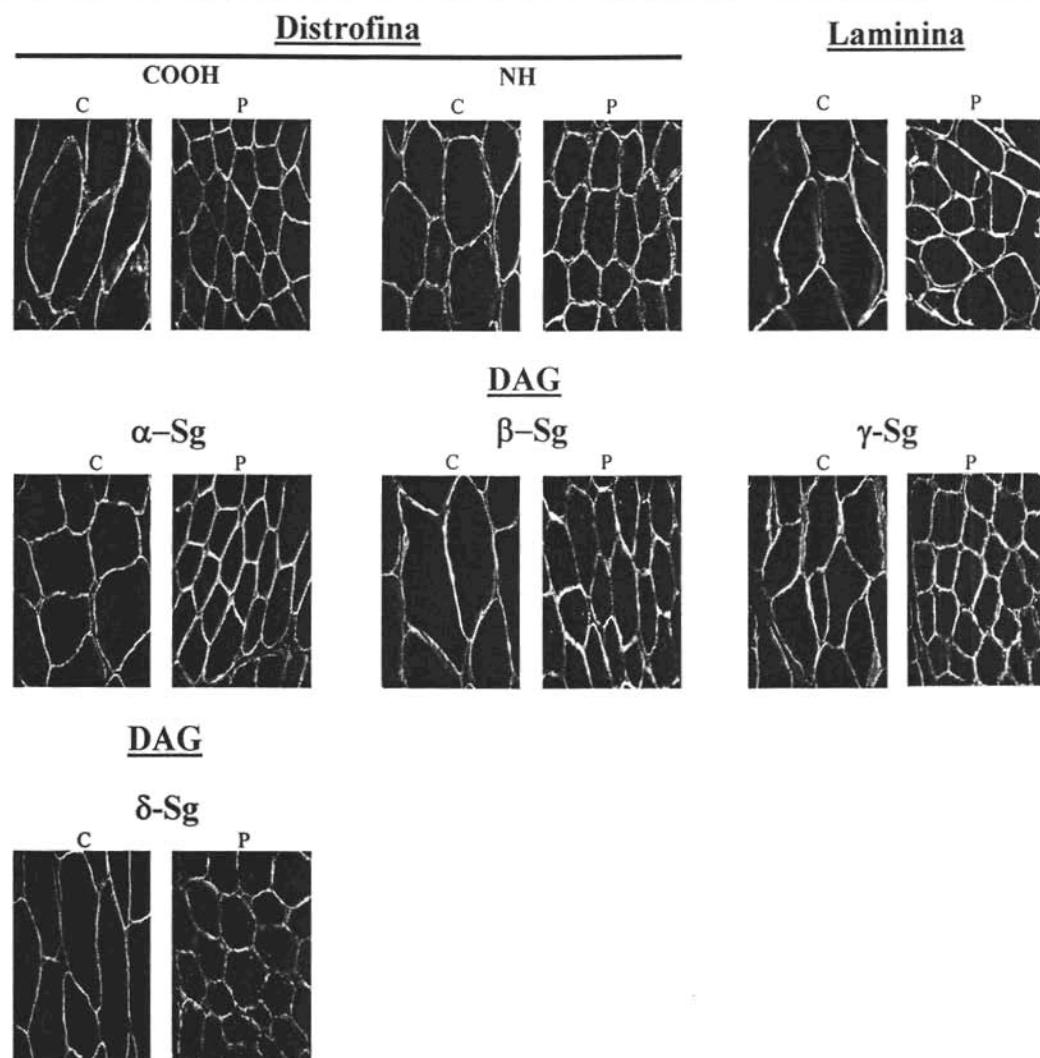


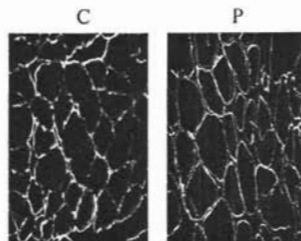
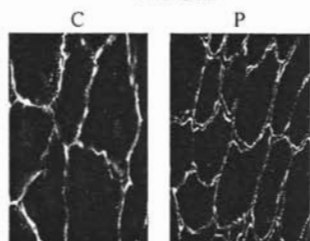
Figura 55. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 53. Varón de 6 años, CPK de 7293, sin consanguinidad. Imágenes de inmunofluorescencia muestran a la proteína distrofina normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), para los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ la tinción es normal, para la proteína laminina se presenta normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

Distrofina

Laminina

COOH

NH

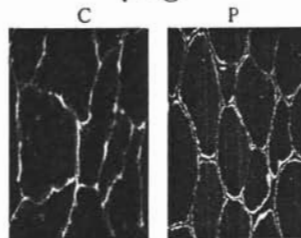
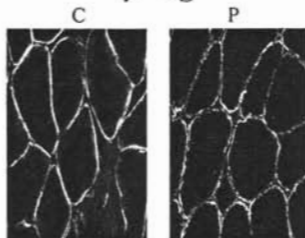
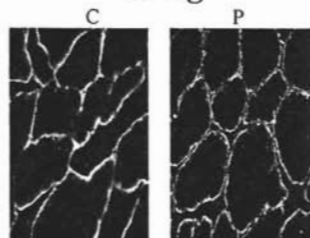


DAG

α -Sg

β -Sg

γ -Sg



DAG

δ -Sg

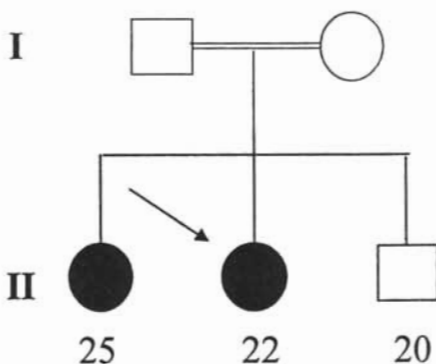
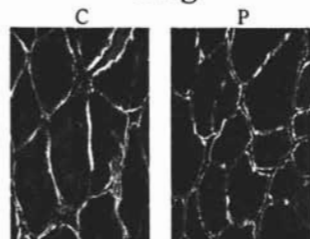


Figura 56. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 54. Femenino de 22 años, CPK de 1358, con musculatura distal afectada, escápulas haladas e hiperlordosis, con evolución de la enfermedad lenta, consanguinidad positiva y antecedentes. Imágenes de inmunofluorescencia muestran a la proteína distrofina normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), para los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ la tinción es normal, para la proteína laminina se presenta normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal.

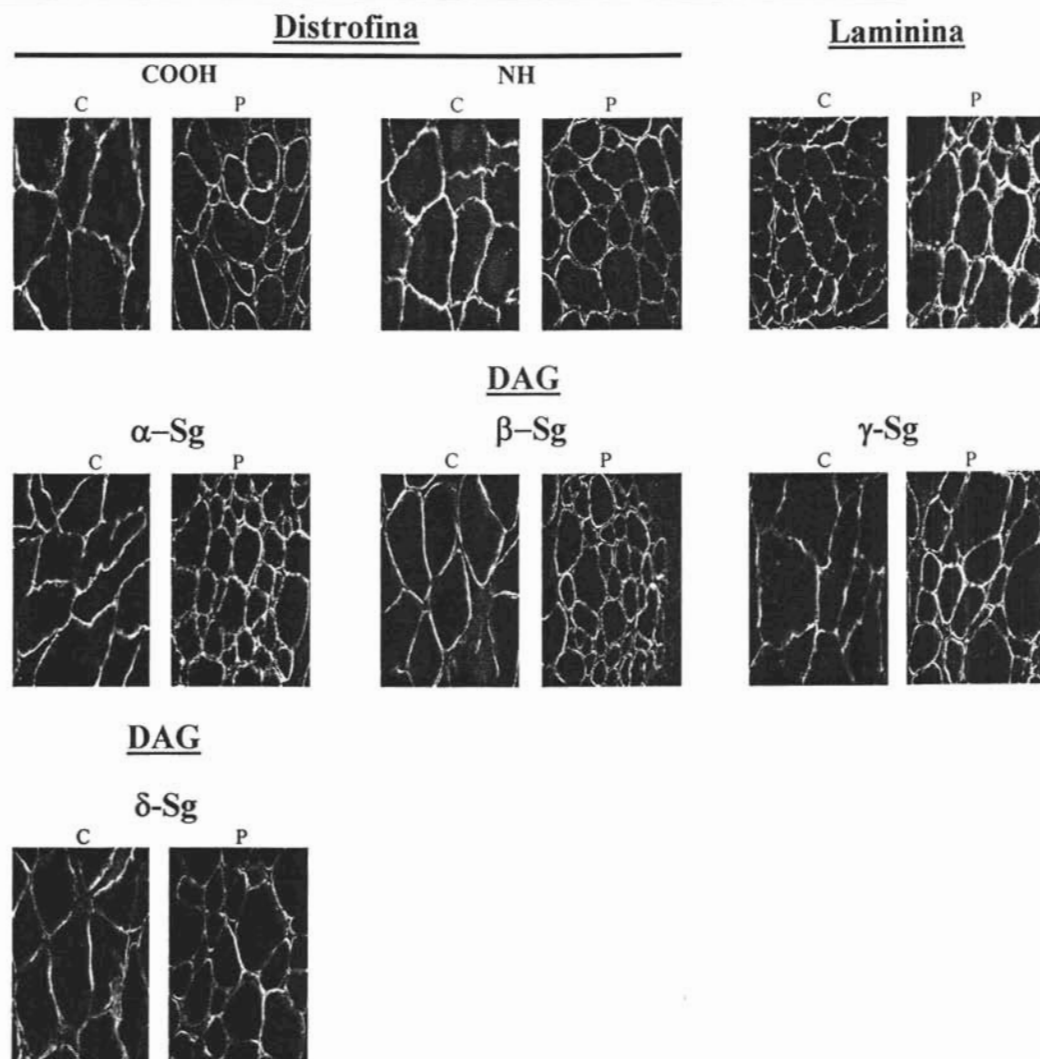


Figura 57. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 55. Femenino de 7 años con musculatura proximal afectada y CPK 370. Imágenes de inmunofluorescencia muestran a la proteína distrofina normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), para los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ la tinción es normal, para la proteína laminina se presenta normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

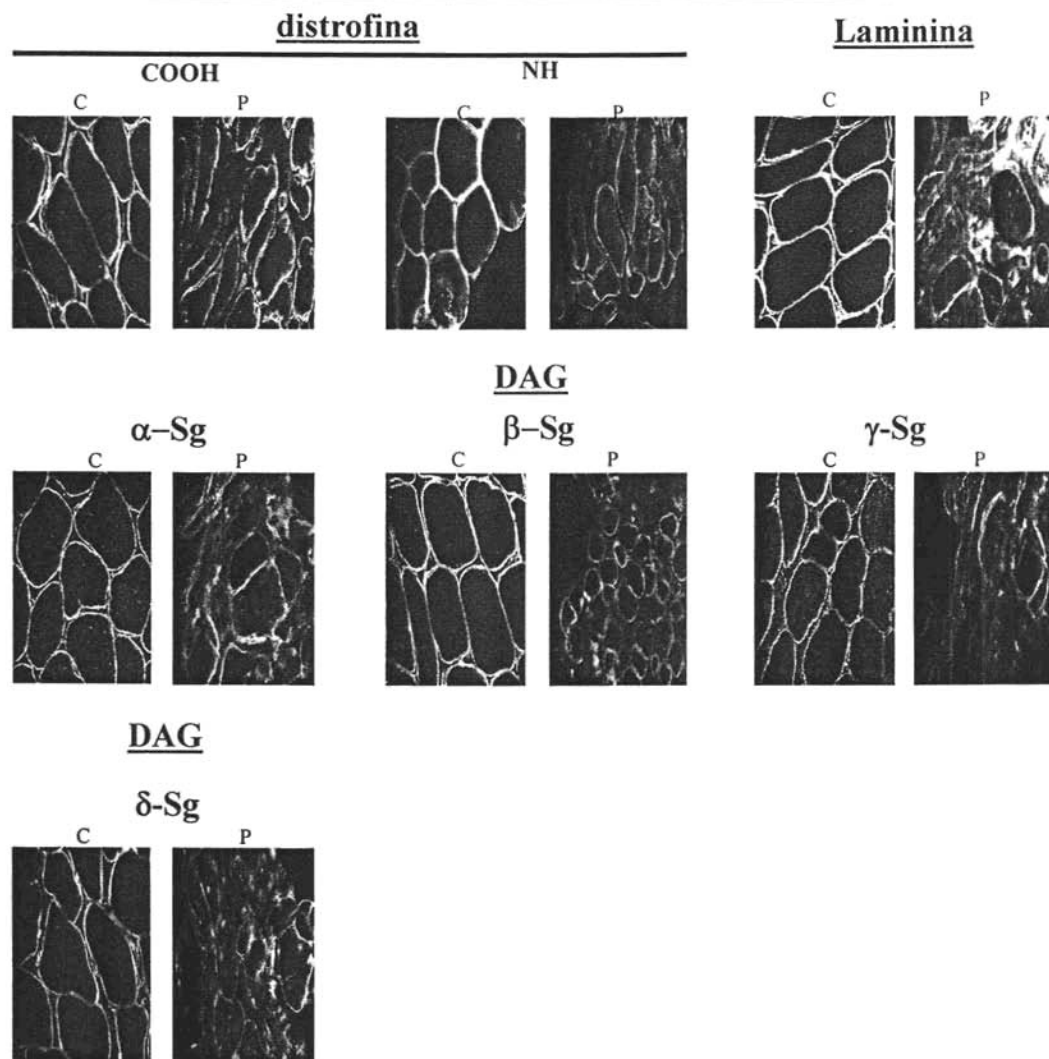


Figura 58. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 56. Varón de 33 años, CPK de 1277, musculatura distal y proximal afectada, con evolución lenta de la enfermedad, sin consanguinidad. Imágenes de inmunofluorescencia muestran a la proteína distrofina normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), para los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ la tinción es normal, para la proteína laminina se presenta normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

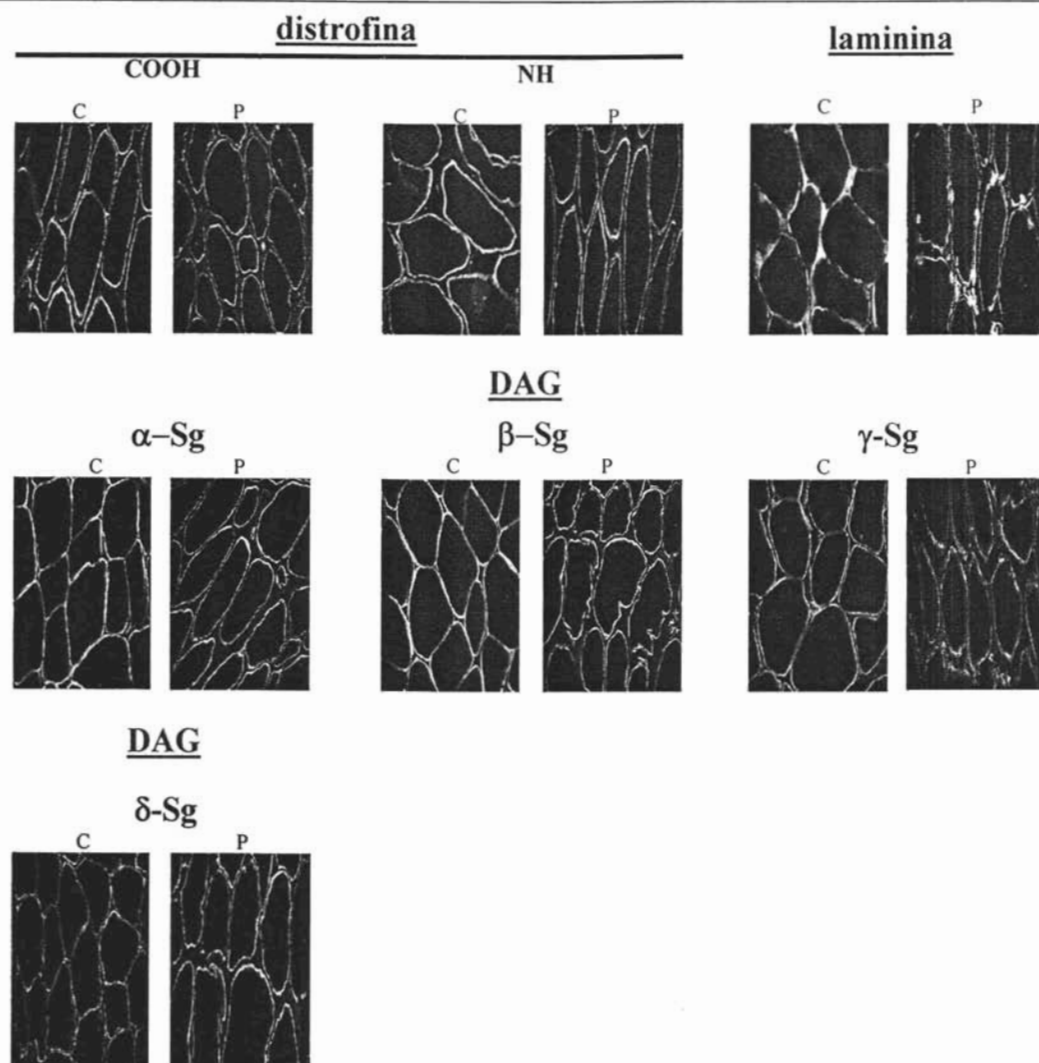


Figura 59. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 57. Femenino de 19 años, musculatura afectada proximal, con evolución lenta de la enfermedad, sin consanguinidad. Imágenes de inmunofluorescencia de la proteína distrofina se presenta normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), para los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ la tinción es normal, para la proteína laminina se presenta normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

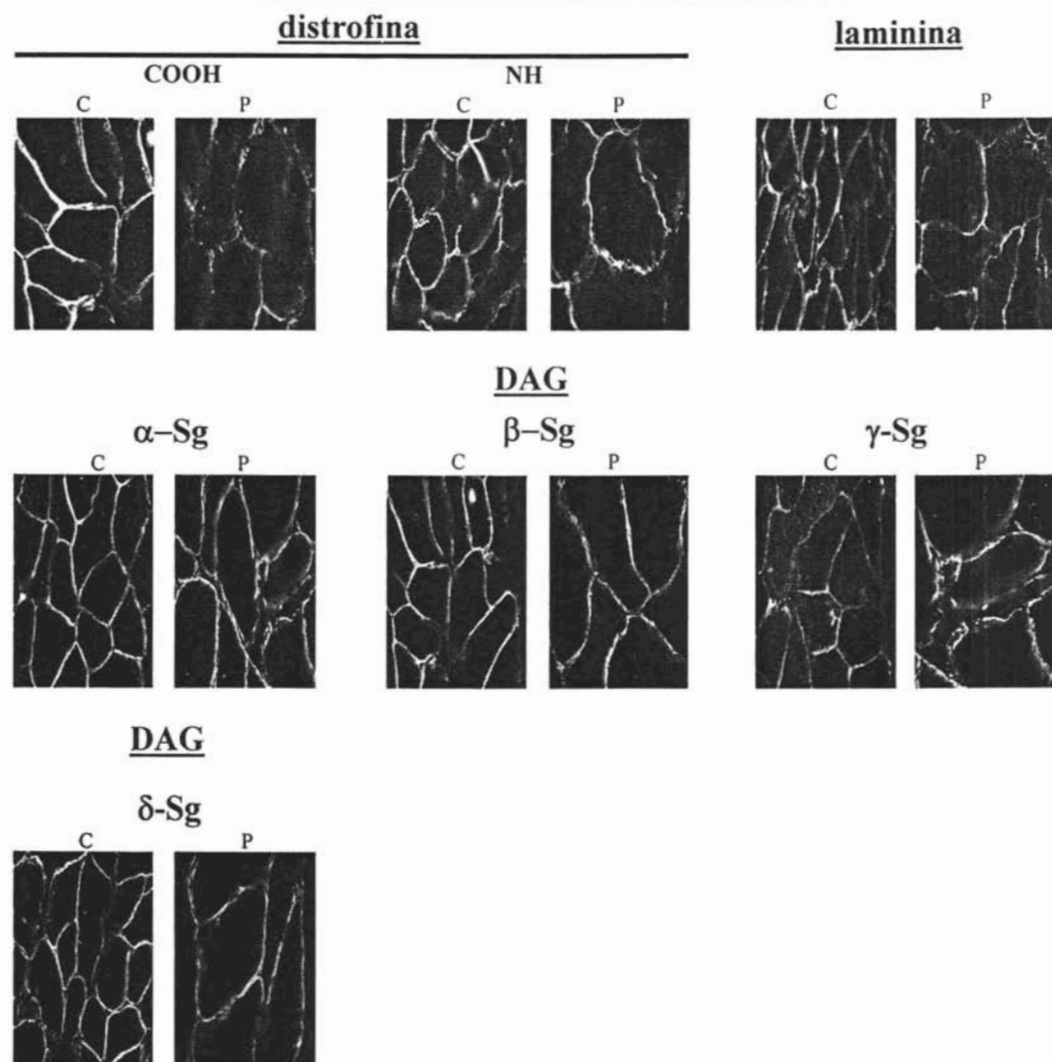


Figura 60. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 58. Femenino de 22 años, CPK 4600, con musculatura afectada distal, sin consanguinidad. Imágenes de inmunofluorescencia muestran a la proteína distrofina con tinción normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), para los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ la tinción es normal, para la proteína laminina se presenta normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

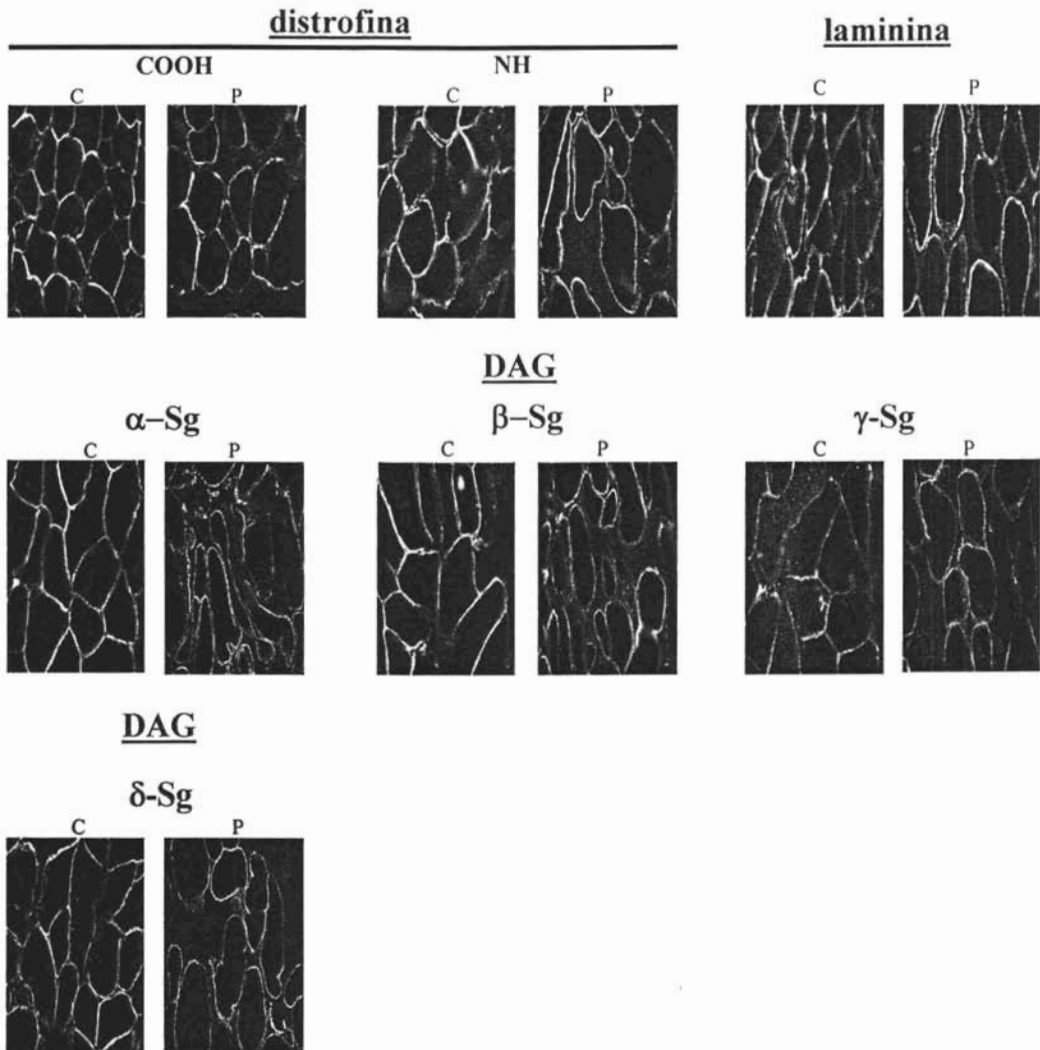


Figura 61. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 59. Varón de 7 años, CPK 1569, musculatura proximal afectada. Imágenes de inmunofluorescencia muestran a la proteína distrofina normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), para los sarcoglicanos α , β , γ y δ la tinción es normal, para la proteína laminina se presenta normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

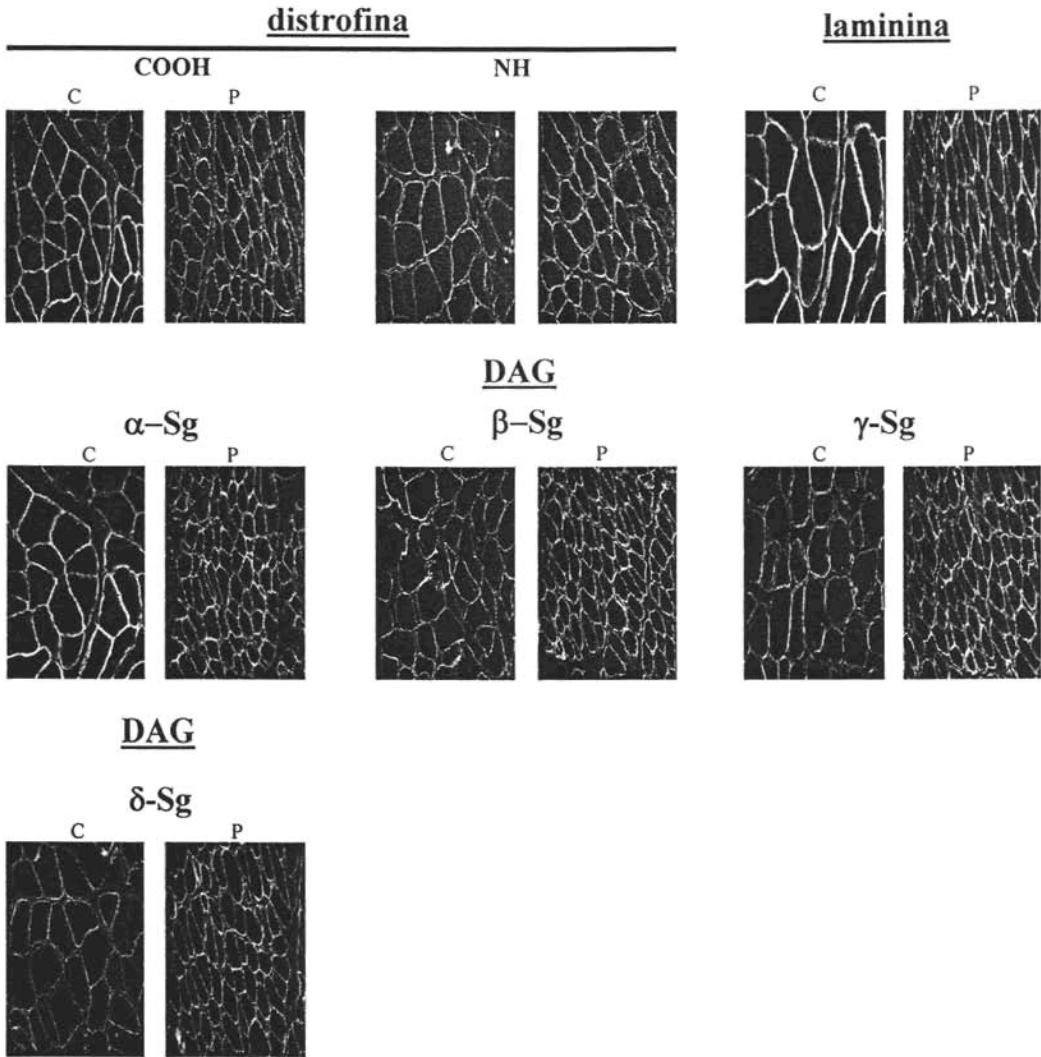


Figura 62. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 60. Varón de 3 años, con musculatura proximal afectada y con evolución lenta de la enfermedad. Imágenes de inmunofluorescencia muestran a la proteína distrofina que se presenta normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), para los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ la tinción es normal, para la proteína laminina se presenta normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

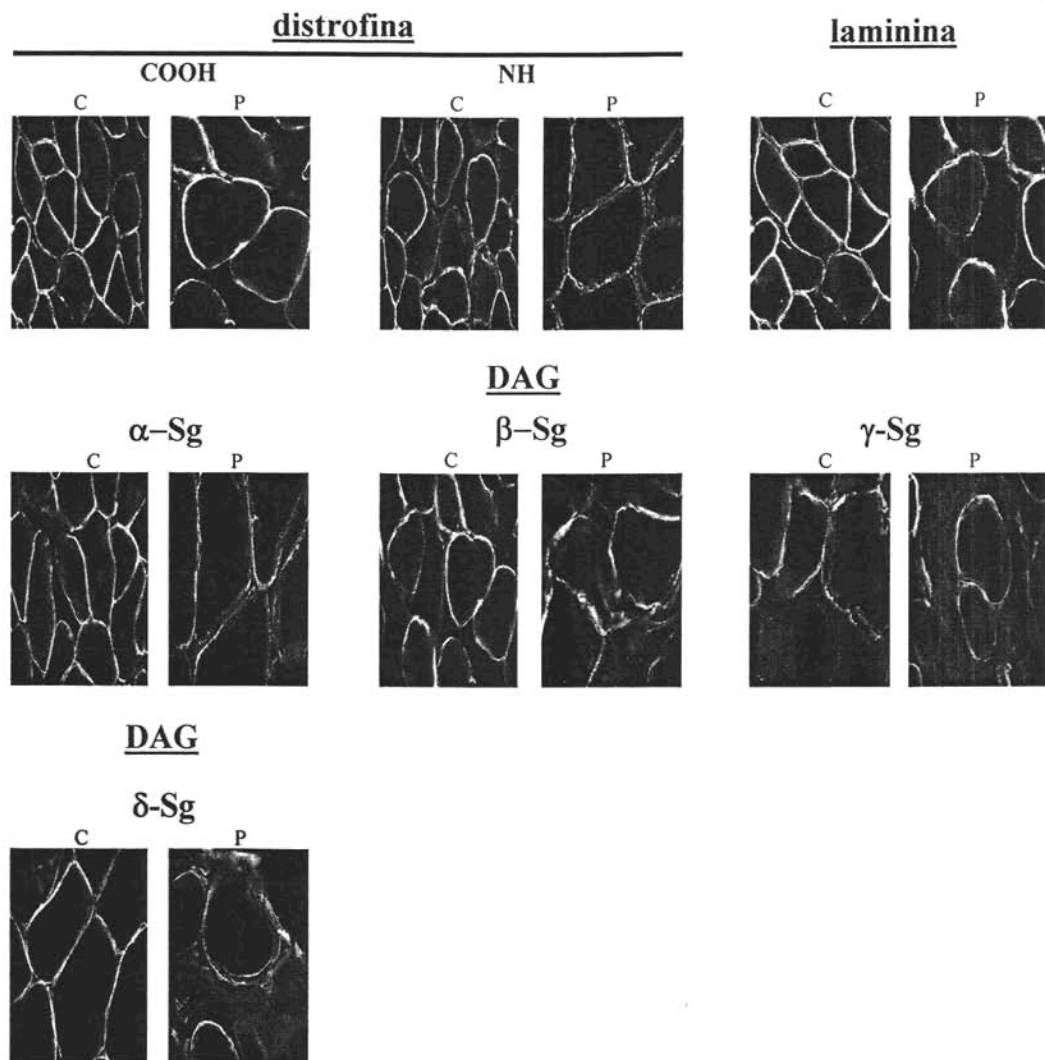


Figura 63. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 61. Varón de 29 años, CPK 1093, musculatura distal y proximal afectada, evolución de la enfermedad lenta, sin consanguinidad. Imágenes de inmunofluorescencia de la proteína distrofina se presenta normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), para los sarcoglicanos α -, β -, γ -y δ - la tinción es normal, para la proteína laminina se presenta normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

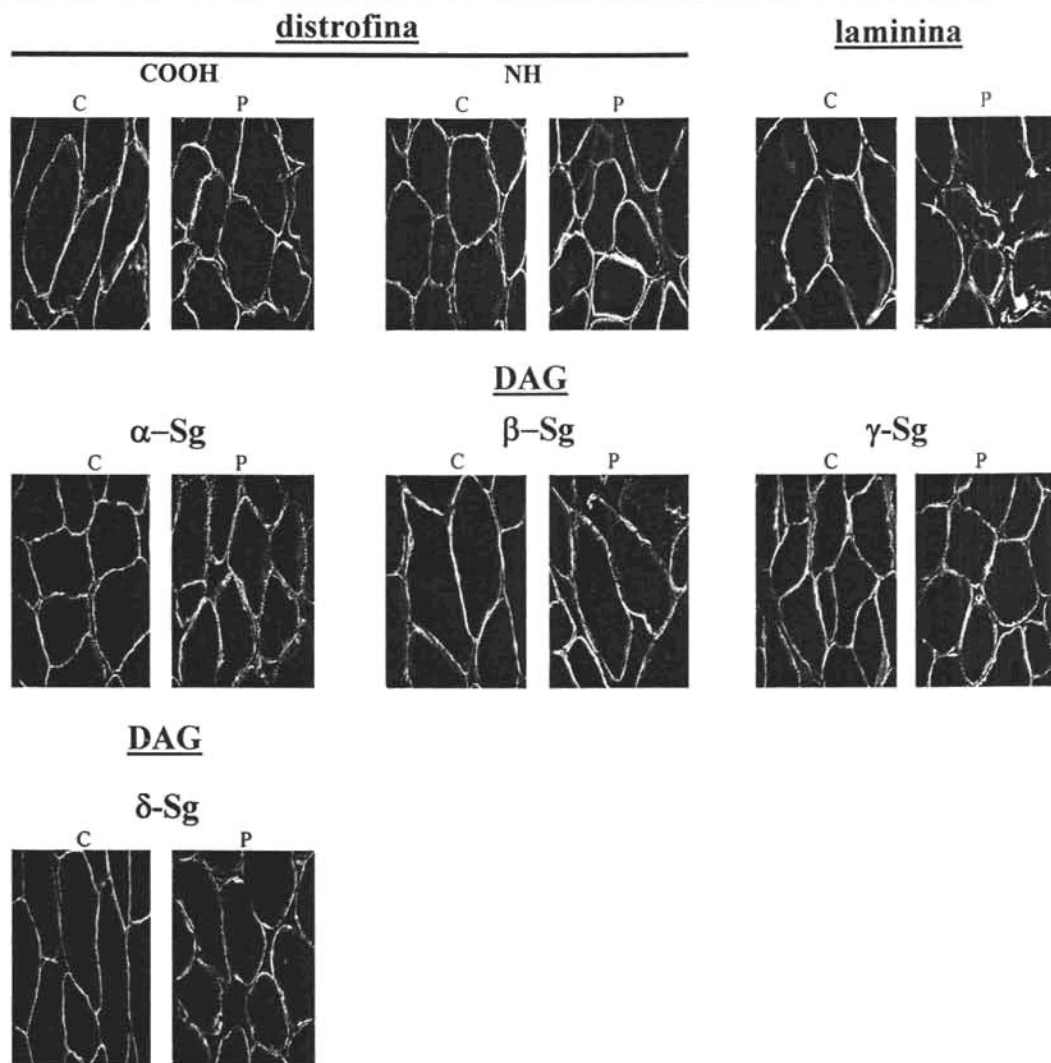


Figura 64. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 62. Varón de 29 años, con musculatura proximal y distal afectada con evolución lenta de la enfermedad y sin consanguinidad. Imágenes de inmunofluorescencia de la proteína distrofina se presenta normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), para los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ la tinción es normal, para la proteína laminina se presenta normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

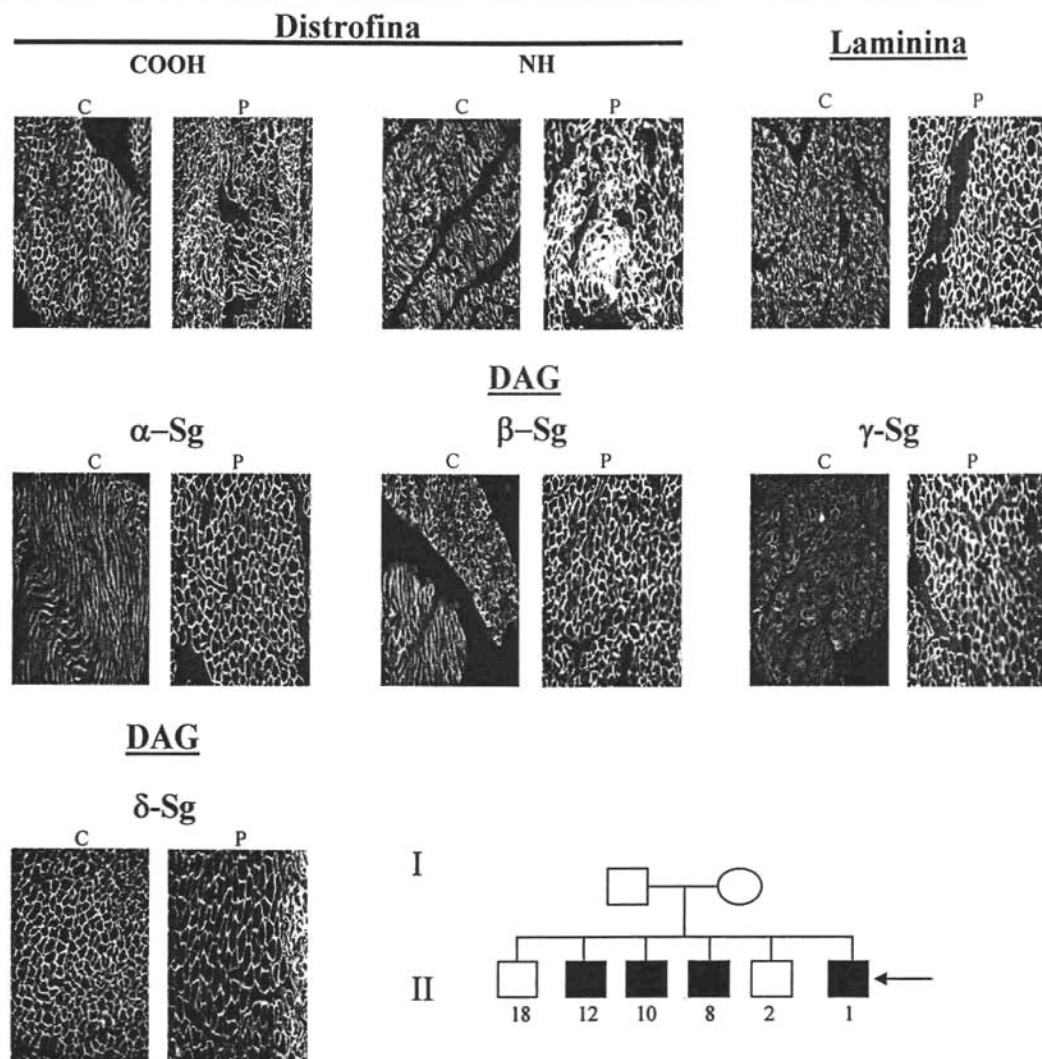
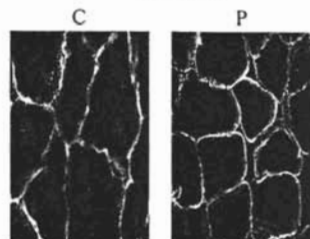


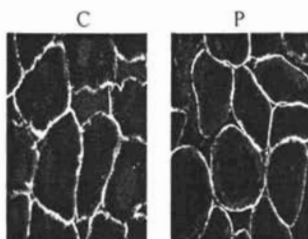
Figura 65. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 63. Varón de 1 año, CPK 198, musculatura distal y proximal afectada, evolución lenta de la enfermedad, con antecedentes de distrofia muscular en tres hermanos. Imágenes de inmunofluorescencia muestran a la proteína distrofina normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), para los sarcoglicanos α , β , γ y δ la tinción es normal, para la proteína laminina se presenta normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal.

distrofina

COOH

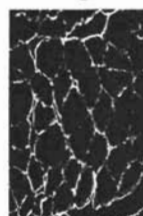


NH



laminina

C

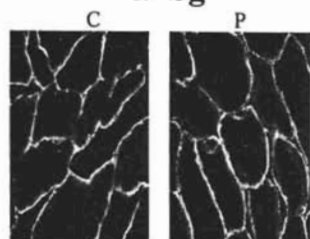


P

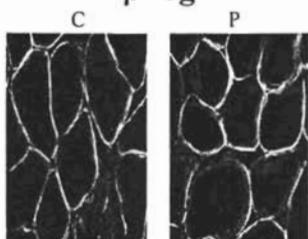


DAG

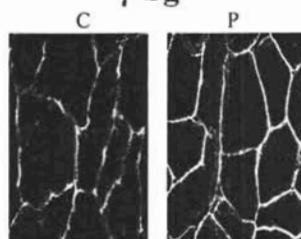
α -Sg



β -Sg



γ -Sg



DAG

δ -Sg

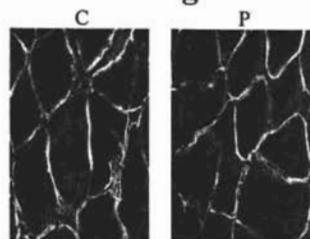


Figura 66. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 64. Varón de 43 años, CPK 2800, con musculatura proximal afectada, con evolución lenta de la enfermedad y sin consanguinidad. Imágenes de inmunofluorescencia de la proteína distrofina se encuentra normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), para los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ la tinción es normal, para la proteína laminina se presenta normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

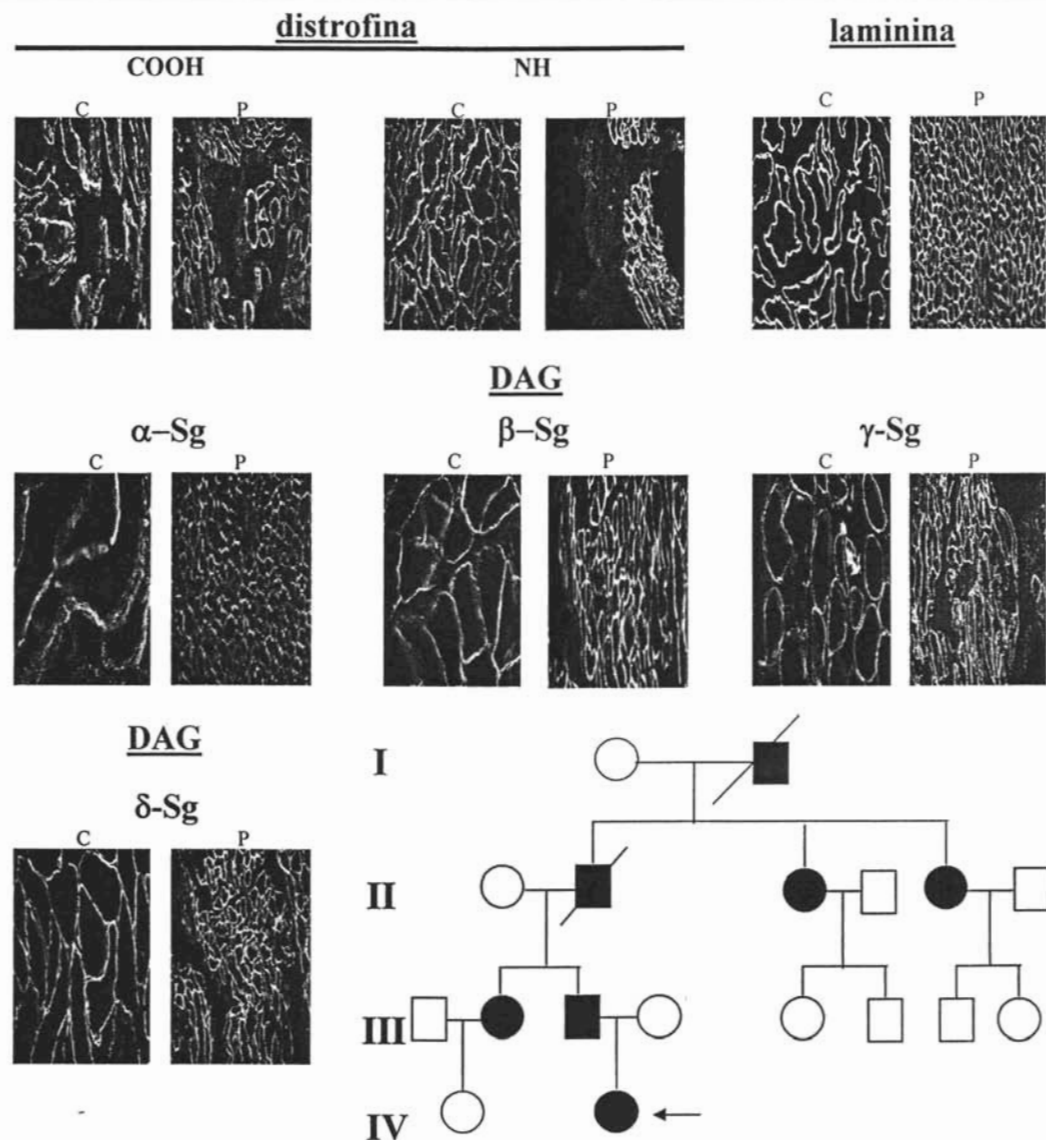


Figura 67. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 65. Femenino de 3 años, CPK 509, con musculatura proximal y distal afectada, con evolución lenta de la enfermedad y sin consanguinidad. El árbol genealógico muestra el tipo de transmisión de la enfermedad como autosómica dominante. Imágenes de inmunofluorescencia de la proteína distrofina se encuentra normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), para los sarcoglicanos α , β , γ y δ la tinción es normal, para la proteína laminina se presenta normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal.

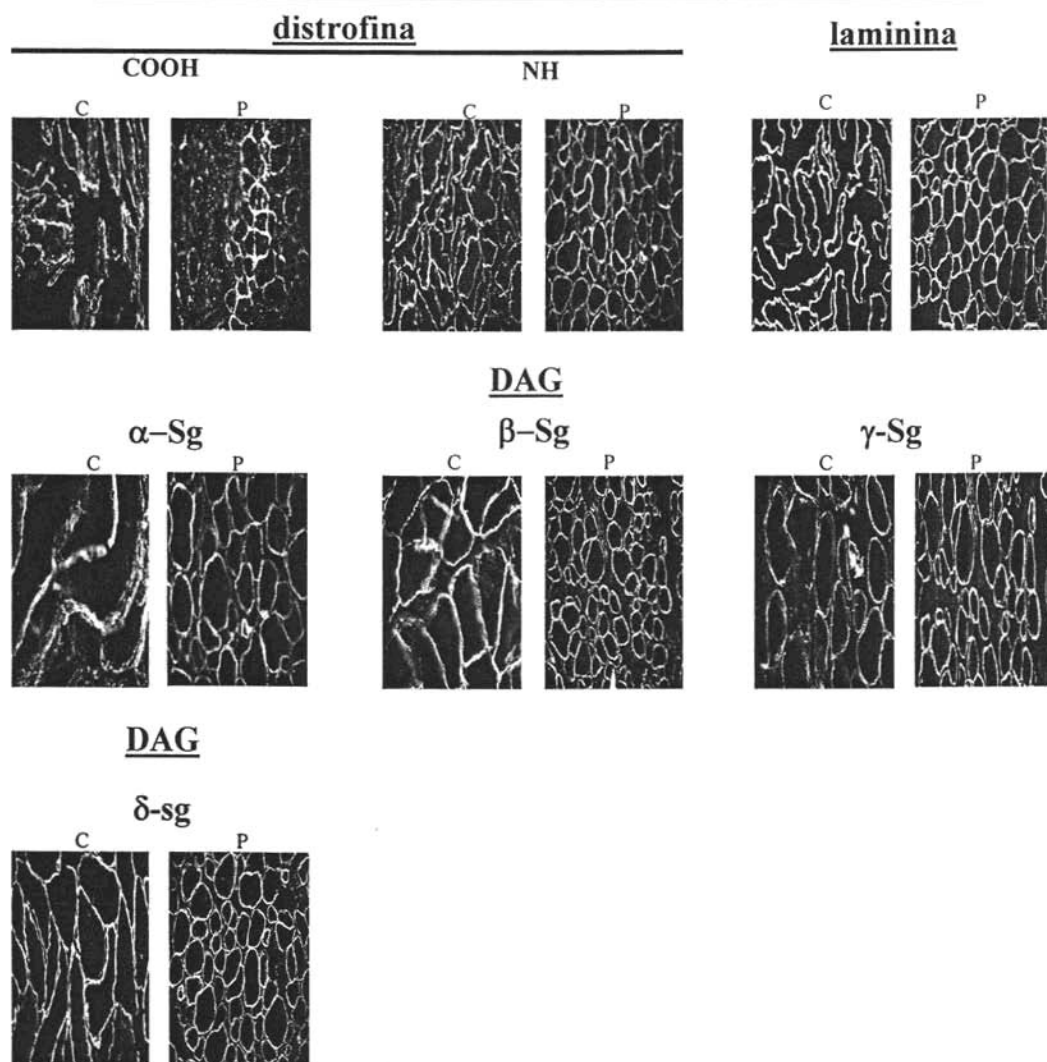


Figura 68. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 66. Varón de 6 años, con CPK 390, musculatura proximal afectada, con evolución moderada de la enfermedad, sin consanguinidad. Imágenes de inmunofluorescencia de la proteína distrofina se encuentra normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), para los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ la tinción es normal, para la proteína laminina se presenta normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

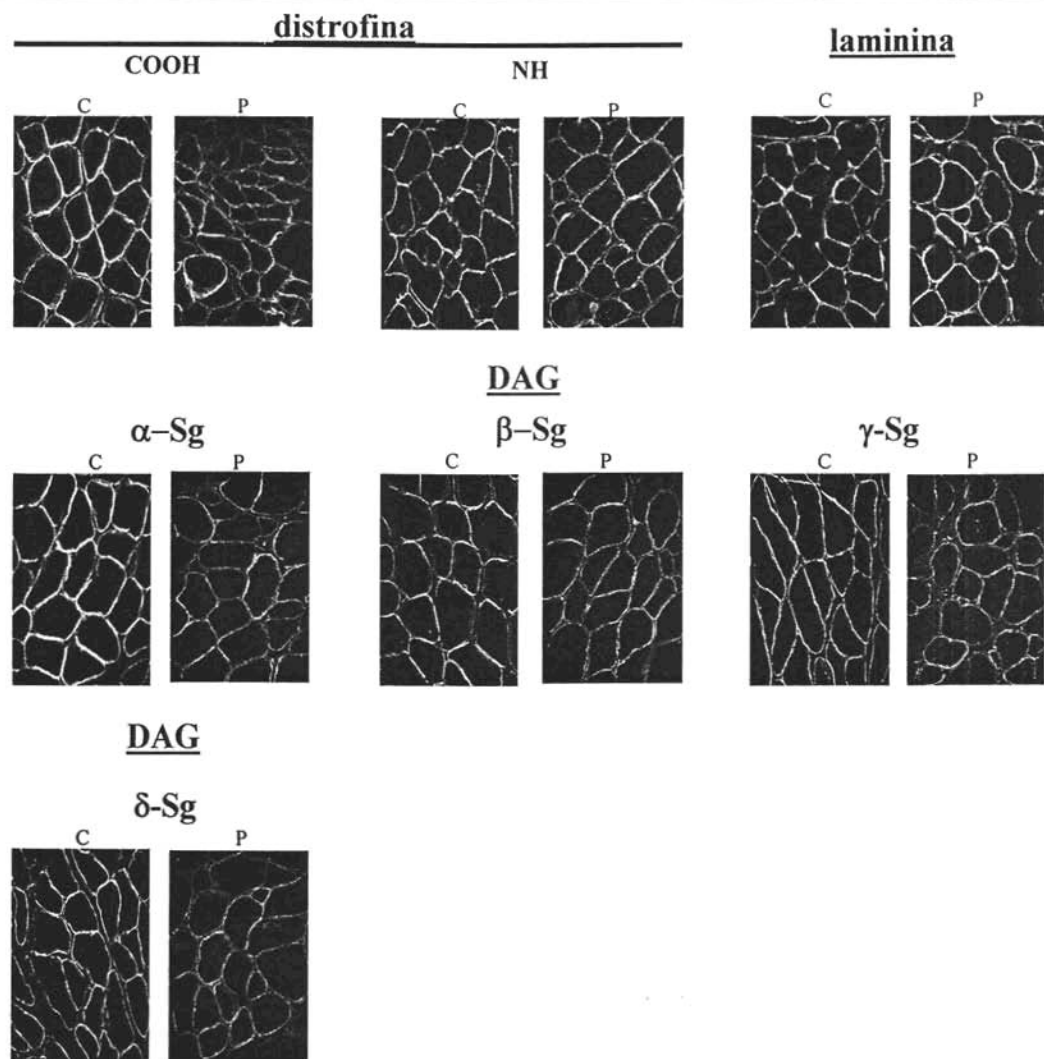


Figura 69. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta del paciente 67. Femenino de 22 años, CPK 6727, musculatura distal y proximal afectada, con evolución moderada de la enfermedad, sin consanguinidad. Imágenes de inmunofluorescencia de la proteína distrofina se encuentra normal para los extremos amino (NH) y carboxilo (COOH), para los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ la tinción es normal, para la proteína laminina se presenta normal. P: músculo del paciente. C: músculo normal. Caso único en la familia.

Pacientes sin fibras musculares.

Se analizaron 6 pacientes, que debido al proceso avanzado de la enfermedad no se pudieron observar fibras musculares por medio de inmunofluorescencia, dos pacientes femeninos y cuatro pacientes masculinos, la edad de los pacientes varia entre 1 y 32 años, los datos de evolución de la enfermedad no son constantes y el diagnóstico preliminar no fue posible probarlo.

Paciente/ Figura	Edad(años)	Genero	CPK (U/L)	Evolución de la enfermedad	Diagnostico previo
68-70	30	M	479	Lenta	Cinturas
69-71	9	M	2211	Moderada	Sin
70-72	32	F	1256	Lenta	D-Becker
71-73	27	M	No D	Lenta	D-Becker
72-74	1	F	No D	Rápida	Distrofia
73-75	5	M	No D	No D	Duchenne

Tabla 11. Pacientes sin fibras musculares; columna uno, número de paciente; columna dos, edad en años; columna tres, genero; columna cuatro, CKP (fosfocinasa de cretinina); columna cinco, evolución de la enfermedad ND (no determinada); columna seis, diagnostico previo.

Sin fibras musculares

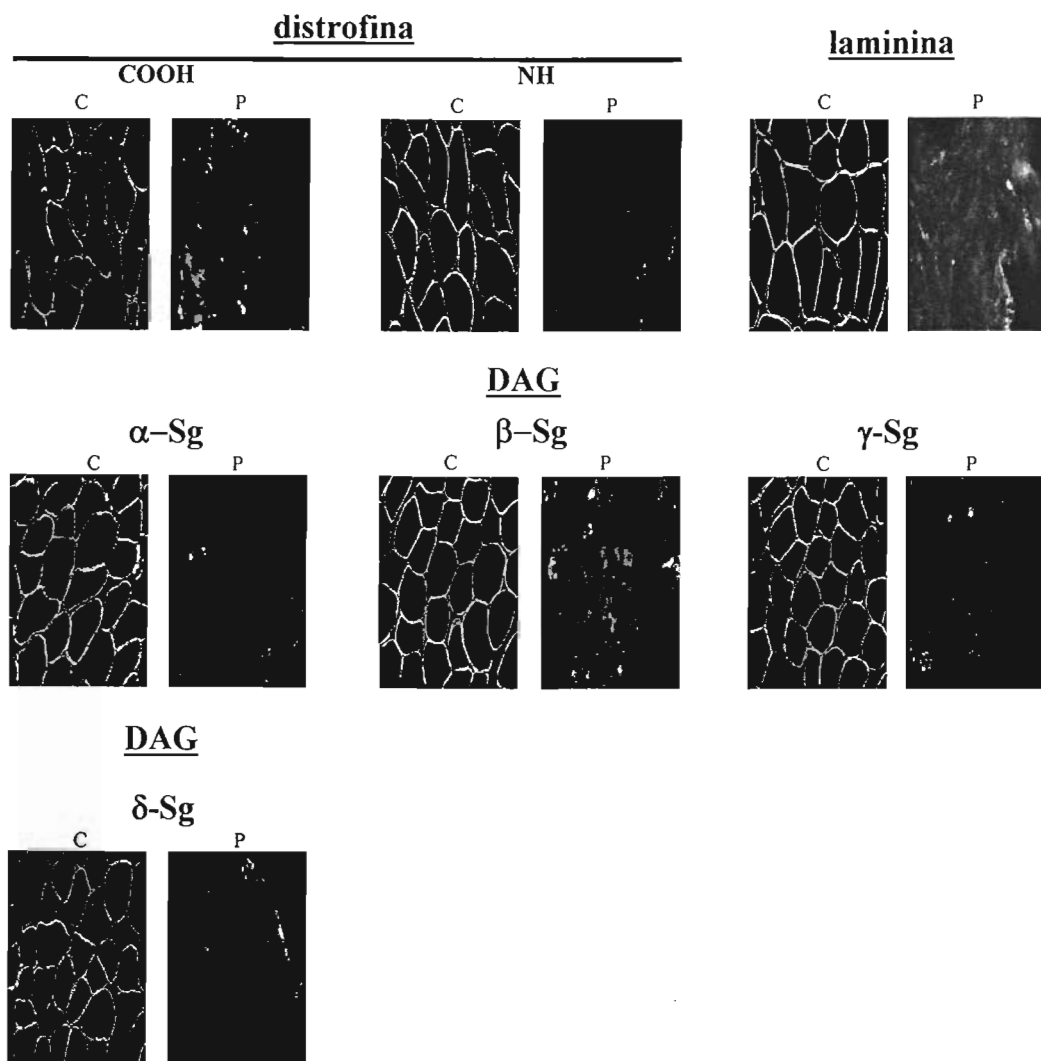


Figura 70. Sin fibras musculares. C: músculo normal. P: músculo del paciente.

Paciente con ausencia de la proteína merosina

La paciente 74 con edad de 8 meses, segundo hijo de una pareja consanguínea nacida en un pueblo pequeño del Estado de Hidalgo en donde la endogamia es muy alta debido a lo aislado de la zona. Se logró obtener el árbol genealógico de la paciente de cuatro generaciones anteriores (fig 71)

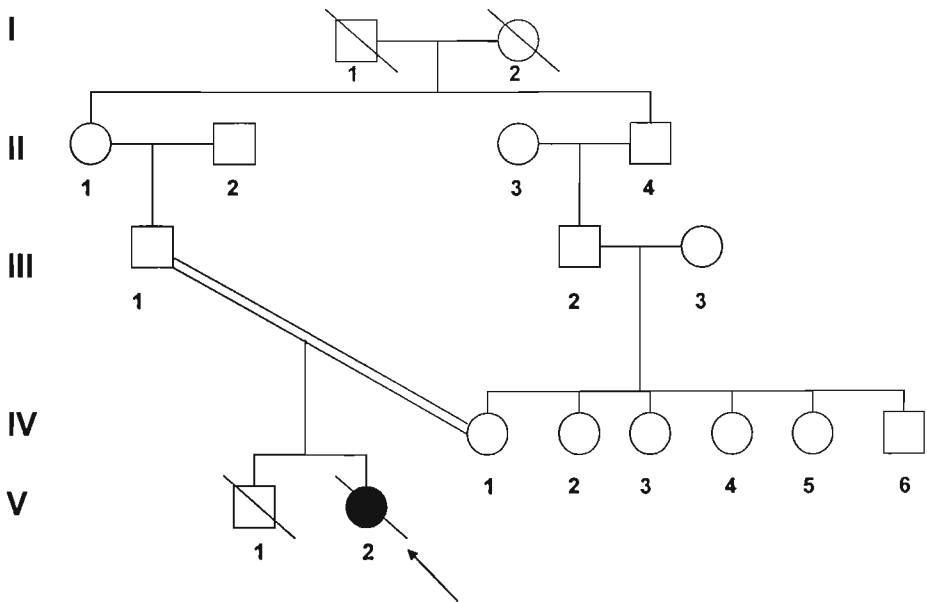


Figura 71. Árbol genealógico de la paciente 74. Donde se muestra la existencia de consanguinidad entre la generación III y IV, así como antecedente de la enfermedad en la generación V-1.

La paciente fué valorada en el Hospital de Pediatría del Centro Medico Nacional siglo XXI del IMSS presentando para el primer mes de vida hipotonía, irritabilidad, con movimientos reducidos espontáneos y succión débil. La exploración física mostró reducción de la musculatura de la cintura, contracturas en tobillos, rodillas y muñecas. Las extremidades

superiores e inferiores se encontraban hipertróficas, CPK en suero fue de 2897 U/l y lactato deshidrogenasa de 454 U/l.

Las imágenes de resonancia magnética nuclear (IRM) realizadas en los hemisferios cerebrales de la paciente 74 muestran una señal baja en T1, imágenes favorables y una intensidad alta de señal en T2, las imágenes de mielinización, corresponden a un patrón de edad de 3 meses (fig 72), estas son áreas de hiperintensidad periventricular que corresponden a áreas de desmielinización.

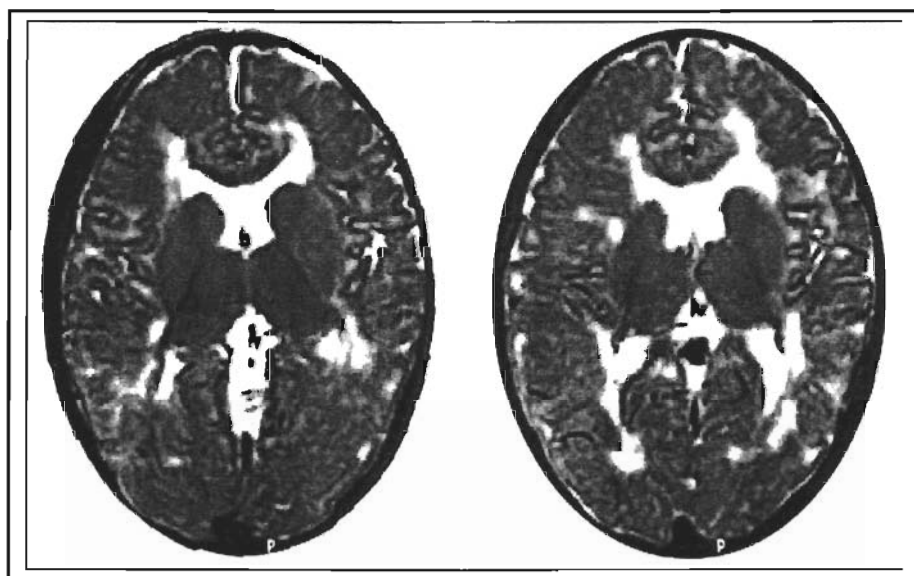


Figura 72. Imágenes de resonancia magnética de hemisferios cerebrales de la paciente 74. Mostrando una baja intensidad de señal en T1 y una alta intensidad de señal en T2, las imágenes muestran un patrón de mielinización deficiente para la edad de la paciente 74.

La biopsia muscular reveló atrofia con escasas fibras pequeñas y fibras que alternan con fibras musculares hipertróficas dañadas, incremento del tejido conectivo y centralización de núcleos celulares.

Análisis de inmunofluorescencia del paciente.

La criosecciones de músculo esquelético de la biopsia del paciente como la de el control, son de cuádriceps, se trataron con los anticuerpos monoclonales de α -, β -, γ -, δ -sarcoglicanos, distrofina extremo amino y merosina alfa-2. La inmunotinción mostró una ausencia de la proteína merosina alfa-2 en la superficie de las fibras musculares del paciente (fig 73) en contraste, fué posible observar la expresión de todos los sarcoglicanos (α -, β -, γ -, δ -) y distrofina.

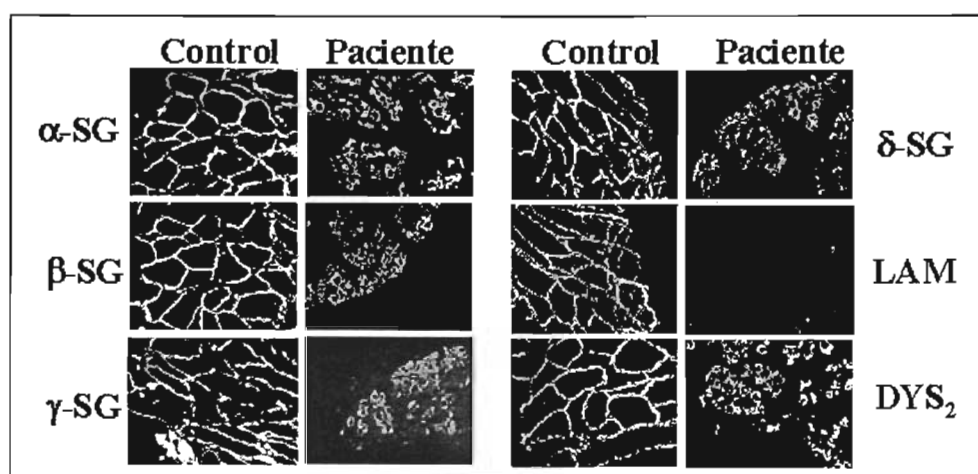


Figura 73. Imágenes de inmunofluorescencia del paciente 74. Donde se observa señal positiva tanto del control como del paciente 74 en las proteínas α -, β -, γ -, δ -sarcoglicanos y distrofina a diferencia de la proteína merosina que se encuentra sin señal.

Las características clínicas y los resultados de la inmunofluorescencia del paciente, llevaron a analizar la expresión del gene de laminina $\alpha 2$, el gen cuenta con 64 exones que fueron amplificados por PCR touch-down, los productos de DNA fueron obtenidos y secuenciados automáticamente. La secuencia nucleotídica del exón 54 del DNA del paciente reveló la presencia de un punto de mutación homocigoto en una posición nucleotídica 7781 (Fig.74) la mutación fue una transición de C por T que causa reemplazo de un residuo de arginina por un codón de paro, en la posición del aminoácido 2578 (R2578X)

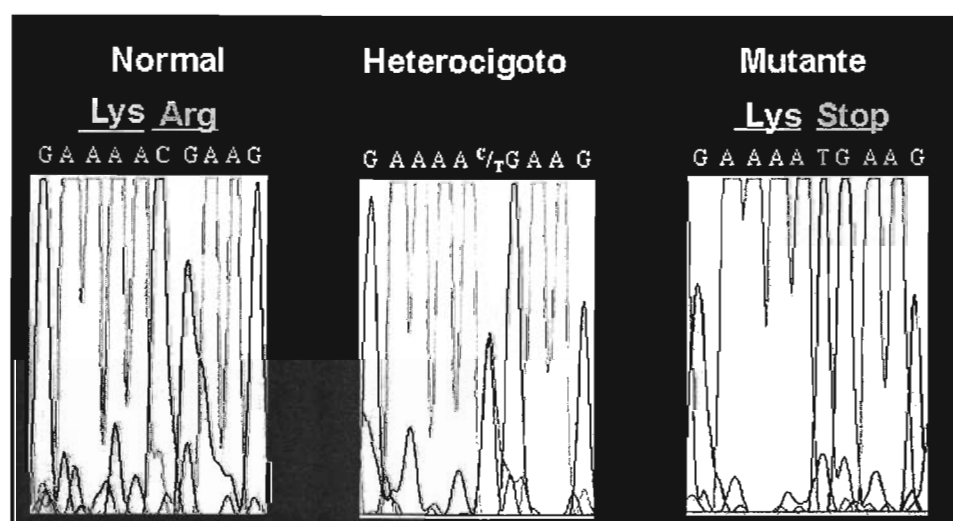


Figura 74. Electroferogramas de la secuencia nucleotídica del exón 54 del gen *LAMA 2*. Donde se muestra la secuencia normal, el heterocigoto y el mutante.

Para confirmar la mutación se llevó a cabo una secuenciación manual. (Fig. 75) mostrando una condición heterocigota del exón 54 del gen *LAMA2* en el DNA de los padres de la paciente.

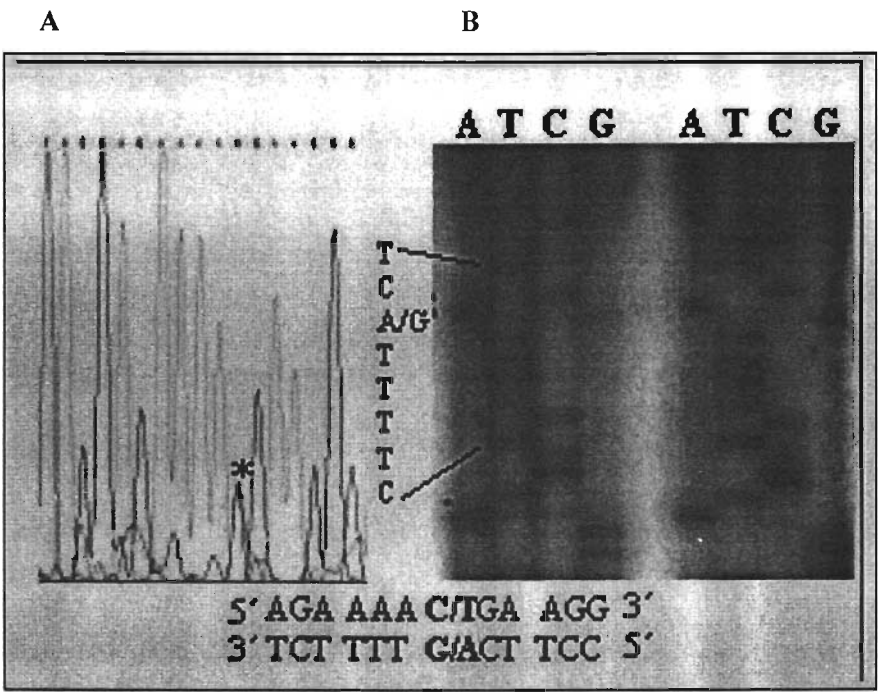


Figura 75. Secuenciación automatizada y manual del exón 54 del gen *LAMA 2* de los padres de la paciente 74. A condición heterocigota en un electroferograma; B misma condición heterocigota en una secuenciación manual.

Algunos miembros que conforman la familia del paciente 74 en los cuales, fué posible determinar la presencia de la mutación, obteniéndose las secuencias nucleotídicas del exón 54 del gen *LAMA2*, los individuos II-1, II-4, de igual forma para los individuos III-1, IV-1 y IV-2, el individuo III-2 fue inferida la portación de la mutación debido a que no fué posible realizarle el estudio, a los individuos IV-3 al 6 se determinó que no son portadores de la mutación. (Fig.76)

PEDIGRI

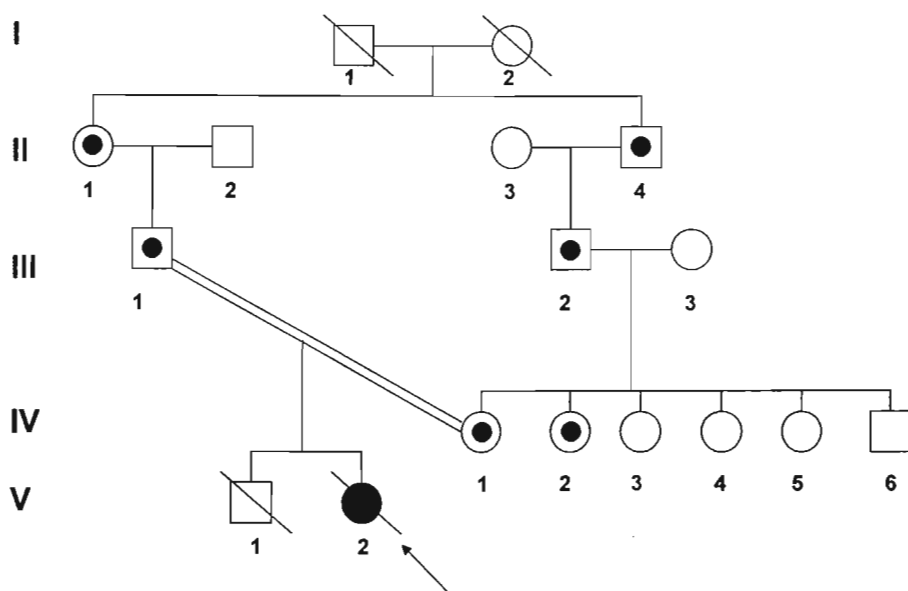


Figura 76. Pedigrí de la paciente 74. Los puntos oscuros muestran a los portadores de la mutación, en la generación II (individuos 1 y 4), en la generación III (individuos 1 y 2) de esta generación al individuo 2 no se le realizó el análisis de portadores de la mutación, sin embargo debido a la forma de transmisión de la enfermedad se de por hecho que es portador; generación IV individuos del 1 al 6 se les realizó el análisis de portadores de la mutación, pero solo resultaron positivos los individuos 1 y 2; la generación V el individuo 2 es la paciente74. homocigota para la mutación, el individuo 1 fallecido con las mismas características clínicas del individuo 2 de la misma generación.

Discusión.

Las distrofias musculares son enfermedades que se caracterizan por producir 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 (CGD) 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 la degradación de la fibra muscular (Vainzof et al., 1999).

El diagnóstico de las distrofias musculares es complicado debido a que los signos y síntomas se superponen y en ocasiones son muy similares entre las diferentes distrofias, actualmente 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 DGC, distrofina, sarcoglicanos y laminina se realizó un análisis mediante inmunofluorescencia indirecta en biopsias de músculo esquelético de 74 pacientes y se logró determinar una mutación en una paciente con ausencia de merosina, así como a los portadores de la mutación dentro de la familia.

Se encontraron 13 pacientes con ausencia de la proteína distrofina, con edad pediátrica entre 7 meses y 15 años, lo que coincide con lo ya descrito (Emery, 1993), con una CPK de el doble en magnitud de lo normal para la mayoría de los pacientes, musculatura general afectada y diagnosticados acertadamente en mas del 50% para DMD.

Los resultados de la ausencia de la proteína distrofina de los paciente 1 al 13 para el extremo amino y carboxilo, se deben probablemente a las mutaciones sobre el gen DMD que tiene un efecto en la expresión de la proteína, en este caso, como se encuentra totalmente ausente, se ha postulado que los pacientes con DMD tienen eliminaciones que dan origen a mutaciones sin sentido, resultando en una proteína truncada (Koenig et al., 1989).

Nueve pacientes con ausencia de distrofina presentaron disminución de complejo sarcoglicano, en al menos uno de los cuatro sarcoglicanos, los pacientes son 1, 3, 7, 6, 8, 9, 10, 11, 12 y 13. Diversos estudios han demostrado que la distrofina se encuentra asociada a un conjunto de proteínas formando un grupo de proteínas asociadas a distrofina (Ervasti et al., 1990; Yoshida et al., 1990). Cuando no hay presencia de la proteína distrofina, otras proteínas del complejo de proteínas asociadas a distrofina son desplazadas del sarcolema como consecuencia secundaria, lo que conduce a la degeneración progresiva del músculo y ocasiona problemas con la capacidad de regeneración y finalmente son sustituidas por tejido adiposo y tejido conectivo fibroso (Blake et al., 2002; Porter JD, 2000).

El rompimiento del enlace que une a la matriz extracelular con el citoesqueleto (Ibraghimov-Beskovnaya et al., 1992) causado por mutaciones en la distrofina o en los sarcoglicanos produce inestabilidad en el sarcolema, lo cual induce a las fibras musculares a ser susceptibles a necrosis al alterar el mecanismo regulador de calcio, evento principal en las distrofias musculares (Ibraghimov-Beskovnaya et al., 1992; Tay et al., 1990). El incremento de calcio intracelular deriva en la activación de proteasas específicas que provocan la necrosis.

De los 74 pacientes estudiados en este trabajo, el grupo más abundante de los confirmados en cuanto al diagnóstico, es el de los pacientes con ausencia de la proteína distrofina que no presentaron aparentemente antecedentes. Sin embargo se propone realizar un estudio de portadores para conocer este dato. 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 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 corresponden 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).

La diferencia en la tinción observada entre los casos 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 distrofina; mientras que las que lo mantienen, producen una proteína truncada parcialmente funcional (deficiente), la cual preserva el extremo carboxilo o amino. Esto explica las diferencias clínicas y de inmunofluorescencia entre las dos entidades y la variabilidad observada en los casos de DMB (Sewry, 2000). En este trabajo se encontraron pacientes con disminución de la proteína distrofina. Para el extremo amino normal no se presentó ningún paciente, para el extremo carboxilo cuatro pacientes fueron normales y ocho pacientes resultaron deficientes en ambos extremos de la proteína distrofina en diferentes gados.

La DMB se caracteriza por la debilidad muscular menos grave. Los pacientes con DMD/DMB pueden llegar a presentar retraso mental no progresivo causado, tal vez, por la expresión anormal de la distrofina de cerebro (Blake et al., 2000; Mehler, et al., 2000).

La edad de los pacientes con deficiencia de la proteína distrofina en este estudio se encuentra entre la segunda y tercera década de edad lo que corresponde con lo ya descrito (Emery, 2002). Seis pacientes con disminución de la proteína distrofina se encuentran en la primera década de vida, este dato concuerda con la falta de correlación entre las eliminaciones y la gravedad de la enfermedad (Love et al., 1989), ya que existen casos de pacientes con DMB, cuyo análisis molecular mostró la presencia de eliminaciones mayores, al menos dos exones más que en individuos con DMB. También se ha observado casos en los que una misma eliminación causó manifestaciones clínicas diferentes. Para explicar lo anterior se ha postulado que los pacientes con DMD tienen eliminaciones que dan origen a mutaciones sin sentido, resultando en proteínas truncadas. Contrariamente, en los individuos con DMB las eliminaciones dejan un marco de lectura abierto, o que permite

una proteína parcialmente funcional (Koenig et al., 1989). Como evidencia de estas hipótesis se demostró por inmunotransferencia de proteínas de biopsias de músculo esquelético, que la distrofina esta ausente o drásticamente reducida (< 3%) en pacientes con DMD y presente (>10%) en pacientes con DMB (Hoffman et al., 1988).

Una paciente femenina se encuentra incluida con deficiencia en de la proteína distrofina la edad es de 9 años, presenta deficiencia para las proteínas sarcoglicanos, y posee menor inmunofluorescencia en proteína distrofina, se han descrito tres formas para la distrofia muscular de Duchenne- Becker en mujeres, la número uno por el síndrome de Turner. dos: Traslocación del cromosoma X con un cromosoma autosómico y tres: por inactivación preferencial del cromosoma X (Lescaut et al., 2004).

En cinco pacientes además de la disminución de la proteína distrofina se detectó, que las proteínas del complejo sarcoglicano se encontraban con deficiencia, debido a que la distrofina se encuentra asociada a un conjunto de proteínas formando un grupo de proteínas asociadas a distrofina (Ervasti et al., 1990; Yoshida et al., 1990).

Las distrofias musculares de cintura se dividen en dos, tipo 1 (DMC1) para referirse a las autosómicas dominantes y de tipo 2 (DMC2) para aquellas que siguen un modelo de herencia autosómico recesivo, de las cuales ha surgido el grupo denominado sarcoglicanopatías, pues se ha identificado que son distrofias musculares que se originan por mutaciones en los genes que codifican los sarcoglicanos α , β , γ y δ ; clínicamente se

caracterizan por producir debilidad de los músculos de las cinturas pélvica y escapular, siguiendo un modelo de herencia autosómico recesivo (Bushby, 1996).

En este trabajo se observaron seis pacientes con disminución de las proteínas sarcoglicanos sólo una es del género femenino. Solo uno preresenta consanguinidad y otro diferente presenta antecedentes familiares. Para describirlos comenzaremos con el paciente en el que se encuentra ausente la proteína γ - sarcoglicano, así como la disminución β y δ - sarcoglicanos, al igual que los anticuerpos para distrofina en ambos extremos para el dominio amino terminal y el dominio carboxilo terminal. En éste paciente se propone que existe una deficiencia primaria de γ -sarcoglicano o distrofia muscular de cintura tipo 2C, debido a la ausencia total de la proteína, a diferencia de las otras que se encuentran disminuidas. Se han descrito pacientes con el mismo patrón de inmunofluorescencia y para explicar esta variación se ha sugerido que se debe a que los sarcoglicanos β y δ 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 α y γ -sarcoglicanos que no parecen tener efectos sobre los otros miembros del complejo (Vainzof et al., 1999).

Aunque éste paciente no se presenta como caso único en la familia ya que un tío materno presenta síntomas, 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 corresponde 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 genotipo grave, como lo que sucede con una mutación que se presenta muy comúnmente en el gen, la delta-521T. Sin embargo, se han descrito otro tipo de mutaciones que originan manifestaciones leves de la enfermedad (Nowak et al., 2000).

Para el paciente 27 solo la proteína beta sarcoglicano se encuentra deficiente, para el paciente 29 la disminución se presenta en alfa y para el paciente 31 sólo en delta sarcoglicano, siendo muy común que el sarcoglicano que posee la mutación primaria sea el que esta ausente o más severamente reducido, de tal manera que la expresión de los sarcoglicanos en la inmunofluorescencia pueda variar, pudiéndose detectar grados variables que van desde ausencia total a reducción leve. Sin verse afectada la expresión de la distrofina (Sewry, 2000). Este resultado contradice lo que se pensaba con 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 el análisis de inmunofluorescencia para detectar sarcoglicanopatías se usara únicamente el anticuerpo α -sarcoglicano, dando por hecho que el resto de las proteínas se encontraran disminuidas (Pogue et al., 2001).

El paciente 28 presenta disminución de los cuatro sarcoglicanos, pero mas marcadamente de alfa sarcoglicano, para el paciente 30 presenta dos sarcoglicanos deficientes alfa y gama sarcoglicanos, para estos pacientes se propone una inmunoelectrotransferencia que por medio de una reacción colorimétrica se observaria la proteína que ésta en menor cantidad lo que conduciría a la proteína con la mutación primaria, 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).

Sería de gran importancia identificar las mutaciones responsables en estos pacientes para la caracterización del espectro mutacional en los genes sarcoglicanos en pacientes mexicanos.

Los pacientes estudiados en quienes no se encontraron anomalías de inmunofluorescencia, no podemos excluir la posibilidad de distrofia muscular, si se toma en cuenta que se utilizaron anticuerpos para identificar seis diferentes proteínas relacionadas con distrofia muscular; Actualmente se han reconocido diferentes distrofias musculares de cintura, cinco autosómicas dominantes, ocho autosómicas recesivas, distrofias musculares distales, distrofias musculares congénitas y las ampliamente descritas DMD-DMB ligadas al cromosoma X; Dentro de estos grupos hay una gran diversidad de mecanismos involucrados en la fisiopatología, relacionados no solo al defecto primario del gen, sino a otros factores tanto genéticos como ambientales, que pueden influir en los efectos de una mutación (Bushby, 1999).

Así por ejemplo, el paciente (54) presenta los síntomas y signos de una distrofia muscular, el pedigrí deja ver muy poco del modo de transmisión, correspondiente a una distrofia recesiva, con antecedentes de una hermana, el diagnóstico previo describe una distrofia de cinturas posiblemente causada por la deficiencia o ausencia de una de las proteínas como disferlina, teletonina o calpaína-3 donde el modo de transmisión es recesivo. La paciente 57 es un caso único en la familia, no se presenta consanguinidad, sin embargo presenta un

cuadro clínico de una disferlinopatía (Comunicación personal Dr L.Ruano), que fácilmente se corroboraría con un anticuerpo dirigido hacia la proteína disferlina.

El paciente número 65 muestra signos y síntomas de distrofia muscular sin consanguinidad, pero con antecedentes, el árbol genealógico muestra el modo de transmisión de la enfermedad como autosómica dominante lo cual llevaría a pensar en cualquiera de las distrofias de cintura de tipo I, titina, colágena VI, proteinasa miotónica etc.(Cohn et al., 2000).

La paciente 78 con edad de 8 meses de edad y muerta a los 12 meses, provenía de una familia consanguínea, con fenotipo clásico de distrofia muscular congénita (DMC) núnca caminó y las imágenes de resonancia magnética (IRM) presenta cambios en la materia blanca del cerebro, como se ha reportado en personas con ausencia total de laminina α -2 (Tome et al., 1994; Voit, 1997).

Resultados obtenidos por inmunofluorescencia con un anticuerpo que reconoce laminina α -2 confirmaron la ausencia de la proteína en la superficie de la fibra muscular. En contraste con α , β , γ , δ sarcoglicanos y distrofina que se encontraron presentes en la membrana muscular. Por ensayo de inmunofluorescencia, no fué posible determinar donde se encontraba la alteración en la expresión de esta proteína, sin embargo, Jones et al., (1998) reporta un caso con la ausencia de laminina α -2 con teñido anormal de distrofina y α - sarcoglicano.

Pegogaro et al (1998) observó en un estudio de pacientes con ausencia de laminina α -2, que la mayoría presentaba mutaciones primarias en *LAMA2*. Sin embargo, esto no ha sido siempre determinado que la ausencia de laminina α -2 es debido a la mutación primaria de *LAMA2* (Pegogaro et al., 1998; Guicheney et al., 1998). Jones et al (2001) muestra en una serie de casos en donde las mutaciones confirmadas con la anormalidad primaria de laminina α -2, han sido de solo el 25 % de los casos.

La paciente descrita en nuestro estudio tiene una mutación homocigota que corresponde a una substitución de C por T, produciendo un codon paro (R2578X). La cual esta localizada en el carboxilo terminal de laminina α -2 y predice la pérdida de 532 aminoácidos, la cual no permite la unión de merosina con alfa distroglicano (Yamada et al., 1994). La interrupción de la conexión entre la matriz extracelular con el citoesqueleto puede conducir a la membrana basal a la inestabilidad y a la fibra muscular a la necrosis (Xu et al. 1994; Campbell 1995; Minetti et al. 1996; Osari et al. 1996). Pacientes con similar fenotipo y mutaciones en otros codones de dominio G de laminina α -2 han sido reportados (Pegogaro et al. 1998; Allamand and Guicheney. 2002).

Análisis de portadores de la mutación en parientes muestran que la abuela paterna, un bisabuelo materno, y una hermana de la madre son portadoras de la mutación. Estos resultados sugieren que la mutación fue originada en al menos tres generaciones anteriores y ha sido segregada en una pequeña comunidad endogámica.

Conclusiones.

Se analizaron por características clínicas compatibles con distrofia muscular, estudios bioquímicos tales como niveles séricos elevados de CPK, alteraciones histopatológicas por microscopía compuesta e inmunofluorescencia indirecta a 74 pacientes diagnosticados clínicamente con distrofia muscular.

Trece pacientes resultaron con ausencia de la proteína distrofina, 12 con deficiencia de la proteína distrofina, 6 con deficiencia en sarcoglicanos, 36 pacientes con presencia de todas las proteínas estudiadas y seis pacientes que no fué posible hacerles el estudio debido a lo avanzado de la enfermedad y finalmente un paciente con ausencia de merosina que como resultado se publicó (Anexo1).

Se clasificó por grupos a los pacientes de acuerdo a los resultados de inmunofluorescencia indirecta que se les realizó.

Se creó un banco de biopsias musculares de todos los pacientes, incluso de aquellos individuos a los cuales no fue posible establecer el tipo de distrofia muscular.

Fué posible determinar a nivel de mutación a una paciente con distrofia muscular congénita, y a los portadores dentro de la familia de la paciente, a los cuales se le proporcionó asesoramiento genético.

Finalmente se encontró un mayor número de casos con DMD-DMB, mientras que los casos de distrofia muscular de cintura y distrofia muscular congénita se presentaron con menos frecuencia en los pacientes estudiados.

El diagnóstico por inmunofluorescencia es una herramienta útil para establecer un diagnóstico más certero en pacientes con distrofias musculares.

Bibliografia

- Allamand V, Sunada Y, Salih MA, Straub V, Ozo CO, Alturaiki MH, Akbar M, Koto T, Colognato H, Zhang X, Srakin LM, Yurchenco PD, Tryggvason K, Campbell KP. 1997 Mild congenital muscular dystrophy in two patients with an internally deleted laminin alpha-2- chain. *Hum Mol Genet* 6: 747-752.
- Allamand V, Guicheney P (2002) Merosin deficient congenital muscular dystrophy, autosomal recessive (MDC1A MIM#156225, LAMA2 gene coding for alpha2 chain of laminin). *Eur J Hum Genet* 10: 91-94.
- Andrew A, Groh M, McNally E (2000). Sarcoglycans in muscular dystrophy. *Microscopy and technique*. 48: 167-180.
- Angelini C, Fanin M, Freda MP, Duggan DJ, Siciliano G, Hoffman EP. (1999). The clinical spectrum of sarcoglycanopathies. *Neurology*, 52:176-9.
- Bakker E, Van Broeckhoven C, Bonten EJ, van de Vooren MJ, Veenema H, Van Hul W, Van Ommen GJB, Vandenberghe A, Pearson PL (1987) Germline mosaicism and Duchenne muscular dystrophy mutations. *Nature* 329:554-556.
- Ben Hamida M, Ben Hamida CH, Zouari M, Belal S, Hentati F (1996) Limb girdle muscular dystrophy 2C: Clinical aspects. *Neuromuscular Disorders* 6: 496-494.
- Barresi R, Moore SA, Stolle A, Mendell R, Campbell K.P. (2000). Expression of β -Sarcoglycan in smooth muscle and its interaction with the smooth muscle sarcoglycan-sarcospan complex. *J. Biol. Chem.* 275:38554-38560
- Betto R, Senter L, Ceoldo S, Tarricone E, Biral D, Salviati G. (1999). Ecto-ATPase activity of alpha-sarcoglycan (adhalin). *J. Biol. Chem.*, 274:7907-7912.
- Blake DJ, Weira, Newley SE, and Davies E. (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev* 82: 291-329.
- Blake DJ and Kroger S. (2000). The neurobiology of Duchenne muscular dystrophy: Learning lessons from muscle? *Trends Neurosci* 23: 92-99
- Bonne G, Mercuri E, Muchir A, (2000) Clinical and molecular genetic spectrum of autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy due to mutation of lamin A/C gene. *Ann Neurol* 28; 170-180.
- Bione S, Maestrini E, Rivella S, Mancini M, Regis S, Romero G, Toniolo D. (1994) Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy. *Nat Genet.* 8;323-327
- Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S, Becane HM, Hammouda EH, Merlini L, Muntoni F, Greenberg CR, Gary F, Urtizberea JA, Duboc D, Fardeau M, Toniolo D, Schwartz K. 1999. mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular Dystrophy. *Nat Genet* 21: 285-288.
- Bonnemann CG, Modi R, Noguchi S, Mizuno Y, Yoshida M, Gussoni E, McNally EM, Duggan DJ, Angelini C, Hoffman EP. 1995 Beta sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy type with loss of the sarcoglycan complex. *Nat Genet*, 11:266-273.
- Bushby KM (1999). The limb-girdle muscular dystrophies-multiple genes, multiple mechanisms. *Human Mol Genet* 8: 1875-1882.

- Campbell KP (1995). Three muscular dystrophies: Loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* ;80:675-679.
- Campbell KP, Kahl SD. 1989. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature* 338:259-262.
- Carrie A, Piccolo F, Leturcq F, De toma C, Azibi K, Beldjord C, Vallat JM, merlin L, Voit T, Cegri C, Urtizberea JA, Romero N, Tome FM, Fardeau M, Sunada Y, Campbell KP, Kaplan JC, Jean Pierre M. (1997). Mutational diversity and hot spots in the alfa-sarcoglycan gene in autosomal recessive muscular dystrophy (LGMD2D). *J. Med Genet* 34:470-475.
- Cartegni L, di barletta MR, Barresi R, Squarzone S, Sabatelli P, Mareldi N, Mora M, Di Blasi C, Cornelio F, Merlini L, Villa A, cobianchi F, Toniolo D. 1997. Heart-specific localization of emerin: new insights into Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 6:2257-2264.
- Cohn R, MD and Campbell K. (2000) Molecular basis of muscular dystrophies, *Muscle Nerve* 23: 1456-1471
- Cohn RD, Durbecq M, Moore SA, Coral-Vázquez R, Prouty S, Campbell KP. (2001). *J. Clin. Invest.* 107:R1-R7.
- Cohn RD, hermann R, Sorokin L, Wewer UM, Voit T. 1998 Laminin alpha-2 Chain deficient congenital muscular dystrophy: Variable epitope expression in the severe and mild cases. *Neurology.* 52:94-100
- Coral-Vázquez R, Cohn RD, Moore SA, Hill JA, Weiss RM, Davidson RL, Straub V, Barresi R, Bansal D, Hrstka RF, Williamson R, Campbell KP. (1999). Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle a novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy. *Cell*, 1999:465-474.
- Coral-Vazquez R, Navarrete C., Mendoza J., Barraza A., Salamanca F (2000) Avances en distrofias musculares, *Rev. Med. IMSS* 38(2):155-164.
- Cox F., Kunkel L.M. 1997. Dystrophies and heart disease. *Curr. Opin. Car* 12:329-343.
- Crosbie RH, Heighmay J, Venzke DP, Lee JC, Campbell KP. 1997 Sarcospan the 25 Kda Transmembranw component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chemistry* 272:31221-31224.
- Darin N, Tulinius M. (2000) Neuromuscular disorders in childhood: a descriptive epidemiological study from western Sweden. *Neuromuscul Disord* ; 10:1-9
- Den Dunner JT, Grootsholten PM, Bakker E, Blonden LA, (1989) Topology of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA análisis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *Am J Hum genet* 45:835-847.
- Don R.H. et al (1991). Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acid Res.* 19: 4008.
- Dubowitz V. 1996 41st ENMC international workshop on congenital muscular dystrophy, 8-10 March Naarden, The Nerherlands *Neuromuscul Disord* 6:295-306.
- Dubowitz V. Fardeau M. 1995. Workshop report: preceedings on the 27th ENMC sponsored worshop on congenital muscular dystrophy. *Neuromuscul disord.* 5:253-258
- Duclos F, Broux O, Bourg N, Straub V, Felman GL, Sunada Y, Lim LE, Piccolo F, Cutshall S, Gary F, Quetier F, Kaplan JC, Jackson CE, Beckman JS, Campbell KP. 1998a. Beta sarcoglycan: genomic analisis and identification of a novel missense mutation in the LGMD2E Amish isolate. *Neuromusc Disord* 830-38
- Durbecq M, Campbbell KP. (1999). Biochemical characterization of the epithelial dystroglycan complex. *J. Biol. Chem.*, 274:26609-26616.

Durbecq J, Cohn RD, Moore SA, Hrstka RF, Allamand V, Davidson BL, Williamson R, Campbell KP.(2000) Disruption of the β -sarcoglycan gene reveals a complex pathogenetic mechanism for LGMD 2E. *Mol Cell* ;5:141-151.

Emery AEH. (1993) *Duchenne muscular dystrophy*, 2nd edn. Oxford university Press.

Emery AE, Dreifuss FE.(1966). Unusual type of benign x-linked muscular dystrophy. *J Neurosurg Psychiatry*. 29:338-342.

Emery AEH. (2002) Muscular Dystrophy into the new millenium. *Neuromuscul Disord*. 1:132-137.

Emery AEH.(1991) Populations frequencies of inherited neuromuscular disease- a World survey. *Neuromuscul Disord* 1; 19-29.

Engel AG, Yamamoto M, Fischbeck K. 1994. Dystrophinopathies. In : Engel AG, Franzini- Armstrong C, editors. *Myology: basis and clinical*. Vol 2. New York: McGraw-Hill. P 1133-1191.

Ettinger AJ, Feng G, Sanes JR. 1997. Epsilon-sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutate in limb-girdle muscular dystrophy 2D. *J Biol Chem.*, 272:32534-32538.

Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, Gaver MG, and Cambell KP (1990). Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* 345:315-319.

Ervasti JM, Campbell KP(1991). Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 66:1121-1131.

Fairley EA, Kendrick-jones J, Ellis JA. 1999. The Emery-Dreifuss muscular dystrophy phenotype arises from aberrants targeting and binding of emerin at the inner nuclear membrane. *J Cell Sci* ; 112:2571-2582.

Fatkin D, MacRae C, Sasaki T, Wolff MR, Porcu M, Freneaux M, Aterton J, Vidailler HJ jr, Spudich S, De Girolami U, Seimand JG, Seimand C, Muntoni F, Muehle G, Johson W. McDonough B, 1999. Missense mutations in the rod domain of lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *N Engl J Med*. 341:1715-1724.

Gregorio CC. Granzier H, Sorimachi H, albeit S. 1999 Muscle assembly : a titanic achievement.? *Curr Opin Cell Biol*: 11:18-25.

Grimm T. 1986. Becker dystrophy. In: Engel AG, Barkk BQ, editors. *Myology: basis and clinical*. Vol 2. New York: McGraw-Hill. P 1241-1250.

Guicheney P, Vignier N, Zang X, He Y, Cruaud C, Frey V, Helbling-Leclere A, Richard P, Estournet B, Merlini L, Topaloglu H, Mora M, Harpey JP, Haengelli CA, Barois A, Hainque B, Schwartz K, Tome FM, Fardeau M, Tryggvason K, (1998). PCR based mutation screening of the laminin alpha2 gene (LAMA2): Application to prenatal diagnosis and search for founder effects in congenital muscular dystrophy. *J. Med Genet* 35: 211-217.

Hack AA, Ly CT, Jiang F, Clendenin CJ, Sigrist KS, Wollmann RL, McNally EM. (1998). Gamma-sarcoglycan deficiency leads to muscle membrane defects and apoptosis independent of dystrophin. *J. Cell. Biol.* 142:1279-1287.

Hecker, H. and Roux K.H. (1996). High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *Bio Techniques*. 20:478-485.

Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51:919-928.

Hoffman EP, Fischbeck KH, Brown RH, Johnson M, Medori R, Loike JD, Harris JB, Waterston R, Brooke M, Specht L, Kupsky W, Chamberlain J, Caskey CT, Shapiro F, Kunkel LM. (1988) Characterization of dystrophin in muscle –biopsy specimens from patients with Duchenne’s or Becker’s muscular dystrophy. *N Engl J Med* 318:1363-1368.

Ibraghimov-Beskovnaya O, Ervasti JM, Levveille CJ, Slaughter CA, Sernet SW and Campbell KP (1992). Primary structure of dystrophin-associated glucoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 355: 696-702.

Jones KJ, Kim SS, North KN (1998) Abnormalities of dystrophin, the sarcoglycans, and laminin alpha2 in the muscular dystrophies. *J. Med Genet* 35: 379-86.

Jones KJ, Morgan G, Johnston H, Tobias V, Ouvrier RA, Wilkinson I, North KN (2001). The expanding phenotype of laminin alpha2 chain (merosin) abnormalities: case series and review. *J Med genet* 38: 649-657

Koenig M, Hoffman E, Bertelson C, Monaco A, Feener C, Kunkel L. (1987), Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50:509-517.

Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. (1988). The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 53:219-228.

Koenig M, Beggs A and Moyer M, (1989).. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J. Hum Genet* 45: 498-506.

Lebakken CS, Venzke DP, Hrstka RF, Consolino C, Faulkner JA, Williamso RA, Campbell KP. (2000). Sarcospan-deficient mice maintain normal muscle function. *Mol. Cell. Biol.* 20:1669-1677.

Lescaut W., Butori C., Soriani M. H., Desnuelles C. (2004). A propos de quatre cas fémis de dystrophie musculaire de Duchenne et Becker. *Elsevier* 25: 464 -467.

Leivo I, Engvall E. (1988). Merosin, a protein specific for basement membranes of Schwann cell, striated muscle, and trophoblast, is expressed late in nerve end muscle development. *Proc Natl Acad Sci* 85:1544-1548.

Lim LE, Duclos F, Broux O, Bourg N, Sunada Y, Allamand V, Meyer J, Richard I, Moomaw C, Slaughter C, 1995 Beta sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12. *Nat Genet* 11:257-265.

Love DR, Forrest SM, Smith TJ, England S, Flint and Davies KE (1989). Molecular analysis of Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Br Med Bull* 45: 659-680.

Matheux DK. (2003) Muscular dystrophy overview. *Neurol Clin*; 21:795-816.

Matthew T.W. Mc Nally E.M. (2003) Sarcoglycans in Vascular Smooth and striated muscle. Elsevier inc TVM 13:238-243

Matsamura K, Saito F, Yamada H, Hase A, Sunada Y, Shimizu, T. (1999). Sarcoglycan complex: a muscular supporter of dystroglycan-dystrophin interplay? *Cellular and Mol. Biol.*, 45:751-762

Mayans O, Van der ven PF, Wilm M, Mues A, Young P, Furst DO, Wilmanns M, Gautel M.1998.Structural basis for activation of the titin kinase domain during myofibrillogenesis. *Nature*. 395:863-869.

Melacini P, Fanin M, Duggan DJ, Freda MP, Berardinelli A, Danieli GA, Barchitta A, Hoffman EP, Dalla-Volta S, Angelini C. (1999). Heart involvement in muscular dystrophies due to sarcoglycan gene mutations. *Muscle Nerve*, 22:473-479.

- Mehler MF, (2000). Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. *Brain Res* 32: 277-307
- Miller RG, Layzer RB, Mellenthin MA, Golabi M, Francoz RA, Mall JC. 1995. Emery-Dreifuss muscular dystrophy with autosomal dominant transmission. *Neurology* 35:1230-1233.
- Minetti C, Bado M, Morreale G, Pedemonte M, Cordone G (1996). Disruption of muscle basal lamina in congenital muscular dystrophy with merosin deficiency. *Neurology* 46: 1354-1358.
- Mizuno Y, Noguchi S, Yamamoto H, Yoshida M, Nonaka I, Hirai S, Ozawa E. (1995). Sarcoglycan complex is selectively lost in dystrophic hamster muscle. *Am J Pathol* 146: 530-536.
- Monaco AP, Neve RL, Colletti FC, Beltelson CJ, Kunit DM, Kunkel LM, 1986. Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* 323:646-650.
- Moreira ES, Vainzof M, Marie SK, Nigro V, Zatz M, Passos-Bueno MR. 1998. A first missense mutation in the delta sarcoglycan gene associated with a severe phenotype and frequency of limb-girdle muscular dystrophy type 2F (LGMD2F) in Brazilian sarcoglycanopathies. *J. Med Genet* 35:951-953.
- Muntoni F, Cau M, Congiu R, Ganau A, Arvedi G, Mateddu A, Marrosu MG, et al. 1993). Deletion of dystrophin muscle-promoter region associated with X-linked dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 329:921-5.
- Nagano A, Koga R, Ogawa M, Kurano Y, Kawada J, Okada R, Hayashy YK, Tsukara T, Arahata K. 1996. Emerin deficiency at nuclear membrane in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 12:254-259.
- Nigro V, de Sa Moreira E, Piluso G, Vainzof M, Belsito A, Politano L, Puca AA; Passos-Buenos MR, Zatz M. 1996^a. Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy, LGMD2F, is caused by a mutation in the delta-sarcoglycan gene. *Nat Genet* 14:195-198.
- Noguchi S, McNally EM, Ben Othmane K, Hagiwara Y, Mizuno Y, Yoshida M, Yamamoto H, Bonnemann CG, Gussoni E, Denton PH. Et al (1995). Mutations in the dystrophin-associated protein gamma sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. *Science* 270:819-822.
- Noguchi S, Wakabayashi E, Imamura M, Yoshida M, Ozawa E (2000). Formation of sarcoglycan complex with differentiation in cultured myocytes. *European Journal of Biochemistry*. 267: 640-648.
- Norwood FLM, Sutherland-Smith AJ, Keep NH, Kendrick-Jones J. (2000) The structure of the N-terminal actin-binding domain of human dystrophin and how mutations in this domain may cause Duchenne or Becker Muscular Dystrophy. *Structure* ; 8 481-491
- Nowak K, Walsh P, Jacob R, Johnsen R, Peverall J, McNally E, Wilton S, Kakulas B, Iaing N (2000) Severe γ -sarcoglycanopathy caused by a novel missense mutation and a large deletion. *Neuromuscular Disorders*. 10: 100-107.
- Osari S, Kobayashi O, Yamashita Y, Matsushita T, Goto M, Tanabe Y, Tanabe Y, Migita T, Nonaka I (1996) Basement membrane abnormality in merosin-negative congenital muscular dystrophy. *Acta Neuropathol (Berl)* 91: 332-336.
- Ozawa E, Noguchi S, Mizuno Y, Hagiwara Y, Yoshida M. (1998) From dystrophinopathy to sarcoglycanopathy: evolution of a concept of muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 21: 421-438
- Ozawa E, Yoshida M, Suzuki A, Mizuno Y, Hagiwara Y and Noguchi S. (1995). Dystrophin associated proteins in muscular dystrophy. *Hum. Molecular Genetics*. 4: 1711-1716.

Pennacchio LA, Rubin EM. (2001) Genomic strategies to identify mammalian regulatory sequences. *Nat Rev* ; 2: 100-109.

Porter JD (2000). Introduction to muscular dystrophy. *Microscopy Research and Tecnieque* 48 : 127-130.

Pogue R, Anderson L, Pyle A, Sewry C, Pollitt C Johnson M, Davison K, Moss J, Mercuri E, Muntoni F, Bushby K (2001) Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb girdle muscular dystrophies. *Neuromuscular Disorders*. 11: 80-87.

Pegogaro E, Marks H, Garcia CA, Crawford T, Mancias P, Connolly AM, Fanin M, Martinello F, Trevisan CP, Angelini C, Stella A, Scavina M, Munk RL, Servidei S, Bonnemann CC, Bertolini T, Acsadi G, Thompson CE, Gagnon D, Hoganson G, Carver N, Zimmerman RA, Hoffman EP (1998) Laminin alpha2 muscular dystrophy: genotype/phenotype studies of 22 patients. *Neurology* 51: 101-10.

Roberds SL, Leturcq F, Allamand V, Piccolo F, Jeanpierre M, Anderson RD, Lim LE, Lee JC, Tome FM, Romero NB, 1994, Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell* 78:625-633.

Straub V, Ettinger AJ, Durbeej M, Venzke DP, Cutshall S, Sanes J, Campbell, KP. (1999). Epsilon-sarcoglycan replaces alpha-sarcoglycan in smooth muscle to form a unique dystrophin-glycoprotein complex. *J. Biol. Chem.*, 274: 27989-27996.

Sewry CA (2000). Immunocytochemical analysis of human muscular dystrophy. *Microscopy Research and technique* 48; 142-154.

Tan E, Topaloglu H, Sewry C, Zorlu Y, Naom I, Erdem S, D'Alessandro M, Muntoni F, Dubowitz V. (1997). Late onset muscular dystrophy with cerebral white matter changes due partial merosin deficiency. *Neuromuscul. Disord.*, 7:85-89.

Tay JSH, Low PS and Lee WS (1990). Dystrophin function : calcium related rather than mechanical. *Lancet* 335: 983-987.

Tennyson CN, Klamut HJ, Worton RG. (1995). The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced. *Nat Genet* 9:184-190.

Tome FM, Evangelista T, Leclerc A, Sunada Y, Manole E, Estournet B, Barois A, Campbell KP, Fardeau M (1994). Congenital muscular dystrophy with merosin deficiency. *C R Acad Sci III* 317:351-357.

Tome FM (1999). The saga of congenital muscular dystrophy. *Neuropediatrics* .30:55-65.

Tome FMS, Guicheney P, Fardeau M (1998) Congenital muscular dystrophies.. In: *Neuromuscular disorders: Clinical and molecular genetics*. Chichester, UK: Wiley. P.21-57.

Torricelli E.R. (2004) Actualización en distrofias musculares, *Revista de Neurologia*, 39(9):860-871

Tsubata S, Bowles KR, Vatta M, Zintz C, Titus J, Muhonen L, Bowles NE, Towbin JA. (2000). Mutations in the human

Ueyama H, Kumamoto T, Nagao S, (2001) A new dysferlin gene mutation in two japonese families with limb-girdle muscular dystrophy 2B and Miyoshi myopathy. *Neuromuscular disord* 11: 139-145.

Valle G, Faulkner G, De Antoni A, Pacchioni B, Pallavicini A, Panolfo D, tiso N, Toppo S, Trevisan S, Lanfranchi G. 1997. Telethonin, a novel sarcomeric protein of Herat and skeletal muscle. *FEBS lett* . 415:163-168.

Vainzof M, Moreira E, Ferraz G, Passos-Bueno M, Marie S, Zatz M (1999). Further evidence for the organization of the four sarcoglycans proteins within the dystrophin glycoprotein complex. *European journal of genetics* ; 7 : 252-254.

Van der Kooi AJ, Barth P, Busch H, de Haan R, Ginjaar H van Essen A. van Hoof, Howeler 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.(1996). The clinical spectrum of limb girdle muscular dystrophy: a survey in the Netherlands. *Brain* ;119 : 1471-1480.

Voit T.(1997) Congenital muscular dystrophies. *Brain Dev.* 20:65-74.

Wheeler, M.T. Zarnegar, S. y McNally E.M.(2002) ζ -Sarcoglycan, a novel component of sarcoglycan complex, is reduced in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 11(18):2147-2154

Werneck LC, Bonilla E. 1990. Distrofina na diferenciacao das distrofias de Duchenne e Becker: Estudo xImuno-histoquimico comparado como estadio clinico, enzimas séricas e biopsia muscular. *Arq n the europsiquiat* 48:454-464.

Williamson RA, Henry MD, Daniels KJ, Hrstka RF, Lee JC, Sunada Y, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Campbell KP 1997. Dystroglycan is essential for early, Howelermbyronic development:disruption of Reichert's membrane in Dagl-null mice. *Hum. Mol. Genet.*,6:831-41.

Whitelaw E, Martin DIK. (2001) Retrotransposons as epigenetic mediator of phenotypic variations in mammals. *Nat Genet* ; 27: 361-365.

Worton R. 1995. Muscular dystrophy: diseases of the dystrophin-glycoprotein complex. *Science* 270:755-756.

Xu H, Chistmas P, Wu XR, Wewer UM, Engvall E (1994) Defective muscle basement membrane and lack of M-laminin in the dystrophyc dy/dy mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 5572-5576.

Yoshida M. Ozawa E. (1990) Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma. *J Biochem (Tokyo)* 108:748-752.

Zimprich A, Grabowski M, Asmus F, Naumann M, Berg D, Bertram M, Scheidtmann K, Kern P, Winkelmann J, Müller-Myhsok B, Riedel L, Bauer M, Müller T, Castro M, Meitinger T, Strom TM, Gasser T. (2001). Mutations in the gene encoding ϵ -sarcoglycan cause myoclonus–dystonia syndrome. *Nature Genetics*, 29:66-69.

ANEXO

SHORT COMMUNICATION

Ramon M. Coral-Vazquez · Haydee Rosas-Vargas
Pedro Meza-Espinosa · Irma Mendoza
Juan C. Huicochea · Guillermo Ramon · Fabio Salamanca

Severe congenital muscular dystrophy in a Mexican family with a new nonsense mutation (R2578X) in the laminin α -2 gene

Received: August 22, 2002 / Accepted: November 11, 2002

Abstract The congenital muscular dystrophies (CMDs) are a heterogeneous group of autosomal recessive disorders. Approximately one half of cases diagnosed with classic CMD show primary deficiency of the laminin α 2 chain of merosin. Complete absence of this protein is usually associated with a severe phenotype characterized by drastic muscle weakness and characteristic changes in white matter in cerebral magnetic resonance imaging (MRI). Here we report an 8-month-old Mexican female infant, from a consanguineous family, with classical CMD. Serum creatine kinase was elevated, muscle biopsy showed dystrophic changes, and there were abnormalities in brain MRI. Immunofluorescence analysis demonstrated the complete absence of laminin α 2. In contrast, expression of α -, β -, γ -, and δ -sarcoglycans and dystrophin, all components of the dystrophin-glycoprotein complex, appeared normal. A homozygous C $\rightarrow$ T substitution at position 7781 that generated a stop codon in the G domain of the protein was identified by mutation analysis of the laminin α 2 gene (*LAMA2*). Sequence analysis on available DNA samples of the family showed that parents and other relatives were carriers of the mutation.

Key words Congenital muscular dystrophy · Laminin α 2 · Merosin · *LAMA2* · Immunofluorescence · Mutation

Introduction

Congenital muscular dystrophies (CMDs) are a heterogeneous group of neuromuscular disorders characterized by muscular dystrophy and are further divided according to different degrees of central nervous system involvement (Banker 1994). In this group is included classic or pure CMD (OMIM 156225), Fukuyama CMD (OMIM 253800), α 7 integrin congenital myopathy (OMIM 600536), rigid spin CMD (OMIM 602771), and muscle-eye-brain disease (OMIM 253280). The classic form of CMD without mental deficiency presents muscle weakness with hypotonia and weakness at birth or within the first few months of life (Tome et al. 1994). Levels of serum creatine kinase (CK) are normal or moderately raised. Although intelligence remains normal, magnetic resonance imaging (MRI) of the brain shows white matter changes (Tome et al. 1994; Dubowitz 1994). Deficient expression of the laminin α 2 chain has been identified in approximately 50% of cases with classical CMD (Sewry et al. 1995). Laminin α 2 CMD, also known as merosin-deficient CMD (MDC1A), shows autosomal recessive inheritance (Tome et al. 1994); the locus of the gene (*LAMA2*) was located by linkage analysis on 6q2 (Hillarie et al. 1994; Naom et al. 1997) and is composed of 64 exons (Zhang et al. 1996). Participation of *LAMA2* in CMD was also determined by identification of mutations in the gene in some patients (Helbling-Leclerc et al. 1995; Pegoraro et al. 1996; Guicheney et al. 1998).

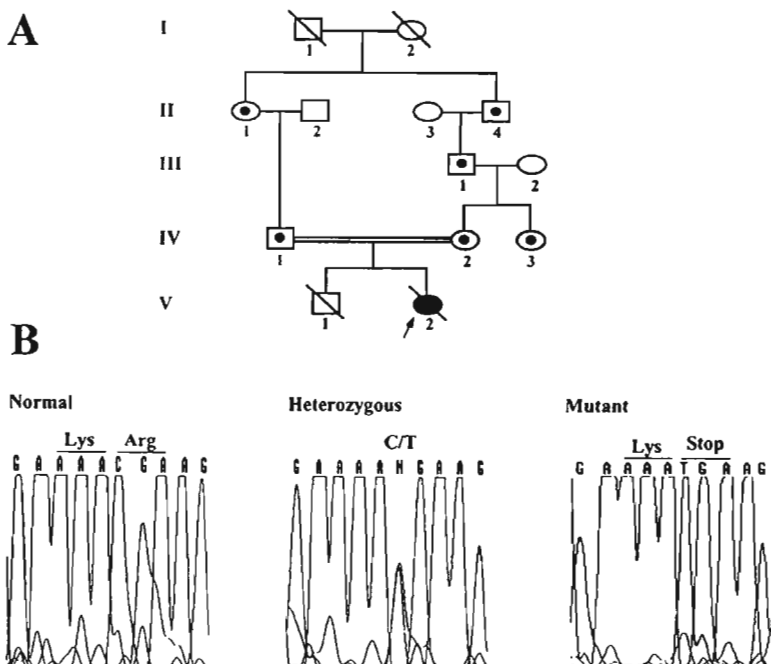
It has been observed that the severe phenotype is caused by mutations that drastically affect the expression of *LAMA2* or the structure of the protein (Nissinen et al. 1996; Pegoraro et al. 1996; Guicheney et al. 1998; Pegoraro et al. 1998). On the other hand, a wide range of milder phenotypes in CMD patients are caused by partial merosin deficiency, which can be produced by an in-frame deletion in *LAMA2* (Allamand et al. 1997), or mutations that permit production of a partially functional protein or a reduced amount of normal protein (Naom et al. 1998, 2000).

R.M. Coral-Vazquez (✉) · H. Rosas-Vargas · P. Meza-Espinosa · I. Mendoza · J.C. Huicochea · F. Salamanca
Unit of Medical Research in Human Genetics, Children's Hospital, XXI Century National Medical Center-IMSS, A.V. Cuauhtemoc No. 330, Col. Doctores, Delegación Cuauhtemoc, Mexico City 06725, Mexico
Tel.: +52-55-627-6941; Fax: +52-55-761-0952
e-mail: rmcoral@correo.unam.mx

G. Ramon
Pathology Department, Children's Hospital, XXI Century National Medical Center-IMSS, Mexico City, Mexico

The first two authors contributed equally to this work.

Fig. 1. A Pedigree of the consanguineous family affected with congenital muscular dystrophy. Arrow and filled ellipse indicate index case; ellipses and boxes with center dot represent carriers of mutation. **B** Automated partial nucleotide sequence of *LAMA2* exon 54. The patient (right panel) has a C → T substitution at position 7781, which changes arginine to a stop codon (R2578X). The parents (IV-1, IV-2) and other relatives (II-1, II-4, and IV-3) were CT heterozygous (middle panel). Individual III-1 was not analyzed but is an obligate carrier



In this study, we report a homozygous new mutation in a sibling from a consanguineous Mexican family. The mutation, located on exon 54, corresponds to a substitution (C7781T) that produces a stop codon (Arg2578Stop) and therefore absence of the protein, which may eliminate one half of the globular domain, avoiding the linkage between merosin and the dystrophin-glycoprotein complex. Absence of the protein induces a severe CMD phenotype.

Patient and methods

Patient

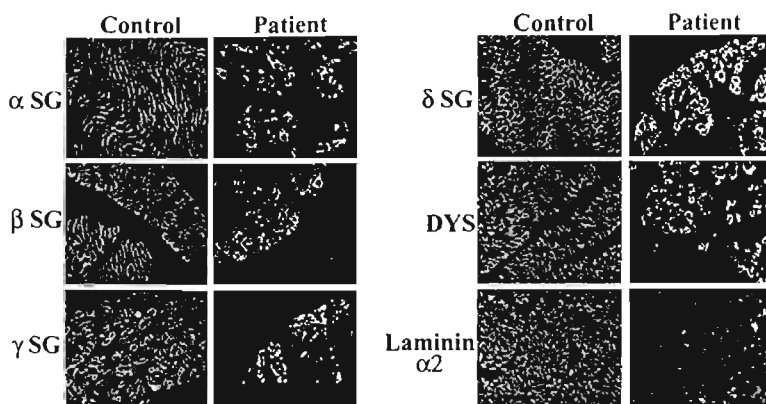
The patient was admitted to the Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS when she was 8 months of age. This Mexican infant was the second child of healthy consanguineous parents (Fig. 1A). From the first month of life, the patient was hypotonic with poor intake, irritability, reduced spontaneous movements, and poor suction. Physical examination showed markedly generalized muscle weakness in limb-girdle muscles; contractures of elbows, wrists, knees, and ankles; and bilateral talipes equinovarus. Upper and lower extremities were hypertrophic. Serum CK concentration was 2897 U/l and lactate dehydrogenase was 454 U/l. An MRI scan of the cerebral hemispheres and brainstem with a low signal intensity in T1-



Fig. 2. Cerebral magnetic resonance imaging scan (T2-weighted image) of the patient. The transversal images show patchy areas of T2 hyperintensity of white matter

weighted images and a high signal intensity in T2-weighted images showed a myelinization pattern that corresponded to the age of 3 months (Fig. 2). There were areas of periventricular hyperintensity that corresponded to areas of demyelination. A muscle biopsy specimen depicted diffuse atrophy of fibers with scarce, small rounded muscle fibers that alternated with several hypertrophic muscle fibers.

Fig. 3. Immunocytochemical analysis of normal and patient muscle. Skeletal muscle cryosections were stained with monoclonal antibodies against α -, β -, γ -, and δ -sarcoglycan (SG), dystrophin C-terminus (DYS), and laminin $\alpha 2$ as described in "Patient and Methods". Laminin $\alpha 2$ protein was absent on the surface of the patient's skeletal muscle fibers



Immunofluorescence analysis

Skeletal muscle biopsies from patient and control quadriceps were frozen rapidly in liquid nitrogen-isopentane. Seven-micrometer muscle cryosections were blocked with 5% bovine serum albumin in phosphate-buffered solution (PBS) for 1 h, and were then incubated with distinct primary antibodies for 3 h. After several washes with PBS, sections were incubated with Cy3-secondary antibody (goat anti-mouse, Jackson ImmunoResearch, WestGrove, PA, USA) (1:250) for 1 h. After rinsing with PBS, sections were mounted on Vectashield (Vector, Burlingame, CA, USA) and observed under an Olympus BX60 fluorescence microscope.

Antibodies

Mouse monoclonal antibodies were used against α -sarcoglycan (1:200) (NCL-a-SARC, Novocastra, Benton Lane, Newcastle, UK), β -sarcoglycan (1:200) (NCL-b-SARC, Novocastra), γ -sarcoglycan (1:200) (NCL-g-SARC, Novocastra), δ -sarcoglycan (1:200) (NCL-d-SARC, Novocastra), dystrophin N-terminus (1:200) (NCL-DYS3, Novocastra), dystrophin C-terminus (1:200) (NCL-DYS2, Novocastra), and laminin $\alpha 2$ chain (1:1000) (NCL-MEROSIN, Novocastra).

Molecular analysis of *LAMA2*

Genomic DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes as described by Kemper (1992). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of *LAMA2* 64 exons was carried out using primers and PCR touchdown conditions designed by Guicheney et al. (1998). Each amplification was performed using 100 ng of genomic DNA in a 25- μ l reaction. PCR products were analyzed on 2% agarose electrophoresis gel and purified by Rapid Gel Extraction System (Marligen Bioscience, Ijamsville, MD, USA). Purified products were sequenced using a Big Dye kit (Applied

Biosystems, Foster City, CA, USA), an Applied Biosystems Automated Sequencer 3700, and the same primers as for PCR amplification.

Results

The patient was born into a consanguineous family in a small Mexican town and all clinical characteristics pointed to a diagnosis of classical CMD. Furthermore, hematoxylin-eosin staining of muscle sections of the child showed histopathology compatible with dystrophic changes characterized by fibrotic tissue, increase of fat connective tissue, and few small surviving fibers (data not shown). To explore the possibility of merosin-deficient CMD (Tome et al. 1994), we analyzed cryosections of muscle biopsy by immunofluorescence using monoclonal antibody (see "Patient and Methods") directed against laminin $\alpha 2$. Immunostaining demonstrated a total absence of protein on the surface of the patient's muscle fibers (Fig. 3). In contrast, although there were very few small muscle fibers, it was possible to observe expression of all sarcoglycans (α -, β -, γ -, and δ -) and dystrophin (Fig. 3).

All clinical features and protein expression results on the patient's muscle prompted us to analyze the laminin $\alpha 2$ gene. Each 64 exons of the gene were amplified by touchdown PCR (Guicheney et al. 1998) and a sequence of DNA products was obtained by automated sequencing. The nucleotide sequence of exon 54 in the patient's DNA revealed the presence of homozygous new point mutations at nucleotide position 7781 (Fig. 1B). The mutation was a C $\rightarrow$ T transition that caused replacement of an arginine residue with a stop codon at amino acid position 2578 (R2578X).

To determine the presence of the mutation in other family members, we obtained an exon 54 nucleotide sequence of individuals II-1, II-4, IV-1, IV-2, and IV-3 (Fig. 1A,B). The patient's parents, obligate carriers, were heterozygous for the nonsense mutation, in addition to individuals II-1, II-4, and IV-1. Nevertheless, it was not possible to study

other family members; thus, the carrier state of individual III-1 was inferred by the segregation pattern of the mutation.

Discussion

The first studies on laminin $\alpha 2$ deficiency CMD reported patients with a similar phenotype (Tome et al. 1994; Helbling-Leclerc et al. 1995; Dubowitz 1996) characterized by the presence of muscle weakness and hypotonia, a severe clinical course with inability to achieve independent ambulation, and abnormal white matter signal by MRI (Tome et al. 1994). In recent years, there have been several reports showing variability in the clinical phenotype associated with laminin $\alpha 2$ deficiency. In these cases, patients less severely affected presented a clinical course characterized by late-onset muscle weakness, achievement of ambulation, and a CK level below 1000 U/l, with and without neuronal migration defects in MRI (Herrmann et al. 1996; Mora et al. 1996; Allamand et al. 1997; Naom et al. 1997; Morandi et al. 1999). Severe phenotypes can be induced by mutations that completely avoid expression of the protein (Helbling-Leclerc et al. 1995; Nissinen et al. 1996; Pegoraro et al. 1996; Guicheney et al. 1998; Pegoraro et al. 1998); milder CMD phenotypes have been observed in patients with mutations that induce production of a reduced amount of normal protein or expression of a partially functional protein (Allamand et al. 1997; Naom et al. 2000).

Herein we describe a Mexican child from a consanguineous family with a classical CMD phenotype. The patient, who was studied at the age of 8 months and died at 12 months of age, never walked and had cerebral white matter changes in MRI, as reported in persons with complete absence of laminin $\alpha 2$ (Tome et al. 1994; Voit 1997). Results obtained by immunofluorescence with an antibody that recognized laminin $\alpha 2$ confirmed the absence of protein on the muscle fiber surface. In contrast, α -, β -, γ -, and δ -sarcoglycans and dystrophin were present on the muscle membrane. By immunofluorescence assay, it was not possible to determine whether there was alteration in expression of these proteins. However, Jones et al. (1998) reported a case with the absence of laminin $\alpha 2$ and abnormal staining with dystrophin and α -sarcoglycan.

Pegoraro et al. (1998) observed, in a study of patients with complete deficiency of laminin $\alpha 2$, that the majority presented primary mutations on *LAMA2*. However, it has not always been determined that complete absence of laminin $\alpha 2$ is due to primary mutations on *LAMA2* (Pegoraro et al. 1998; Guicheney et al. 1998). Recently, Jones et al. (2001) showed in a case series and review study that mutations confirming the primary abnormality of laminin $\alpha 2$ have been reported in only 25% of cases.

The patient described in our study had a homozygous mutation that corresponded to a C $\rightarrow$ T substitution, producing a stop codon (R2578X). It is located at the carboxyl terminus of the laminin $\alpha 2$ gene and predicts the loss of the last 532 amino acids, which may avoid linkage of merosin to

α -dystroglycan (Yamada et al. 1994). Disruption in the link between the extracellular matrix and the cytoskeleton can lead to basal membrane instability and muscle fiber necrosis (Xu et al. 1994; Campbell 1995; Minetti et al. 1996; Osari et al. 1996). Patients with a similar phenotype and mutations in other codons of the G domain of laminin $\alpha 2$ have been reported (Pegoraro et al. 1998; Allamand and Guicheney 2002). Mutation analysis carried out in parents and other relatives showed that one paternal grandmother, one maternal great-grandfather, and the patient's mother's sister (her maternal aunt) were carriers of the mutation. These results suggest that the mutation originated at least three generations ago and has been segregating in a broadly endogamic community.

In summary, we demonstrated that primary deficiency of laminin $\alpha 2$, caused by a new nonsense mutation that is segregating in an endogamic community, produced a phenotype of classical CMD. This information is important for correlating the molecular basis of muscular dystrophy with a clinical phenotype and for improving the quality of genetic counseling.

Acknowledgments The authors wish to thank Dr. Pascale Guicheney (INSERM U523, Institut de Myologie), who kindly provided us with the primers' sequences and PCR conditions to amplify exons of *LAMA2*. This work was supported by CONACYT (Mexico) grant 34603-M, and Fondo de Fomento para la Investigación-IMSS (Mexico) grant FP-0038/764. All DNA sequencing was carried out at the Centro de Instrumentos del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Mexico City.

References

- Allamand V, Guicheney P (2002) Merosin-deficient congenital muscular dystrophy, autosomal recessive (MDC1A, MIM#156225, *LAMA2* gene coding for alpha2 chain of laminin). *Eur J Hum Genet* 10:91-94
- Allamand V, Sunada Y, Salih MA, Straub V, Ozo CO, Al-Turaiqi MH, Akbar M, Kolo T, Colognato H, Zhang X, Sorokin LM, Yurchenco PD, Tryggvason K, Campbell KP (1997) Mild congenital muscular dystrophy in two patients with an internally deleted laminin alpha2-chain. *Hum Mol Genet* 6:747-752
- Banker BQ (1994) The congenital muscular dystrophy. In: Engel AG, Francini-Armstrong C (eds) *Miology*, vol 2. McGraw-Hill, New York, pp 1275-1289
- Campbell KP (1995) Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 80:675-679
- Dubowitz V (1994) Congenital muscular dystrophy. In: Emery ARD (ed) *Diagnostic criteria for neuromuscular disorders*. Baarn, The Netherlands, pp 32-34
- Dubowitz V (1996) New developments in congenital muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 6:228
- Guicheney P, Vignier N, Zhang X, He Y, Cruaud C, Frey V, Helbling-Leclerc A, Richard P, Estournet B, Merlini L, Topaloglu H, Mora M, Harpey JP, Haenggeli CA, Barois A, Hainque B, Schwartz K, Tome FM, Fardeau M, Tryggvason K (1998) PCR based mutation screening of the laminin alpha2 chain gene (*LAMA2*): application to prenatal diagnosis and search for founder effects in congenital muscular dystrophy. *J Med Genet* 35:211-217
- Helbling-Leclerc A, Zhang X, Topaloglu H, Cruaud C, Tesson F, Weissenbach J, Tome FM, Schwartz K, Fardeau M, Tryggvason K, Guicheney P (1995) Mutations in the laminin alpha 2-chain gene (*LAMA2*) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Nat Genet* 11:216-218
- Herrmann R, Straub V, Meyer K, Kahn T, Wagner M, Voit T (1996) Congenital muscular dystrophy with laminin alpha 2 chain defi-

- ciency: identification of a new intermediate phenotype and correlation of clinical findings to muscle immunohistochemistry. *Eur J Pediatr* 155:968-976
- Hillarie D, Leclerc A, Faure S, Topaloglu H, Chiannikulchai N, Guicheney P, Grinas L, Legos P, Philpot J, Evangelista T (1994) Localization of merosin-negative congenital muscular dystrophy to chromosome 6q2 by homozygosity mapping. *Hum Mol Genet* 3:1657-1661
- Jones KJ, Kim SS, North KN (1998) Abnormalities of dystrophin, the sarcoglycans, and laminin alpha2 in the muscular dystrophies. *J Med Genet* 35:379-386
- Jones KJ, Morgan G, Johnston H, Tobias V, Ouvrier RA, Wilkinson I, North KN (2001) The expanding phenotype of laminin alpha2 chain (merosin) abnormalities: case series and review. *J Med Genet* 38:649-657
- Kempler B (1992) Quick preparation of high molecular weight DNA by freezing. *Trends Genet* 8:7
- Minetti C, Bado M, Morreale G, Pedemonte M, Cordone G (1996) Disruption of muscle basal lamina in congenital muscular dystrophy with merosin deficiency. *Neurology* 46:1354-1358
- Mora M, Moroni I, Uziel G, Di Blasi C, Barresi R, Farina L, Morandi L (1996) Mild clinical phenotype in a 12-year-old boy with partial merosin deficiency and central and peripheral nervous system abnormalities. *Neuromuscul Disord* 6:377-381
- Morandi L, Di Blasi C, Farina L, Sorokin L, Uziel G, Azan G, Pini A, Toscano A, Lanfossi M, Galbiati S, Cornelio F, Mora M (1999) Clinical correlations in 16 patients with total or partial laminin alpha2 deficiency characterized using antibodies against 2 fragments of the protein. *Arch Neurol* 56:209-215
- Naom IS, D'Alessandro M, Topaloglu H, Sewry C, Ferlini A, Helbling-Leclerc A, Guicheney P, Weissenbach J, Schwartz K, Bushby K, Philpot J, Dubowitz V, Muntoni F (1997) Refinement of the laminin alpha2 chain locus to human chromosome 6q2 in severe and mild merosin deficient congenital muscular dystrophy. *J Med Genet* 34:99-104
- Naom I, D'Alessandro M, Sewry CA, Jardine P, Ferlini A, Moss T, Dubowitz V, Muntoni F (2000) Mutations in the laminin alpha2-chain gene in two children with early-onset muscular dystrophy. *Brain* 123:31-41
- Nissinen M, Helbling-Leclerc A, Zhang X, Evangelista T, Topaloglu H, Cruaud C, Weissenbach J, Fardeau M, Tome FM, Schwartz K, Tryggsason K, Guicheney P (1996) Substitution of a conserved cysteine-996 in a cysteine-rich motif of the laminin alpha2-chain in congenital muscular dystrophy with partial deficiency of the protein. *Am J Hum Genet* 58:1177-1184
- Osari S, Kobayashi O, Yamashita Y, Matsuishi T, Goto M, Tanabe Y, Migita T, Nonaka I (1996) Basement membrane abnormality in merosin-negative congenital muscular dystrophy. *Acta Neuropathol (Berl)* 91:332-336
- Pegoraro E, Mancias P, Swerdlow SH, Raikow RB, Garcia C, Marks H, Crawford T, Carver V, Di Ciano B, Hoffman EP (1996) Congenital muscular dystrophy with primary laminin alpha2 (merosin) deficiency presenting as inflammatory myopathy. *Ann Neurol* 40:782-791
- Pegoraro E, Marks H, Garcia CA, Crawford T, Mancias P, Connolly AM, Fanin M, Martinello F, Trevisan CP, Angelini C, Stella A, Scavina M, Munk RL, Servidei S, Bonnemant CC, Bertorini T, Acsadi G, Thompson CE, Gagnon D, Hoganson G, Carver V, Zimmerman RA, Hoffman EP (1998) Laminin alpha2 muscular dystrophy: genotype/phenotype studies of 22 patients. *Neurology* 51:101-110
- Sewry CA, Philpot J, Mahony D, Wilson LA, Muntoni F, Dubowitz V (1995) Expression of laminin subunits in congenital muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 5:307-316
- Tome FM, Evangelista T, Leclerc A, Sunada Y, Manole E, Estournet B, Barois A, Campbell KP, Fardeau M (1994) Congenital muscular dystrophy with merosin deficiency. *C R Acad Sci III* 317:351-357
- Voit T (1997) Congenital muscular dystrophies: update. *Brain Dev* 20:65-74
- Xu H, Christmas P, Wu XR, Wewer UM, Engvall E (1994) Defective muscle basement membrane and lack of M-laminin in the dystrophic dy/dy mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5572-5576
- Yamada H, Shimizu T, Tanaka T, Campbell KP, Matsumura K (1994) Dystroglycan is a binding protein of laminin and merosin in peripheral nerve. *FEBS Lett* 352:49-53
- Zhang X, Vuolteenaho R, Tryggsason K (1996) Structure of the human laminin alpha2-chain gene (*LAMA2*), which is affected in congenital muscular dystrophy. *J Biol Chem* 271:27664-27669