



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MÉDICINA

**“ESTUDIO BIOQUÍMICO MOLECULAR DE PROTEÍNAS
NO ASOCIADAS A DISTROFINA EN PACIENTES CON
DISTROFIA MUSCULAR”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

**P R E S E N T A
BENJAMÍN GÓMEZ DÍAZ**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. HAYDEÉ ROSAS VARGAS

MÉXICO D.F.

MARZO 2006



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.

AGRADECIMIENTOS

Al comité tutorial Dra. Haydeé Rosas Vargas, Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez y Dr. Luis Ángel Ruano Calderón por sus constructivas recomendaciones en el desarrollo experimental y escrito de la presente investigación.

Un especial agradecimiento a la Dra. Haydeé Rosas Vargas y al Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez por el recibimiento en su equipo de trabajo y por su valioso apoyo y asesoría a lo largo de esta investigación ya que sus comentarios siempre certeros ayudaron a que cada vez fuera mejor.

A la Dra. Adela Rodríguez Romero y al Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez mi más profundo agradecimiento por sus comentarios y aportaciones en el trabajo escrito.

A los compañeros de laboratorio: Adrián, Alejandra, Alexandra, Alhondra, Angélica, Bladimir, Carlos, Cesar, Gabriel, Israel, Javier, Liliana, Manuel, Omar, Pedro, Ricardo, Rocío, Sofía y Teresa por sus enseñanzas, apoyo y amistad.

A mi familia por su apoyo incondicional.

Los estudios de Maestría fueron apoyados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) mediante la beca 182699 y por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) mediante el programa de apoyo a Becarios de Investigación.

El trabajo fue apoyado por el CONACyT mediante el proyecto SALUD-2002-COI-7055

Estudio Bioquímico Molecular de Proteínas no Asociadas a
Distrofina en Pacientes con Distrofia Muscular

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Hospital de Pediatría en el Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, bajo la tutoría de la Dra. Haydeé Rosas Vargas y el Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez en estrecha colaboración con el Dr. Luis Ángel Ruano Calderón y la Biól. Francisca Fernández Valverde, de los Servicios de Neurocirugía y Neuropatología respectivamente, del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Dr. Manuel Velasco Suárez.

Í N D I C E**ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS****ABREVIATURAS****RESUMEN****ABSTRACT****INTRODUCCIÓN****Las distrofias musculares****Proteínas relacionadas con distrofias musculares****La distrofina y proteínas asociadas a distrofina****Caveolina-3****Disferlina****Laminina α 2****Colágena tipo VI****Integrina α 7****Glicosiltransferasa (LARGE)****O-manosa β 1, 2 N-acetilglucosaminiltransferasa (POMGnT1)****O-manosiltransferasa 1 (POMT1)****Fukutina****Proteína relacionada con la fukutina****Calpaina-3****TRIM32****Selenoproteína N1****Emerina****Lámina A/C****Proteína 2 de unión a poli (A)****Titina****Miotilina****Teletonina****ZASZP****Otras distrofias musculares****Incidencia de las distrofias musculares****Variabilidad fenotípica****Diagnóstico****Asesoramiento genético****ANTECEDENTES ESPECÍFICOS****PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN****OBJETIVO GENERAL****Objetivos particulares****METODOLOGÍA****Pacientes****Biopsias musculares****Extracción de DNA****Extracción de RNA total de músculo esquelético****de biopsias de pacientes con LGMD2B****Transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)****Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)****Secuenciación y análisis de secuencias de los productos amplificados del gen de disferlina****Análisis de la segregación de la mutación 4253 G>A****RESULTADOS****Pacientes estudiados****Mutaciones en el gen de disferlina en pacientes con LGMD2B****DISCUSIÓN****CONCLUSIONES****BIBLIOGRAFÍA****ANEXOS**

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Distribución de debilidad muscular

predominante en diferentes tipos de distrofias musculares

Tabla 1. Algunas proteínas relacionadas con distrofias musculares

Localización subcelular y función

Figura 2. Distribución celular de proteínas relacionadas a distrofias musculares

Tabla 2. Características clínicas de distrofias de cinturas

Tabla 3. Características clínicas de distrofias musculares congénitas

Tabla 4. Condiciones para inmunofluorescencias con anticuerpos específicos

Tabla 5. Oligonucleótidos para amplificar exones del gen DYSF

Tabla 6. Manifestaciones clínicas de los pacientes con distrofia muscular

Tabla 7. Resultados de inmunofluorescencias en pacientes con una deficiencia primaria de alguna de las proteínas: distrofina, α , β , γ , δ SGs y disferlina

Figura 3. Árbol genealógico del paciente 59

Figura 4. Imagen de inmunofluorescencia indirecta del paciente 59

Tabla 8. Características clínicas de pacientes con LGMD2B

Tabla 9. Cambios encontrados en la secuencia del gen DYSF

en los pacientes analizados

Figura 5. Secuencia que muestra la mutación 4253 G>A en el gen DYSF

Figura 6. Esquema donde se representan los puntos de corte de *Hae III* en el fragmento de 94 pb producto de la PCR con los oligonucleótidos diseñados en base a la secuencia del exón 39 de DYSF

Figura 7. Electroforésis representativa de productos de PCR digeridos con *Hae III* en gel de agarosa al 4%.

Figura 8. Pedigree de la familia del paciente 3 con LGMD2B

INTRODUCCIÓN

Las distrofias musculares

Las distrofias musculares son un grupo heterogéneo de desordenes miopáticos determinados genéticamente, caracterizados principalmente por la pérdida progresiva de músculo esquelético (Maidment y Ellis, 2002). En algunos casos se ha observado daño en músculo liso vascular y defectos en la conducción cardíaca (Heydemann *et al*, 2005).

A nivel tisular se observan defectos en la permeabilidad de la membrana, degeneración y regeneración de miofibras, y eventual infiltración de tejido conectivo y adiposo que funcionalmente, al reemplazar a las miofibras, ocasiona debilidad muscular (Vainzof y Zatz, 2003).

Con base en los grupos específicos de músculos que generalmente se ven afectados, se han delimitado 6 tipos de distrofias musculares (Figura 1): A) Distrofia muscular de Duchenne/Becker (DMD/BMD) (distrofinopatías), en las que la debilidad se manifiesta generalmente en los músculos proximales, las rodillas, las cinturas escapular y pélvica en la cual la debilidad en el extensor de la cadera es evidente (Prior y Bridgeman, 2005). Muchos pacientes con esta enfermedad tienen pantorrillas hipertrofiadas, sin embargo la hipertrofia de las pantorrillas también se observa en otros tipos de distrofias musculares (Zatz *et al*, 2003). B) Distrofia muscular de Emery-Dreifuss. En este desorden se afectan el tendón de Aquiles, codos, los músculos con distribución humeroperoneal, proximal en los miembros superiores y distal en los inferiores (Bonne, 2003). En algunos casos hay una afectación final de la cintura pélvica (Manilal *et al*, 1998). C) Distrofias musculares de cinturas. En estas enfermedades la debilidad se sitúa principalmente en los músculos proximales de las extremidades y en las cinturas pélvica y escapular (Zatz *et al*, 2003). D) Distrofia muscular facioescapulohumeral. El nombre de este tipo de distrofia muscular deriva de los músculos que se ven inicialmente afectados, que son los de la cara y de la

cintura escapular; posteriormente se afectan los músculos extensores de los pies y frecuentemente de la cintura pélvica (Zatz, 2002). E) Distrofias musculares distales. La debilidad muscular es principalmente distal y en algunas ocasiones la cintura pélvica (Emery, 2002). F) Distrofia oculofaríngea, en la que los músculos afectados son los extraoculares y los faciales superiores, y se presenta con debilidad en el cuello, en la musculatura proximal superior (y aún distal) de las extremidades, y de la cintura pélvica. La presencia de ptosis (caída de los párpados) y disfagia (dificultad para tragar) son características frecuentes de esta enfermedad (Brais *et al*, 1998; Emery, 2002). A estos seis tipos de distrofia muscular se suma la distrofia muscular congénita, en la cual se detecta una afección generalizada (Jones *et al*, 2001).

El curso clínico es altamente variable, oscilando de severo en algunas formas congénitas con rápida progresión, a formas leves con inicio tardío y curso lento.

Además existe una variabilidad clínica dentro de cada grupo, por lo que se han descrito nuevas entidades y diversos fenotipos para cada una de ellas. En la última década se han identificado un gran número de proteínas del sarcolema, de la matriz extracelular, de la sarcomera, del citosol, del núcleo y de la vía de glicosilación (Vainzof y Zatz 2003) cuya deficiencia se asocia al desarrollo de distrofias musculares que a la fecha ascienden a más de treinta. Es por ello que la clasificación de estas enfermedades se ha modificado y si bien se toma en cuenta su modo de herencia, la edad de inicio y los músculos involucrados, tiene un mayor peso la identificación del gen mutado (Tabla 1) (Guglieri *et al*, 2005).

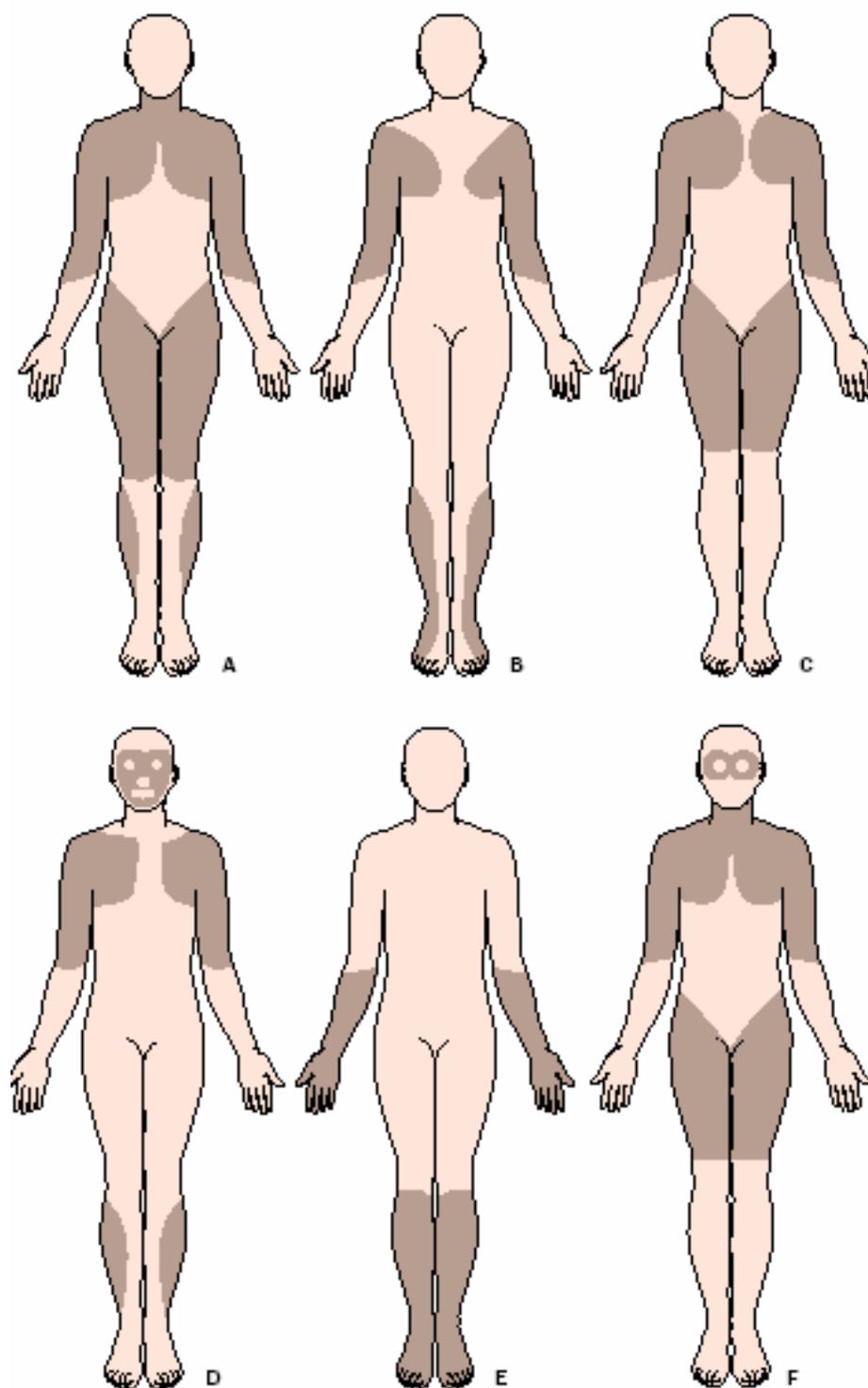


Figura 1. Distribución de debilidad muscular predominante en diferentes tipos de distrofias musculares. A: Tipo Duchenne y Becker, B: Emery-Dreifuss, C: Cintura, D: Facioescapulohumeral, E: Distal, F: Oculofaríngea. Reproducida de Emery, 2002.

Tabla 1. Algunas proteínas relacionadas con distrofias musculares. Localización subcelular y función. Reproducido de Guglieri *et al*, 2005 con modificaciones.

Proteína	Localización subcelular	Gen	Localización del gen	Función propuesta	Fenotipo clínico
Distrofina	Citosol	DMD	Xp21.2	Mecano-señalización (estabilización de DCG)	DMD/BMD
Emerina	Membrana nuclear	EMD	Xq28	Estabilización de membrana nuclear, diferenciación celular	X-EDMD
Laminina α 2	Matriz extracelular	LAMA2	6q22-q23	Unión de α -DG con lámina basal	MDC1A y una forma similar a LGMD
Colágena VI	Matriz extracelular	COL6A1; COL6A2; COL6A3	21q22.3; 21q22.3; 2q37	Modula proliferación y previene apoptosis en fibroblastos	Miopatía de Bethlem, UMDC, AD-LGMD?
Integrina α 7	Transmembrana	ITGA7	12q13	Une matriz extracelular citoesqueleto, diferenciación durante el desarrollo embrionario	Distrofia muscular congénita leve
Una supuesta glicosiltransferasa	Aparato de Golgi	LARGE	22q12.3-13.1	Glicosilación de α -DG	MDC1D
O-manosa β 1,2 N-acetilgluco_saminiltransferasa	Transmembrana en retículo endoplasmico	POMGnT1	1p34-p33	Glicosilación de α -DG	MEB
O-manosiltransferasa 1	Transmembrana en retículo endoplasmico	POMT1	9q34.1	Glicosilación de α -DG	WW
Fukutina	Cuerpo de Golgi	FUKUTINA	9q31	Glicosilación de α -DG	FMDC
Proteína relacionada con la fukutina	Aparato de Golgi	FKRP	19q13.3	Glicosilación de α -DG	CMD1C, LGMD2I, MEB
α -Sarcoglicano	Sarcolema	SGCA	17q12-q21.33	Mecano-señalización (estabilización de DCG)	LGMD2D
β -Sarcoglicano	Sarcolema	SGCB	4q12	Mecano-señalización (estabilización de DCG)	LGMD2E
γ -Sarcoglicano	Sarcolema	SGCG	13q12	Mecano-señalización (estabilización de DCG)	LGMD2F
δ -Sarcoglicano	Sarcolema	SGCD	5q33	Mecano-señalización (estabilización de DCG)	LGMD2C
Caveolina-3	Sarcolema	CAV3	3p25	Señalización celular (organización de sistema de túbulos T durante la miogénesis)	LGMD1C
Disferlina	Sarcolema	DYSF	2p13.3-13.1	Reparación de membrana	LGMD2B, MM, DMAT
Calpaina-3	Citosol	CAPN3	15q15.1-q21.1	Actividad enzimática	LGMD2A: disminuye la señal de neuronas motoras
TRIM32	Citosol	TRIM32	9q31-q33	Cataliza la transferencia de ubiquitinación a proteínas blanco	LGMD2H
Lámina A/C	Matriz nuclear	LMNA	1q21.2	Estabilización de membrana nuclear, diferenciación celular	LGMD1B; AD-EDMD; AR-EDMD; enfermedad del sistema de conducción cardiaca; CMT2; displasia mandibuloacriar, síndrome de progeria Hutchinson-Gilford, síndrome atípico Werner.
-	Región subtelomérica de cromosoma 4	-	4q35	Es una secuencia repetida de DNA que al disminuir en tamaño cambia la estabilidad de la heterocromatina	FSHD1
Proteína 2 de unión a poli (A)	Nucleoplasma	PABP2	14q11	Esta involucrado en la síntesis y truncado de colas de poli (A) en mRNA	OPMD
Titina	Sarcomera	TTN	2q24.3	Participación en contracción, elasticidad muscular	LGMD2J, TMD, DCM, HCM
Miotilina	Sarcomera	TTID	5q31	Media un correcto ensamble del aparato contráctil	LGMD1A
Teletonina	Sarcomera	TCAP	17q12	Fosforilación de teletonina en diferenciación temprana de miocitos, integridad de la sarcomera	LGMD2G
Selenoproteína N1	Retículo endoplasmico	SEPN1	1p36-p35	Actividad enzimática, prevención de daño oxidativo	RSMD1, miopatía congénita núcleos centrales
ZASP	Sarcomera	ZASP	10q22.3-q23.2	Interacción proteína-proteína; mantenimiento de línea Z durante la contracción muscular	Debilidad distal y/o proximal; cardiomiopatía

Abreviaturas: DCG, complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina; DG, distroglicano; DMD, distrofia muscular de Duchenne; BMD, distrofia muscular de Becker; X-, ligada al cromosoma X; AR, autosómica recesiva, AD, autosómica dominante; EDMD, Distrofia muscular de Emery-Dreifuss; MDC, distrofia muscular congénita; UMDC, distrofia muscular congénita de Ullrich; LGMD, distrofia muscular de cintura; MEB, enfermedad músculo-ojo-cerebro; WW, síndrome Walker Warburg; MM, miopatía de Miyoshi; DMAT, miopatía del compartimiento distal anterior; CMT2, polineuropatía autosómica recesiva axonal; FSHD1, distrofia muscular fasioescapulohumeral; OPMD, distrofia

muscular oculofaríngea; TMD, distrofia muscular tibial; DCM, cardiomiopatía dilatada; HCM, cardiomiopatía hipertrófica; RSMD1, distrofia muscular-1 de espina rígida.

Proteínas relacionadas con distrofias musculares

La distrofina y proteínas asociadas a distrofina

La distrofina es la proteína deficiente en la distrofia muscular de Duchenne y Becker (DMD/BMD), por lo que se denominan distrofinopatías. El descubrimiento de esta proteína fue el inicio para la caracterización del complejo de glicoproteínas asociadas a la distrofina (DGC por sus siglas en inglés Dystrophin-Glycoprotein Complex). Este complejo posteriormente se subdividió en dos subcomplejos transmembranales (Distroglicano y Sarcoglicano-Sarcospán) y un subcomplejo intracelular (Distrofina-Distrobrevina-Sintrofina) (Kirschner y Bonnemann, 2004).

El DGC proporciona una conexión física entre la matriz extracelular y el citoesqueleto (Figura 2) (Guglieri *et al.*, 2005), por lo que se ha propuesto que este complejo proteínico transmembranal provee de un soporte mecánico al sarcolema durante la contracción de las miofibras (Weller *et al.*, 1990), cuyo rompimiento tiene como consecuencia la degeneración muscular característica de las distrofias musculares asociadas al DGC (Campbell, 1995; Straub y Campbell, 1997). Además del soporte mecánico, se ha sugerido que el DGC puede estar involucrado en procesos de señalización celular como plataforma de unión para algunos ligandos. Esta hipótesis se sustenta en la existencia de una asociación de dicho complejo con moléculas de señalización tales como: la sintasa neuronal de óxido nítrico (nNOS) (Brenman *et al.*, 1995 y 1996), la proteína adaptadora de transducción de señales Grb2, (Yang *et al.*, 1995) y el regulador de la proteína cinasa dependiente de calcio-calmodulina (CaM II) (Anderson *et al.*, 1996) entre otras.

Las distrofinopatías (DMD y BMD) son enfermedades con herencia ligada al cromosoma X, y mientras en la DMD los síntomas inician entre los dos y tres años de edad, en la DMB el padecimiento se manifiesta entre los cinco y quince años de edad.

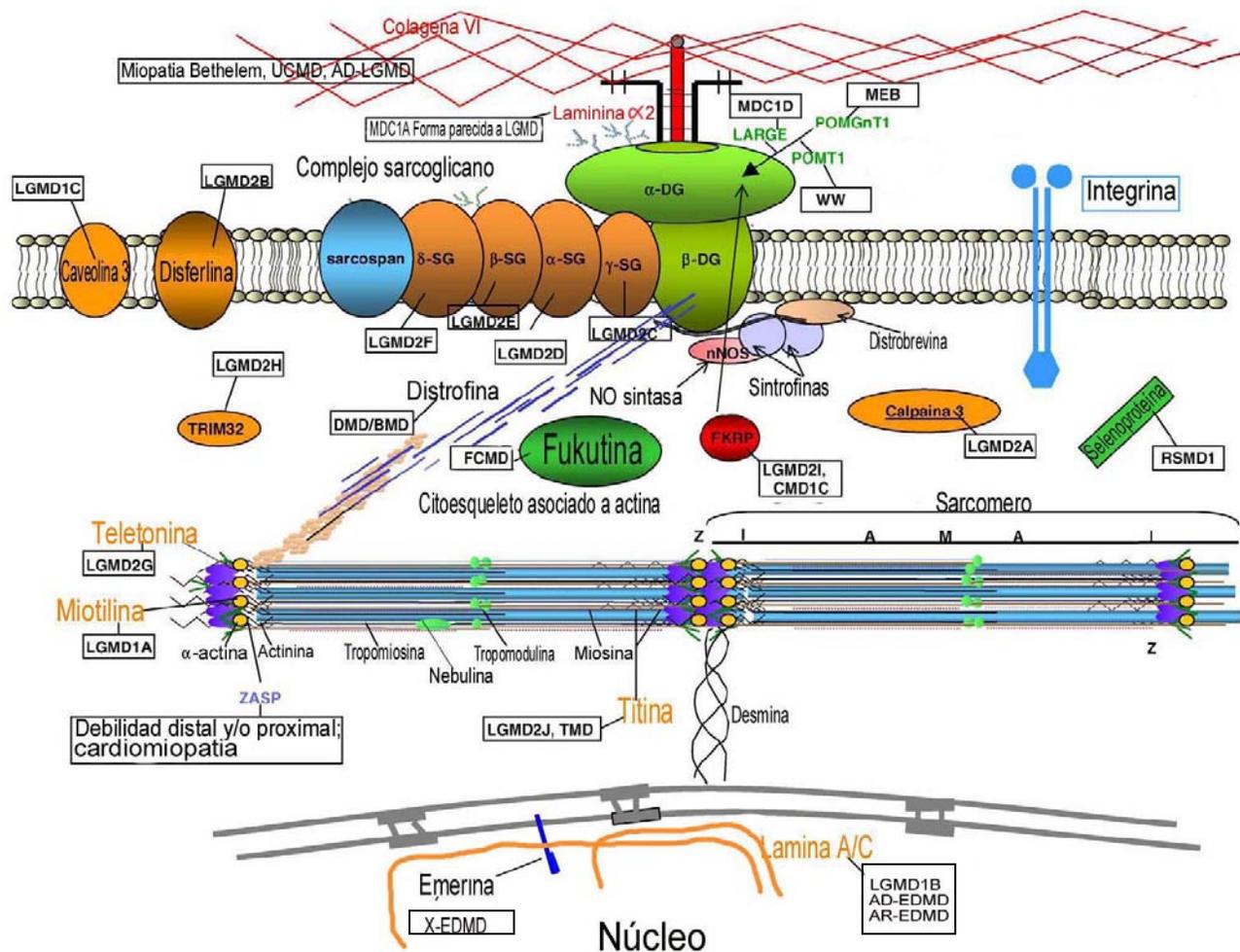


Figura 2. Distribución celular de proteínas relacionadas a distrofias musculares. En el diagrama se esquematiza la localización de proteínas de la matriz extracelular, el sarcolema, el citosol y el núcleo, involucradas en distrofia muscular de cintura (proteínas en color naranja) y distrofia muscular congénita (proteínas en color verde). Las proteínas representadas en color rojo son relacionadas a ambos desórdenes. Reproducido de Guglieri *et al*, 2005 con modificaciones.

Un paciente con DMD generalmente es confinado a una silla de ruedas antes de los doce años de edad y un paciente con BMD generalmente es capaz de caminar a los dieciséis años de edad (Vainzof *et al*, 1995).

Diversos análisis sobre el DNA de pacientes con DMD/BMD, ha mostrado que en el 50-70% de los casos estos fenotipos son ocasionados por eliminaciones localizadas principalmente en la parte distal (exones 45-53) o proximal (exones 2-20) del gen de distrofina, denominadas “punto caliente” mayor y menor de mutación, respectivamente (Baumbach *et al*, 1989). En uno de los primeros estudios realizado en pacientes mexicanos con DMD/BMD se determinó que aproximadamente el 53% de ellos presentaban eliminaciones y que de éstas, el 87% se agrupaba en el “punto caliente” mayor (Coral *et al*, 1997). Los síntomas en DMD son dificultad para correr y posteriormente para subir escaleras, la debilidad en las rodillas y en el extensor de la cadera. Estos pacientes tienen cierto grado de retraso mental, el 20% de ellos con un coeficiente intelectual (IQ) menor a 70 (Leibowitz y Dubowitz, 1981), muchos pacientes tienen pantorrillas hipertróficas, sin embargo la hipertrofia de las pantorrillas también se observa en otros tipos de distrofias musculares, como algunas distrofias de cinturas. La debilidad es generalmente proximal y progresiva. Finalmente la neumonía complicada con problemas cardiacos es la principal causa de muerte, lo que sucede en la segunda década de vida (Prior y Bridgeman, 2005). En la BMD la distribución de la pérdida y debilidad muscular es muy similar a lo que ocurre en la DMD, pero la evolución de la enfermedad es más lenta, la pérdida de la capacidad ambulatoria se da de la adolescencia en adelante, y los pacientes mueren generalmente en la cuarta o quinta década de la vida. En algunos casos se presenta cardiomiopatía (Prior y Bridgeman, 2005).

Tanto en la DMD/BMD el 5-10% de las mujeres portadoras muestran cierto grado de debilidad muscular, con pantorrillas hipertróficas. La debilidad muscular es frecuentemente asimétrica, se inicia en la niñez pero se hace evidente en la edad adulta y puede progresar o permanecer estática. Dado que la debilidad es esencialmente proximal, su distinción con respecto a la distrofia muscular de cinturas es importante para el asesoramiento genético. Algo muy relevante, es que las mujeres portadoras pueden desarrollar miocardiopatía dilatada sin debilidad muscular aparente (Grain *et al*, 2001).

Además de la distrofina, las otras proteínas del DGC asociadas a distrofias musculares son los sarcoglicanos (SGs) α , β , γ y δ , (Tabla 1) (Hoffman *et al*, 1987; Durbeej y Campbell, 2002, Tyler, 2003). Hasta este momento no se han reportado mutaciones en ϵ y ζ -SG, y sarcospan (SSPN) asociadas con distrofias musculares, aún cuando forman parte integral de este complejo (Ettinger *et al*, 1997; Wheeler *et al*, 2002; Crosbie *et al*, 1997). En cuanto a las distrobrevinas y sintrofinas, no se conocen enfermedades en humanos causadas por mutaciones en este grupo de genes; sin embargo, Kirschner y Bonnemann (2004), en un estudio realizado en un modelo de ratón deficiente en α -distrobrevina, detectaron distrofia muscular en dicho organismo.

Las distrofias musculares de cintura (LGMD por sus siglas en inglés Limb-Girdle Muscular Dystrophy) se designan con base en una nomenclatura cronológica que asigna LGMD1A, 1B, 1C, etcétera, en las formas autosómicas dominantes y 2A, 2B, 2C, etcétera, en las formas autosómicas recesivas, donde se ubican las sarcoglicanopatías (LGMD2C-2F) (Tabla 2).

En las sarcoglicanopatías los síntomas inician en la infancia, el confinamiento de los pacientes a una silla de ruedas es antes de los dieciséis años y frecuentemente se afecta el músculo cardíaco. En los pacientes con deficiencia de β , δ y γ SGs se presenta

frecuentemente cardiomiopatía dilatada (Passos *et al*, 1996), mientras que los pacientes con alteraciones en α -SG rara vez desarrollan cardiomiopatía (Melacini *et al*, 1999), probablemente porque su homólogo ε -SG compensa su deficiencia con una alta expresión en el músculo cardíaco (Steven *et al*, 1994; Noguchi *et al*, 1995).

Una mutación en uno de los SGs resulta en la desestabilización del complejo entero y en consecuencia una deficiencia de los otros SGs (Vainzof *et al*, 1999). En los pacientes con mutaciones en γ SG se ha observado una deficiencia secundaria de distrofina, lo cual sugiere que esta subunidad de SGs tiene una interacción más directa con distrofina (Vainzof *et al*, 1999).

La importancia del complejo sarcoglicano-sarcospan (SG-SSPN) en el músculo liso vascular se ha puesto de manifiesto en modelos animales usados para estudiar a las distrofias musculares causadas por mutaciones en δ -SG y β -SG, en los cuales se ha observado que la pérdida del complejo en este tejido de los ratones causa alteración en la función vascular de la musculatura coronaria, con presencia de constricciones que inducen eventos isquémicos intermitentes (Coral *et al*, 1999; Barresi *et al*, 2000). Ésto en consecuencia 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).

Caveolina-3

Caveolina-3 codificada por el gen CAV3. En músculo esquelético y cardíaco es el principal componente de las caveolas, las cuales son invaginaciones vesiculares de la membrana plasmática implicadas en señalización celular (Schlegel *et al*, 1998). Las mutaciones en

CAV3 causan alteraciones en la formación de caveolas y en la membrana plasmática, afectándose así numerosas rutas de señalización (McNally *et al*, 1998).

Se han asociado cuatro fenotipos diferentes con mutaciones en CAV3: LGMD1C, RMD (por sus siglas en inglés Rippling Muscle Disease), miopatía distal (DM) e hipercikemia (HCK) (Minetti *et al*, 1998; Carbone *et al*, 2000; Betz *et al*, 2001; Tateyama *et al*, 2002) y un reciente estudio ha descrito una mutación en CAV3 asociada a cardiomiopatía hipertrófica (Hayashi *et al*, 2004).

Disferlina

Disferlina codificada por el gen DYSF. Se trata de una proteína con distribución ubicua, cuya principal expresión se detecta en corazón, músculo esquelético y riñón. En músculo esquelético está localizada en el sarcolema y en vesículas citoplásmicas. Participa en la reparación de daño en la membrana citoplasmática, en el tráfico de vesículas y en la fusión de membrana en células musculares, por lo que su deficiencia altera estas funciones (Bansal y Campbell, 2004). A pesar de que disferlina no es un componente integral del DGC, su distribución es alterada en distrofias musculares asociadas al DGC, en las cuales su expresión se encuentra disminuída en la membrana plasmática e incrementada en vesículas citoplásmicas (Piccolo *et al*, 2000).

Tres diferentes fenotipos se asocian con mutaciones en DYSF A) LGMD2B, con inicio de síntomas en la segunda o tercera década de vida, con debilidad predominantemente proximal y en cintura pélvica; B) Miopatía de Miyoshi (MM), caracterizada por afección de gastronemios y cintura pélvica; y C) Miopatía del compartimento distal anterior (DMAT), que difiere de MM porque la progresión es más rápida y se afectan los músculos tibial anteriores (Vainzof *et al*, 2001, Illa *et al*, 2001).

Tabla 2. Características clínicas de distrofias de cinturas. Reproducido de Guglieri *et al*, 2005 con modificaciones.

Distrofia	Proteína	Proteína con deficiencia secundaria (no siempre)	Niveles de CPK	Edad media de inicio	Grupos musculares involucrados	Implicaciones cardiacas	Implicaciones respiratorias	Rango de progresión	Características distintivas
LGMD1A	Miotilina	Laminina c1	Normal-10X	18-40 años	Cinturas pélvica y escapular; a menudo debilidad distal tardía	No descritas	No descritas	Lento	Disartria, afectado el tendón de Aquiles, aumento de vacuolas en tejido muscular, reportada solo en descendencia alemana
LGMD1B	Lámina A/C	Laminina b1	Normal-20X	4-38 años	Cintura pélvica; a menudo posteriormente cintura escapular	Defectos en conducción atrioventricular; menos frecuente cardiomiopatía dilatada, pacientes no tratados eventualmente mueren por paro cardiaco	No descritas	Variable, lento	Contracturas
LGMD1C	Caveolina-3	disferlina	2-25X	<10 años	Cinturas pélvica y escapular	Cardiomiopatía hipertrofica (solo en estudios recientes)	No descritas	Lento a moderado	Hipertrofia de pantorrillas, mialgia y calambres musculares
LGMD1D	?	-	Normal-4X	15-50 años	Cinturas pélvica y escapular	Cardiomiopatía dilatada	No descritas	Lento	Disfagia
LGMD1E	?	-	-	Adultos jóvenes	Cinturas pélvica y escapular	-	No descritas	Lento	-
LGMD1F	?	-	Normal-20X	1-58 años	Cintura pélvica; a menudo posteriormente cintura escapular y debilidad distal	No descritas	Descritas sólo en algunos casos	Rápido a moderado	-
LGMD1G	?	-	Normal-10X	30-47 años	Cinturas pélvica y escapular; posteriormente limitación en la flexión de dedos del pie	No descritas	No descritas	Lento	Limitación en la flexión de dedos de pies y manos, vacuolas en tejido muscular
LGMD2A	Calpaina-3	-	Normal-50X	2-40 años	Cinturas pélvica (glúteos y aductores de la cadera) y escapular	No descritas	Descritas sólo en algunos casos	Variable, moderado	Debilidad de abductores, muslo posterior, escápula alada
LGMD2B	Disferlina	Calpaina-3 y caveolina-3	10-150X	20-30 años	Cinturas pélvica y escapular/cintura baja distal	Descrito sólo un caso	No descritas	Lento a moderado	Tejido inflamatorio en biopsia muscular, gastronemios involucrados tempranamente
LGMD2C	γ -Sarcoglicano	Otros SGs (ligemente) y raramente distrofina y disferlina	5-120X	3-20 años	Cinturas pélvica y escapular	Frecuente	Severas	Moderado	-
LGMD2D	α -Sarcoglicano	Otros SG (ligemente) y raramente disferlina	5-120X	3-20 años	Cinturas pélvica y escapular	Raro	Descritas	Rápido	-
LGMD2E	β -Sarcoglicano	Otros SGs y raramente disferlina	5-120X	3-20 años	Cinturas pélvica y escapular	Cardiomiopatía dilatada	Descritas	Rápido	-
LGMD2F	δ -Sarcoglicano	Otros SGs y raramente disferlina	5-120X	3-20 años	Cinturas pélvica y escapular	Cardiomiopatía dilatada	Descritas	Rápido	-
LGMD2G	Teletonina	-	Normal-30X	2-15 años	Proximal (4 extremidades) y distal (solo extremidades inferiores)	Descrito sólo un caso	No descritas	Lento a moderado	Atrofia distal de piernas, vacuolas en tejido muscular
LGMD2H	TRIM32	-	Normal-30X	15-30 años	Cinturas pélvica y escapular	No descritas	No descritas	Lento	Músculos faciales involucrados tardíamente; descrita solo en Huterianos
LGMD2I	Proteína relacionada con la fukutina	Laminina α 2 α -DG Calpaina-3	5-100X	10-40 años	Cinturas pélvica y escapular	Disfunción ventricular izquierda o cardiomiopatía dilatada	Descritas (involucrado el diafragma)	Rápido a moderado	Hipertrofia de pantorrillas
LGMD2J	Titina	Calpaina-3	Normal-2X	5-20 años	Cinturas pélvica y escapular; deficiencia distal descrita	No descritas	No descritas	Rápido	Descrita solo en Finns

En las distintas formas de LGMD se utiliza una nomenclatura cronológica asignando LGMD1A, 1B, etcétera en las formas autosómicas dominantes y 2A, 2B, etcétera en las formas autosómicas recesivas.

Laminina $\alpha 2$

Laminina $\alpha 2$ se ubica en la matriz extracelular, la cual provee reforzamiento a la membrana plasmática, contribuye a las propiedades elásticas de las fibras musculares, define el proceso de regeneración y regula eventos de señalización celular (Caldwell *et al*, 1990). La unión entre α -dístroglicano (α -DG) y la lámina basal es mediada por lamininas. Estas son proteínas de matriz extracelular compuestas de tres diferentes cadenas homólogas de lamininas, una cadena pesada α y dos cadenas ligeras, β y γ . En músculo esquelético la forma predominante es laminina 2 (también presente en sistema nervioso).

La deficiencia parcial o total de laminina $\alpha 2$ debida, a mutaciones en el gen que la codifica (LAMA2), es responsable de la distrofia muscular congénita MDC1A (MDC por sus siglas en inglés Muscular Dystrophy Congenital). Las MDC se caracterizan por inicio temprano de hipotonía y debilidad, así como un patrón distrófico que suelen manifestarse al nacimiento o durante el primer año de vida (Tabla 3) (Ferreira *et al*, 2005). El desorden puede estar limitado a los músculos o asociado con el sistema nervioso central (SNC) y/o anomalías en ojos. Han sido descritos diferentes fenotipos, muchos de éstos definidos en bases moleculares. El más común de ellos, MDC1A, abarca alrededor del 40% de los casos de MDC (Jones *et al*, 2001; Coral *et al*, 2003). En la MDC1A la ausencia total de esta proteína causa una forma severa de MDC clínicamente caracterizada por hipotonía al nacimiento o en los primeros meses de vida, con incapacidad para caminar de manera independiente; la imagen de resonancia magnética (MRI) del cerebro muestra una señal anormal de la materia blanca periventricular y subcortical. La función cognitiva es usualmente normal pero una pequeña proporción de pacientes pueden presentar retardo

mental y epilepsia. Más del 30% de estos pacientes muere durante el primer año de vida debido a complicaciones cardiopulmonares (Jones *et al*, 2001).

Tabla 3. Características clínicas de distrofias musculares congénitas. Reproducido de Guglieri *et al*, 2005 con modificaciones.

Distrofia	Proteína	Proteína(s) con deficiencia secundaria (no siempre)	Edad media de inicio	Grupos musculares involucrados	Implicaciones cardíacas	Implicaciones respiratorias	Implicaciones cerebrales	Anormalidades macroscópicas y en MRI	Rango de progresión	Características distintivas
MDC1A	Laminina $\alpha 2$	Integrina $\alpha 7$ α -DG β -DG α -SG distrofia	Al nacimiento; casos descritos con posterior inicio	Músculos de cinturas y axiales	Raro (Hipoquinesia ventricular izquierda, cardiomiopatía subclínica)	30% mueren en el primer año de vida por complicaciones cardiopulmonares	Función cognitiva normal; 30% presentan epilepsia; raro retardo mental	Señal de materia blanca anormal 5% occipital paragiria o agiria	Severo; en la forma parecida a LGMD es medio y de inicio tardío	CreCIMIENTO detenido; neumonía; neuropatía desmielinizante motora
MDC1B	?	Laminina $\alpha 2$	Temprana; también es posible el inicio tardío	Músculos de cinturas	No descritas	Tempranamente (implicaciones diafragmáticas)	No descritas	No descritas	Variable	Hipertrofia muscular generalizada
MDC1C	Proteína relacionada con la fukutina	Laminina $\alpha 2$ α -DG	Al nacimiento; descrita en adultos en forma menos severa	Generalizado	Frecuente cardiomiopatía dilatada	Frecuente (implicación diafragmática)	Función cognitiva normal (retardo mental descrito solo en 2 pacientes)	Raro alteraciones estructurales	Variable	Pseudohipertrofia de piernas
MDC1D	LARGE	α -DG	Al nacimiento	Generalizado	Cardiomiopatía leve solo descrita en ratones	No descritas	Retardo mental severo	Anormalidades en materia blanca; defectos e migración neuronal	Severo	Solo un caso descrito
UMDC 1 2 3	Colágena VI	-	Temprana	Generalizado	No descritas	Insuficiencia ventilatoria en la I o II década	No descritas	Normal	Variable (generalmente severo)	Contracturas en articulaciones proximales; hiperextensibilidad distal; espina rígida; característicos rasgos faciales; hiperqueratosis
Miopatía de Bethlem	Colágena VI	-	Prenatal pero raramente en adultos	Generalizado	Raro (cardiomiopatía hipertrófica)	Raro (parálisis diafragmática)	No descritas	Normal	Relativamente medio y lento	Contracturas de múltiples articulaciones; correlación de edad de inicio / severidad
Deficiencia de Integrina $\alpha 7$	Integrina $\alpha 7$	-	Al nacimiento	Generalizado	No descritas	No descrita	Variable	Normal	Medio	Solo tres casos descritos
WW	POMT1	α -DG β -SG γ -SG	Al nacimiento	Generalizado	No descritas	No descrita	Retardo mental	Defectos de migración neuronal	Severo (mueren antes de 3 años de edad)	Dificultad para comer; ceguera y malformaciones oculares
MEB	POMGnT1	α -DG Laminina $\alpha 2$	Neonatal	Generalizado	No descritas	No descrita	Retardo mental severo; común epilepsia	Defectos de migración neuronal; desmielinización	Severo pero de progresión lento	Implicaciones oculares; correlación severidad de implicaciones en CNS/genotipo
FMDC	Fukutina	Laminina $\alpha 2$ y proteínas asociadas a distrofina	Al nacimiento	Generalizado	Cardiomiopatía dilatada	Frecuente	Retardo mental severo; epilepsia	Retraso de mielinización; displasia cortical cerebelar y cerebral	Variable, de severo a medio	En población japonesa; contracturas; implicaciones oculares en el 50%
RMD1	Selenoproteína N,1	-	En la infancia	Músculos proximales y axiales	Raro hipertrofia ventricular derecha	Frecuente (síndrome respiratorio restrictivo severo)	No descritas	Normal	Medio (excepto por fallas respiratorias)	Espina rígida y escoliosis; debilidad de músculos axiales; pérdida nasal; patrón específico en MRI

MDC1A-D, distrofia muscular congénita; UMDC, distrofia muscular congénita de Ullrich; WW, síndrome Walker Warburg; MEB, enfermedad músculo-ojo-cerebro; FMDC, distrofia muscular congénita Fukuyama; RMD1, distrofia muscular-1 de espina rígida; DG, distroglicano; SG, sarcoglicano.

Aun cuando se han descrito casos de parcial deficiencia de laminina $\alpha 2$ asociados con fenotipos severos, usualmente una pérdida incompleta de esta molécula causa un fenotipo menos grave similar a una LGMD e incluso se han reportado casos asintomáticos (Jones *et al*, 2001). También se ha reportado una deficiencia secundaria de laminina $\alpha 2$ en otras distrofias debidas a la deficiencia primaria de la proteína relacionada con la fukutina, POMPGnT1, fukutina, y en MDC1B que no se ha identificado la proteína principalmente afectada (Guglieri *et al*, 2005).

Colágena tipo VI

Una segunda proteína de matriz extracelular relacionada a distrofia muscular es la colágena VI, una proteína de adhesión que participa en la proliferación celular y en la prevención de apoptosis (Caldwell *et al*, 1990). Está compuesta por tres diferentes cadenas polipeptídicas ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$), codificadas por tres genes, COL6A1, COL6A2 y COL6A3.

Se ha sugerido que las mutaciones en estos genes se relacionan con la presencia de apoptosis espontánea y con alteraciones estructurales del retículo sarcoplásmico y de la mitocondria (Irwin *et al*, 2003). Entre estas mutaciones hay algunas autosómicas dominantes que propician un fenotipo de MDC denominado miopatía Bethlem en la que la debilidad muscular es generalizada con presencia de múltiples contracturas. Esta enfermedad presenta un amplio rango en la edad de inicio que va de prenatal con disminución de los movimientos fetales, neonatal con hipotonía, o más frecuentemente con inicio en la niñez presentando debilidad de cinturas y contracturas.

También existe una forma poco frecuente con inicio de síntomas en la edad adulta. La progresión de los síntomas es lenta y raramente hay afecciones cardíacas o pulmonares (Haq *et al*, 1999). En los tres genes de colágena VI se han descrito mutaciones autosómicas recesivas que causan un fenotipo de MDC más severo, nombrado distrofia muscular congénita Ullrich (UMDC) o distrofia muscular esclerotónica, que se caracteriza por inicio temprano de debilidad muscular generalizada, con progresión lenta, contracturas múltiples proximales, hiperextensibilidad distal y espina rígida (Furukawa y Toyokura, 1977). Los pacientes afectados por UMDC tienen una inteligencia normal y pueden presentar deficiencia respiratoria. Algunos estudios muestran que una mutación dominante también puede causar un fenotipo UMDC (Baker *et al*, 2005).

Se estima que el 40% de las UMDC se debe a mutaciones en colágena VI, sin embargo el papel de esta molécula se excluye en la mayoría de los casos, sugiriendo una heterogeneidad genética en esta condición (Pan *et al*, 2003). Scacheri *et al* (2002) describieron una mutación en COL6A1 y COL6A2 en pacientes con fenotipo LGMD autosómica dominante, con debilidad media a severa, sin contracturas; sus estudios sugieren que una LGMD autosómica dominante puede estudiarse como producto de esta mutación en colágena VI.

Integrina $\alpha 7$

Las integrinas conforman una gran familia de receptores de superficie que median la interacción entre matriz extracelular y el citoesqueleto de actina. Son heterodímeros de glicoproteínas expresadas en músculo esquelético, esenciales para la diferenciación celular durante el desarrollo embrionario y son fuertes candidatos para formas no clasificadas de distrofias musculares. En músculo esquelético se han identificado mutaciones en el gen

ITGA7 que codifica para la integrina $\alpha 7$, que causan una MDC de progresión media con expresión normal de laminina $\alpha 2$ (Hayashi *et al*, 1998).

Glicosiltransferasa (LARGE)

Asociadas a distrofias musculares se han identificado mutaciones en cinco genes cuyos productos modifican la glicosilación de α -dístroglicano (α -DG), produciéndose una forma reducida en peso molecular, lo que sugiere una hipoglicosilación que modifica dominios esenciales para la unión de ciertos ligandos (Dincer *et al*, 2003). El primero de ellos es el gen LARGE, que codifica para una supuesta glicosiltransferasa, ubicuamente expresada. El único paciente reportado con mutación en este gen mostró un fenotipo de distrofia muscular congénita (MDC1D) asociada a retardo mental profundo y una MRI del cerebro con anomalías extensivas de la materia blanca, además de cambios estructurales indicativos de defectos en la migración neuronal.

Las pruebas de inmunoblot con un anticuerpo contra el epítipo glicosilado de α -DG mostraron una molécula de peso reducido de α -DG, sugiriendo una hipoglicosilación de esta molécula (Longman *et al*, 2003).

O-manosa $\beta 1, 2$ N-acetilglucosaminiltransferasa (POMGnT1)

El segundo de estos genes es POMGnT1, que codifica para la proteína O-manosa $\beta 1, 2$ N-acetilglucosaminiltransferasa, la cual cataliza la transferencia de grupos glicosílicos de un componente donador a un aceptor, en este caso α -DG. Las mutaciones en este gen provocan reducción de la afinidad de α -DG por laminina $\alpha 2$ como consecuencia de la hipoglicosilación y son responsables de la enfermedad músculo-ojo-cerebro (MEB), un desorden autosómico recesivo caracterizado por distrofia muscular congénita con

anormalidades oculares (glaucoma congénito, hipoplasia retinal, palidez de los discos ópticos, miopía congénita), hipoplasia cerebral, disgénesis cerebellar, retardo mental severo y ataques epilépticos. Los pacientes presentan hipotonía severa y contracturas (Santavuori *et al*, 1989).

O-manosiltransferasa 1 (POMT1)

El tercer gen es POMT1, que codifica la O-manosiltransferasa 1. La O-manosilación es rara en mamíferos, pero se ha descrito en cerebro, músculo esquelético y nervio humanos, y su alteración modifica la glicosilación de α -DG, causando una MDC autosómica recesiva muy severa, denominada síndrome Walker Warburg (WW), caracterizada por anormalidades oculares y retinales y por los mismos defectos cerebrales presentes en MEB (Cormand *et al*, 2001). El síndrome WW es genéticamente heterogéneo y mutaciones en POMT1 han sido identificadas sólo en el 20% de los pacientes (de Bernabe *et al*, 2003). Otro gen candidato es POMT2, que codifica para una manosiltransferasa localizada también en la membrana del retículo endoplásmico, pero como está expresada en bajos niveles en músculo esquelético, se sugiere que otros genes estén implicados (de Bernabe *et al*, 2003).

Fukutina

El cuarto gen se denomina Fukutina y codifica para una proteína del mismo nombre, la cual se localiza en el Aparato de Golgi y se secreta en gránulos. Aparentemente está involucrada en la modificación de glicoproteínas de superficie y defectos en la migración neuronal. Las mutaciones en este gen causan distrofia muscular congénita Fukuyama (FMDC), la cual es la segunda distrofia muscular más común en Japón, después de DMD (Fukuyama *et al*, 1981). Clínicamente es una distrofia severa asociada con malformaciones

cerebrales (displasia cortical cerebelar y cerebral), retardo mental profundo y anormalidades oftalmológicas (Kondo *et al*, 1999).

Proteína relacionada con la fukutina

El quinto gen es FKRP, que codifica para la proteína relacionada con la fukutina. Se expresa principalmente en corazón y músculo esquelético, se localiza en el Aparato de Golgi y se involucra en la modificación de glicoproteínas y glicolípidos de superficie celular (Brockington *et al*, 2001; Walter *et al*, 2004; Guglieri *et al*, 2005). Mutaciones en el gen FKRP han sido identificadas en pacientes con una MDC severa, la MDC1C, y en una forma media en una LGMD de herencia autosómica recesiva (LGMD2I) (Brockington *et al*, 2001). MDC1 se caracteriza por inicio temprano, hipotonía al nacimiento, hipertrofia muscular, incapacidad para caminar de manera independiente, con músculos faciales involucrados y posible afección ventricular. En LGMD2I el inicio de los síntomas, como debilidad de músculos proximales, afecciones cardíacas y fallas respiratorias, pueden ocurrir en niños, adolescentes y adultos. Una deficiencia secundaria de laminina $\alpha 2$ es típica en MDC1C. En LGMD2I se ha observado una reducción de calpaina-3 y $\beta 1$ -laminina. Recientemente se han encontrado mutaciones en el gen FKRP de pacientes con MEB y WW (Beltran *et al*, 2004).

Calpaina-3

Calpaina-3 es una proteína específica de músculo con actividad proteolítica dependiente de Ca^{2+} . Aunque sus substratos no han sido identificados, se considera que participa en la remodelación del citoesqueleto, y se sugiere que las mutaciones en el gen que la codifica (CAPN3), afectan la interacción proteína-interdominio o reducen su actividad catalítica al disminuir su sensibilidad a Ca^{2+} (Richard *et al*, 1999). Los defectos en esta proteína

causan una forma de LGMD autosómica recesiva (LGMD2A), que en general clínicamente no es severa.

La edad de inicio es extremadamente variable, con un intervalo de 2 a 49 años (Saenz *et al*, 2005), y los pacientes muestran debilidad de los músculos de la cintura pélvica, abarcando glúteos y aductores; la hipertrofia de pantorrillas se ha reportado solo en brasileños. No se han reportado afecciones cerebrales, cardíacas o faciales, pero sí complicaciones respiratorias. Interesantemente, la mayoría de las mutaciones identificadas en el gen CAPN3 se concentran en seis de sus 24 exones, pero la correlación genotipo-fenotipo no ha sido demostrada (Chae *et al*, 2001). En otras distrofias musculares (LGMD2I, LGMD2B, LGMD2J) se ha demostrado una reducción secundaria de calpaina-3 (Chrobakova *et al*, 2004).

TRIM32

Otra de las proteínas asociada a distrofia muscular es TRIM32, y se considera que cataliza la ubiquitinación de proteínas blanco (Frosk *et al*, 2002). Sólo una mutación ha sido identificada en el gen TRIM32; sus efectos no son claros, pero se sugiere que provoca la ubiquitinación de proteínas incorrectas o la acumulación de proteínas que normalmente serían degradadas (Frosk *et al*, 2002). Esta mutación está implicada en una LGMD autosómica recesiva (LGMD2H) reportada en una población Huteriana en Norteamérica (Shokeir y Kobrinsky, 1976). Los pacientes inician síntomas en la segunda o tercera década de vida con debilidad muscular proximal, la progresión es lenta y la mayoría a los sesenta años aún pueden caminar; no hay afecciones cardíacas reportadas pero algunos pacientes presentan debilidad en los músculos faciales con el progreso de la enfermedad (Shokeir y Kobrinsky, 1976).

Selenoproteína N1

Una forma peculiar de MDC con espina rígida, escoliosis y reducida capacidad vital (RSMD1) es causada por mutaciones en un gen que codifica para selenoproteína N1 (SEPN1), la cual es una proteína ubicada en el retículo endoplásmico (Lescure *et al*, 1999). Se sugiere que SEPN1 colabora a mantener un ambiente redox en la célula, previniendo el daño oxidativo. La distrofia muscular con espina rígida (RSMD1) se caracteriza por una marcada limitación en la flexión dorsolumbar y cervical de la espina, con presencia de contracturas y pérdida del movimiento de la espina y la caja torácica (Lescure *et al*, 1999).

Emerina

De las proteínas nucleares relacionadas a distrofia muscular, emerina es una de ellas. Ubicualmente expresada, es una proteína integral (codificada por el gen EMD) que interactúa con proteínas de la matriz nuclear, por lo que se considera que contribuye a la estabilidad estructural de la membrana perinuclear y a la correcta expresión de ciertos genes (Maidment y Ellis, 2002), además de estar implicado en la cinética del ciclo celular (Fairley *et al*, 2002). Las mutaciones en el gen EMD se relacionan con una distrofia muscular de herencia ligada al cromosoma X, denominada Emery-Dreifuss (X-EDMD), la cual es una enfermedad de inicio generalmente en la infancia, de progresión lenta, caracterizada por una tríada de síntomas que comprenden, contracturas tempranas de los tendones de Aquiles, los codos y músculos cervicales posteriores. La debilidad y la pérdida de la masa muscular es lenta y progresiva, de distribución humeroperoneal, proximal en los miembros superiores y distal en los inferiores, con una afectación final de la cintura pélvica. En la edad adulta, generalmente antes de los 30 años, aparece cardiomiopatía,

manifestada con defectos en la conducción atrio-ventricular, que en más del 40% de los pacientes causa muerte súbita, la mayoría de ellos sin síntomas cardíacos previos (Maidment y Ellis, 2002; Bonne, 2003). En mujeres portadoras usualmente se espera el 50% de una expresión normal de emerina ya que la inactivación de uno de sus cromosomas X es al azar, pero se han reportado casos, es decir mujeres sintomáticas (Manilal *et al*, 1998).

Lámina A/C

Dos de las proteínas de matriz nuclear con las que interactúa la emerina son la lámina A y la lámina C, filamentos intermedios multifuncionales, codificadas por el mismo gen (LMNA) y originadas por splicing alternativo. Aún no se conoce la función de estas proteínas ubicuamente expresadas y el por qué mutaciones en ellas causan distintas enfermedades, que afectan específicamente al músculo esquelético o al músculo cardíaco, así como al tejido adiposo, al sistema nervioso periférico y recientemente al hueso (Stuurman *et al*, 1998), (Tabla 1).

Se sabe que las láminas A y C forman homo y heteropolímeros que asociados con la emerina proveen estabilidad a la membrana nuclear; además, por sus interacciones con la cromatina, mantienen una compartimentalización requerida para la diferenciación de mioblastos en miocitos y se sugiere que por su interacción con factores de transcripción regulan la expresión de genes tejido específicos durante la diferenciación celular (Genschel *et al*, 2000; Stuurman *et al*, 1998).

De las enfermedades causadas por mutaciones en el gen LMNA, consideradas distrofias musculares, se han descrito tres, dos de herencia autosómica dominante (AD-EDMD, LGMD1B) y una de herencia autosómica recesiva (AR-EDMD). El fenotipo de los dos tipos de distrofia Emery-Dreifuss, causada por mutaciones en el gen LMNA, es prácticamente

igual al causado por mutaciones en el gen EMD, sólo que se ha observado un espectro más amplio en la severidad de la enfermedad en pacientes con AD-EDMD al compararlos con pacientes con X-EDMD. El fenotipo de LGMD1B tiene un inicio en las primeras dos décadas de vida, la progresión es generalmente lenta, con debilidad en los músculos de la cintura pélvica y proximales, intolerancia al ejercicio, presencia de escápulas aladas, lordosis lumbar y eventualmente hipertrofia de pantorrillas y contracturas; en la edad adulta se manifiestan defectos en la conducción atrio-ventricular y menos frecuentemente cardiomiopatía dilatada (Maidment y Ellis, 2002).

Proteína 2 de unión a poli (A)

Otra proteína de núcleo relacionada con la distrofia muscular es la proteína 2 de unión a poli (A). Se expresa ubicuamente, pero particularmente en músculo esquelético, donde participa en la síntesis y truncado de las colas de poli (A) en las moléculas de mRNA y en la estimulación de la expresión de genes músculo específicos como MyoD (Kim *et al*, 2001). Es codificada por el gen PABP2 que contiene seis repetidos GCG (que codifica para el aminoácido alanina) en individuos normales, pero su expansión a nueve-trece de estos repetidos, altera la función de la proteína resultante (Brais *et al*, 1998).

El fenotipo relacionado con las mutaciones en el gen PABP2 es la distrofia muscular oculofaríngea (OPMD), la cual puede ser de herencia dominante, caracterizada por un inicio tardío (en la quinta década), presencia de ptosis, disfagia, atrofia de la lengua, debilidad de músculos faciales y de los proximales en los brazos. En otros casos presenta herencia recesiva con síntomas similares, pero de progresión más lenta y afecta individuos homocigotos con siete repetidos GCG. Las afecciones cardíacas no son características de ningún tipo de OPMD.

Titina

La titina, también conocida como conectina, es codificada por el gen TTN. Sus agregados forman un miofilamento sarcomérico central expresado en músculo esquelético y corazón que interactúa con otras proteínas sarcoméricas como teletonina, α -actina, obscurina, calmodulina, miosina, nebulina y calpaina-3. Participa en el ensamblaje de las proteínas contráctiles actina y miosina, así como en la contracción y elasticidad de la sarcomera y además se le relaciona con la estabilidad de la degradación autolítica debido a su interacción con calpaina-3 (Hackman *et al*, 2003).

Titina es responsable de LGMD2J, distrofia muscular tibial (TMD), cardiomiopatía dilatada (DCM) y cardiomiopatía hipertrofica (HCM) (Hackman *et al*, 2003). La primera es una LGMD autosómica recesiva severa, descrita inicialmente en una familia consanguínea de Finns (Udd, 1992), caracterizada por inicio en la primera a tercera década de vida con debilidad progresiva de todos los músculos proximales, y los pacientes se ven confinados a una silla de ruedas a más tardar a los 20 años de edad. En algunos casos se desarrolla una debilidad en los músculos distales. No se han descrito afecciones cardíacas ni de músculos faciales.

TMD es una distrofia autosómica dominante de inicio tardío, también observada en Finns, su progresión es lenta con debilidad y atrofia generalmente confinada a los músculos de la parte anterior de las piernas, no se han reportado afecciones cardíacas.

Se ha observado que la misma mutación en el gen TTN puede causar LGMD2J cuando se presenta en homocigosis y TMD cuando se presenta en heterocigosis (Udd, 1992).

Miotilina

La miotilina expresada en músculo estriado, corazón y sistema nervioso periférico, se encuentra codificada por el gen TTID. Esta proteína interactúa con los componentes estructurales sarcoméricos y media un correcto ensamblaje del aparato contráctil (Salmikagas *et al*, 2003). Las mutaciones en su gen causan una LGMD autosómica dominante (LGMD1A), descrita sólo en dos familias (una argentina y otra norteamericana de descendencia alemana) (Salmikagas *et al*, 1999; Hauser *et al*, 2002). Su progresión es lenta, con debilidad en músculos de ambas cinturas, manifestación de disartria en la mitad de los individuos afectados y sin afecciones cardíacas (Hauser *et al*, 2002).

Teletonina

La teletonina codificada por el gen TCAP, se expresa en músculo estriado y cardíaco. En cardiocitos se ha observado que al igual que titina, de la que se considera sustrato, la teletonina es necesaria para la integridad de la sarcomera. Sin embargo, en pacientes distróficos con mutaciones en el gen TCAP la arquitectura sarcomérica se mantiene, sugiriendo que la degeneración muscular y el fenotipo son debidos más a un defecto funcional que a una alteración en la estructura de la sarcomera (Zatz *et al*, 2003).

Una mutación en TCAP se ha asociado a una LGMD autosómica recesiva (LGMD2G), descrita sólo en familias brasileñas (Moreira *et al*, 2000). Esta enfermedad se manifiesta generalmente de los 9 a los 15 años de edad, con marcada debilidad y atrofia en músculos distales de piernas y proximales de las cuatro extremidades. Algunos pacientes presentan hipertrofia de pantorrillas, y en algunos casos se han detectado afecciones cardíacas. De

los 14 pacientes reportados hasta la fecha, 5 han perdido la habilidad para caminar en la tercera o cuarta década (Zatz *et al*, 2003).

ZASZP

ZASP es una proteína asociada a la línea Z de la sarcomera, el gen que la codifica lleva su mismo nombre y se expresa predominantemente en músculo cardíaco y esquelético. Esta proteína interacciona con α -actina y se ha demostrado que es esencial para mantener la estabilidad de la línea Z durante la contracción (Selcen y Engel, 2005). Recientemente se han relacionado mutaciones en el gen ZASP con cardiomiopatía dilatada, y un tipo de distrofia muscular de herencia autosómica recesiva, de inicio tardío, con debilidad de los músculos proximales y distales, algunos pacientes tienen deficiencia cardíaca pero ninguno presenta afecciones respiratorias (Selcen y Engel, 2005).

Otras distrofias musculares

Los casos con implicaciones diafragmáticas tempranas, hipertrofia generalizada y deficiencia secundaria de laminina $\alpha 2$ han sido determinados por cambios en 1q42 y el fenotipo nombrado MDC1B, no obstante no se ha definido el gen o proteína específica alterada (Brockington *et al*, 2000).

En el caso de las LGMD1D-G no se han identificado los genes y las proteínas implicadas en estas distrofias, pero se conoce su localización en diferentes regiones cromosómicas y que los genes implicados son diferentes de los responsables de las otras AD-LGMD (Messina *et al*, 1997; Speer *et al*, 1999; Gamez *et al*, 2001; Palenzuela *et al*; 2003; Starling *et al*, 2005).

En el caso de la distrofia muscular autosómica dominante facioescapulohumeral (FSHD1) no se conoce la proteínas afectada, pero se considera un desorden relacionado con alteraciones en la cromatina. Debido a que en personas sanas la unidad *kpn1* de 3.3 kb (kilobases) se encuentra repetida en tandem en una extensión de 35-300 kb en la región 4q35 del cromosoma 4, y en pacientes con FSHD1 el fragmento es más pequeño de 35 kb. Se ha sugerido que deleciones en el número de esas unidades puede alterar la estructura cromosomal y por lo tanto afectar la activación o inactivación de genes cercanos (Tonini *et al*, 2002). Clínicamente FSHD1 es caracterizado por debilidad progresiva de músculos faciales, proximales de la cintura escapular y ocasionalmente los músculos extensores de los pies y de la cintura pélvica. La afección cardíaca no es común, aunque en algunos casos pueden haber arritmias y defectos en la conducción (Tonini *et al*, 2002). También se le ha relacionado a un fenotipo de LGMD aún no clasificado y se han reportado personas con

una extensión menor a 35 kb de la unidad *kpn1*, sin manifestaciones clínicas (Tonini *et al*, 2002).

Incidencia de las distrofias musculares

Existen pocos estudios epidemiológicos fiables sobre las distrofias musculares y los resultados no son homogéneos ni comparables entre sí por haberse realizado con metodologías y criterios diferentes, en países con medios y cultura sanitaria disímiles y sobre bases poblacionales muy variadas. Sin embargo, gracias a estos estudios podemos darnos una idea de la incidencia de ciertas distrofias.

Así sabemos que la distrofia más común es la DMD, que afecta a 1 de cada 3,500 a 4,000 varones nacidos vivos, seguida por la BMD, que tiene una incidencia de 1/30,000 varones nacidos vivos (Blake y Kroger, 2000; Prior y Bridgeman, 2005). Tanto para DMD como para BMD se sabe que un tercio de los casos corresponde a mutaciones *de novo* en el gen DMD (Ozawa *et al*, 1998).

En tercer lugar se ubica EDMD, con una incidencia estimada de 1/50,000 personas, siendo la forma de herencia dominante más prevalente que la ligada al X y la recesiva (Maidment y Ellis, 2002).

De las 17 LGMD, las formas autosómicas recesivas son nueve veces más comunes que las autosómicas dominantes (Zatz *et al*, 2003). Las sarcoglicanopatías (LGMD 2C-2F) se han estimado en 2-54% en diferentes poblaciones (2% en Japón, 10% en Inglaterra, 27% en E.U.A., 54% en Italia), sin embargo estos porcentajes de incidencia han sido estimados basándose en diferentes criterios (Vainzof *et al*, 1999). En el norte de África y Turquía las sarcoglicanopatías son las formas más prevalentes; mientras que en Europa la LGMD2A (calpainopatía) es más común en Italia y España y LGMD2I (deficiencia de la proteína

relacionada con la fukutina) en Inglaterra. En Norteamérica la más frecuente es LGMD2B (un tipo de disferlinopatía) (Zatz *et al*, 2003).

De las once formas de MDC la más común es MDC1A (deficiencia de laminina $\alpha 2$), con alrededor del 40% de los casos (Vainzof, 2005).

Algunas distrofias son especialmente frecuentes en ciertas poblaciones, por ejemplo, FMDC (fukutinopatía) es frecuente en Japón, OPMD (deficiencia de la proteína 2 de unión a poli (A)) en Franco-canadienses (uno por cada mil nacimientos) (Maidment y Ellis, 2002), y LGMD2G (teletoninopatía) en brasileños.

Otras distrofias musculares son raras y hasta ahora descritas solo en ciertas regiones, entre ellas LGMD2J (un tipo de titinopatía) y TMD (un tipo de titinopatía) descritas solo en Finns, LGMD2H (deficiencia de TRIM32) descrita solo en Huterianos (Tabla 1) (Emery, 2002; Maidment y Ellis, 2002; Tonini *et al*, 2002).

En nuestro laboratorio hemos detectado que después de DMD y BMD, la LGMD2B (un tipo de disferlinopatía) es la distrofia muscular más frecuente en una población mexicana.

Variabilidad fenotípica

Pese a que existen características clínicas para cada distrofia muscular, en la mayoría de los casos los distintos fenotipos observados representan un serio problema para su clasificación y esto se agrava cuando se descubre que una mutación específica se manifiesta en diferentes fenotipos dentro de una misma familia. Como un ejemplo claro de ello Bonne *et al* (2000) describieron una familia, con una misma mutación en el gen LMNA, de cuyos miembros una parte presenta AD-EDMD, mientras que otros han desarrollado LGMD1B. 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). También han sido reportadas familias en las cuales una mutación idéntica en disferlina puede resultar en LGMD2B en algunos miembros de la familia y MM en otros (Ueyama *et al*, 2001).

La variabilidad fenotípica no puede ser explicada por dieta, ejercicio o factores ambientales (McNally *et al*, 1996; Nakamura *et al*, 2002), puede deberse posiblemente a una alteración en el procesamiento de proteínas (Norwood *et al*, 2000), modificaciones a secuencias regulatorias, en las que pueden estar implicadas retrotransposones (Whitelaw y Martin, 2001), o a genes modificadores (Pennacchio *et al*, 2001). Heydemann *et al* (2005) demostraron esta última posibilidad para el caso de LGMD2C usando un modelo de diferentes cepas de ratones nulos para γ -SG modificados genéticamente con diferente fondo genético, en los que observaron una clara variabilidad fenotípica.

Diagnóstico

El diagnóstico en las distrofias musculares se inicia con una historia clínica y examen detallado del paciente e historia familiar. Otro tipo de estudio complementario es la determinación de enzimas séricas, la cual es de gran importancia. De manera general, en todos los casos debido al daño en el tejido muscular, se observan elevaciones significativas de enzimas como fosfocreatinquinasa (CPK), difosfofructosa aldolasa, piruvato cinasa, aspartato amino transferasa, glucosa fosfato isomerasa, deshidrogenasa láctica, anhidrasa carbónica III y enolasa. La elevación de estas enzimas es más marcada en las primeras etapas de la enfermedad y después disminuyen a medida que se deteriora la función muscular.

Entre las pruebas enzimáticas, la determinación de CPK se considera la más útil para complementar el diagnóstico de las distrofias musculares, pues se eleva en suero en forma marcada y constante debido a que se presenta en cantidades significativas en músculo esquelético, corazón y cerebro (Porter, 2000; Emery, 2002). Se sabe que los niveles de CPK en las distrofias autosómicas recesivas y DMD generalmente están elevados y tienden a disminuir conforme progresa la enfermedad, mientras que en distrofias autosómicas dominantes los niveles pueden ser normales (Urtasun y Lopez, 1999).

La electromiografía (EMG) es otra prueba muy importante en el diagnóstico diferencial de las miopatías. En la mayoría de los casos se detecta un patrón miopático caracterizado por disminución en la duración promedio de los potenciales de unidad motora y aumento en

las fibras polifásicas, que refleja pérdida de las fibras musculares en una forma totalmente distinta de las que aparecen en las neuropatías (Zatz, 1978).

Histológicamente en una biopsia de músculo esquelético pueden evidenciarse alteraciones específicas de las distrofias musculares. En etapas preclínicas e iniciales, se puede encontrar variaciones en el tamaño de las miofibras con desplazamiento interno de los núcleos celulares, así como fibras regenerativas. Conforme la enfermedad progresa, la estructura intracelular se destruye, hay invasión por macrófagos y reemplazo del tejido muscular por tejido conectivo y/o adiposo (Emery, 2002).

Inicialmente el diagnóstico puede sustentarse en la caracterización clínica, el patrón de herencia, los niveles séricos de CPK, electromiografía y biopsia muscular; sin embargo, la variabilidad fenotípica puede impedir diferenciar una distrofia muscular de otra (Vainzof *et al*, 2005). Actualmente se utilizan pruebas diagnósticas más precisas, incluyendo la evaluación de los niveles de expresión de las proteínas por inmunofluorescencia con anticuerpos específicos y la posterior identificación de mutaciones mediante técnicas de biología molecular (Pogue *et al*, 2001).

Cabe mencionar que existen otras enfermedades que presentan debilidad muscular de extremidades superiores e inferiores tales como las miopatías mitocondriales metabólicas, las cuales se diferencian mediante ensayos de las actividades enzimáticas correspondientes. También algunas enfermedades neurológicas, como la atrofia muscular espinal, cuyos cambios histopatológicos en músculo y de electromiografía son muy específicos. Y otras enfermedades a excluirse son la polimiositis y dermatomiositis, así como deficiencias vitamínicas o miopatías inflamatorias idiopáticas (van der Kooi *et al*, 1994).

Asesoramiento genético

El asesoramiento genético en estas enfermedades es importante debido a su carácter hereditario. Actualmente, gracias a pruebas moleculares, en muchos casos es factible ubicar la localización de las mutaciones en los genes relacionados a distrofia muscular. Con esta información es posible determinar con precisión no sólo la causa de la distrofia muscular en los pacientes sino que es posible determinar la existencia de portadores dentro de las familias.

La determinación del estatus de portador(a) permite la prevención (Alcantara *et al*, 1999) ya que la asesoría genética les otorga el conocimiento para tener la oportunidad de tomar decisiones con respecto a un posible embarazo y sus consecuencias, las cuales dependen del gen afectado y su modelo de herencia.

En la herencia ligada al cromosoma X el gen afectado es transmitido a través de mujeres heterocigotas, cuya descendencia tendrá 50% de posibilidades de ser portadora si es mujer; si es varón tendrá 50% de posibilidades de estar afectado.

En el caso de las enfermedades que sigan un modelo de herencia autosómica recesiva, pueden afectarse individuos de uno u otro sexo. Siempre y cuando se hereden dos alelos mutados, uno por cada uno de los progenitores. Cada miembro de su descendencia tiene 25% de probabilidad de heredar ambas copias del gen mutado, y 50% de ser portador de un solo alelo mutado.

En las enfermedades con herencia autosómica dominante, la descendencia tendrá 50% de posibilidades de ser afectada (Erazo, 2004).

El saber con certeza qué gen está afectado permite predecir el progreso de la enfermedad, la posibilidad de implicaciones cardiovasculares en el paciente y si su esperanza de vida estará limitada por la enfermedad (Bushby 2001).

RESUMEN

Las distrofias musculares son un grupo heterogéneo de desórdenes miopáticos determinados genéticamente, caracterizados principalmente por la pérdida progresiva y debilidad de músculo esquelético. Estos desórdenes presentan un curso clínico altamente variable referente a edad de inicio, músculos afectados, daño en corazón, tipo de progresión y modo de herencia. Debido a la similitud en el fenotipo de pacientes afectados por mutaciones en diferentes genes y las diferencias en pacientes portadores de la misma mutación, existe dificultad para realizar un diagnóstico clínico preciso. Lo anterior ha propiciado que se busquen alternativas para un mejor diagnóstico y una mayor comprensión de la fisiopatología de estas enfermedades poco exploradas en México.

En este trabajo se creó un banco de biopsias musculares de 77 pacientes con cuadro clínico compatible con distrofia muscular, de los cuales 45 (58.4%) reportaban una deficiencia primaria para alguna de las proteínas: distrofina, α , β , γ , δ SGs y disferlina, y 32 (41.6%) una expresión normal de éstas proteínas. Mediante inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos para caveolina-3, laminina α 2, teletonina, emerina, lámina A y lámina C se estudiaron los 77 pacientes. Se detectó un paciente con deficiencia de laminina α 2. Los demás mostraron un patrón de expresión normal, por lo cual sugiere que no existe una relación entre las proteínas analizadas en este trabajo y las proteínas previamente examinadas en los pacientes.

También se analizó la presencia de mutaciones en el gen DYSF en tres pacientes con deficiencia de disferlina, usando una combinación de RT-PCR y subsiguiente secuenciación automatizada de los 55 exones que codifican la proteína. Se detectaron seis polimorfismos y en un paciente se encontró una nueva mutación (4253 G>A) en el exón 39 de la proteína. Al realizar el análisis de la segregación de la mutación en la familia del paciente, se detectó a los familiares portadores, a quienes se les proporcionó asesoramiento genético.

ABSTRACT

The muscular dystrophies are a heterogeneous group of disorders determined genetically, characterized principally by the progressive loss and weakness of skeletal muscle. These disorders present a clinical highly changeable course relating to age of beginning, affected muscles, damage in heart, type of progression and mode of inheritance. Due to the similarity in the patients' phenotype affected by mutations in different genes and the differences in carrying patients of the same mutation, difficulty exists to realize a clinical precise diagnosis. The previous thing has propitiated that look for alternatives for a better diagnosis and a major comprehension of the fisiopatology of these diseases little explored in Mexico.

In this work there was created a bank of muscular biopsies of 77 patients by clinical compatible with muscular dystrophy, of which 45 (58.4 %) was bringing a primary deficiency for someone of the proteins: dystrophin, α , β , γ , δ SGs and dysferlin, and 32 (41.6 %) a normal expression of these proteins. By means of immunohistochemical analysis with specific antibodies for caveolin-3, laminin α 2, telethonin, emerin, laminin A and laminin C 77 patients were studied. A patient was detected by deficiency of laminin α 2. The others

displayed normal expression, for which it suggests that a relation does not exist between the proteins analyzed in this work and the proteins before examined in the patients.

Also the presence of mutations was analyzed in the gene *DYSF* in three patients by deficiency of dysferlin, using RT-PCR combination and subsequent automated sequence of the 55 exons that codify the protein. Six were detected polymorphism and in a patient one found a new mutation (4253 G> A) in the exon 39 of the protein. On having realized the analysis of the segregation of the mutation in the family of the patient, there were detected the carrying relatives, to whom genetic counseling was provided.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

En el estudio de las distrofias musculares poco se entiende sobre por qué algunos músculos son afectados mientras otros permanecen sin un mayor cambio o la similitud en el fenotipo de pacientes afectados por mutaciones en diferentes genes y las diferencias en pacientes portadores de la misma mutación, lo cual dificulta el diagnóstico clínico preciso. Por otra parte, durante la última década se ha incrementado a más de treinta el número de genes asociados a 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 este fin es la producción y utilización de anticuerpos dirigidos contra las distintas proteínas involucradas en las distrofias musculares. Mediante el empleo de pruebas inmunohistoquímicas es posible identificar en primera instancia la proteína ausente o deficiente, lo cual sirve como un paso previo muy importante para el análisis posterior del gen y la determinación de la mutación responsable de la enfermedad. La correlación de las observaciones clínicas del padecimiento con el defecto molecular, permitirá conocer más sobre los mecanismos moleculares de las distintas distrofias musculares. Sin embargo, en México, como en otros países, existe un porcentaje de los pacientes que quedan sin diagnóstico preciso por no contar con anticuerpos para todas las proteínas relacionadas a distrofias musculares. Es por ello que emplear anticuerpos específicos contra proteínas tales como caveolina-3, laminina $\alpha 2$, teletonina, emerina, lámina A y lámina C, resulta de suma importancia para conocer más sobre la fisiopatología de estas distrofias musculares y aportar conocimientos nuevos en cuanto a su incidencia en nuestro país.

Además, debido a que en varios fenotipos de diferentes distrofias musculares se ha observado la deficiencia secundaria de una o más proteínas, es importante de manera exploratoria investigar una posible correlación de las proteínas antes mencionadas en

biopsias musculares de pacientes cuyo patrón de expresión resulte anormal para alguna de las proteínas distrofina, $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ SGs y disferlina.

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

En México se han realizado estudios puntuales, analizando características clínicas, fisiológicas y moleculares de las diferentes distrofias musculares. Principalmente se han enfocado a la exploración y perfeccionamiento de las técnicas de detección de mutaciones en el gen de distrofina en pacientes DMD/BMD mexicanos, así como en las portadoras de mutaciones en este gen (Alvarez *et al*, 1990; Coral *et al*, 1993; Alvarez *et al*, 1994; Salamanca *et al*, 1995; Arenas *et al*, 1996; Coral *et al*, 1997; Camelo *et al*, 1997; Alcantara *et al*, 1999).

Más recientemente, nuestro grupo de trabajo utilizando inmunofluorescencias como herramienta principal, ha desarrollado estudios enfocados al diagnóstico molecular, conocimiento de la frecuencia y características en población mexicana de un número amplio de distrofias. En un primer paso se contaba sólo con anticuerpos para distrofina, posteriormente se emplearon anticuerpos para α , β , γ y δ sarcoglicanos y laminina $\alpha 2$ (Barraza, 2001; Coral *et al*, 2003; Meza, 2005) y recientemente para disferlina. Sabemos, por los trabajos realizados en otros países, que estas proteínas representan un porcentaje mayoritario de las distrofias musculares hasta hoy descritas (Vainzof *et al*, 1999; Blake y Kroger, 2000; Vainzof *et al*, 2001; Zatz *et al*, 2003; Vainzof *et al*, 2005; Guglieri *et al*, 2005) y que en nuestro país, al igual que en Estados Unidos (Zatz *et al*, 2003), la LGMD2B o disferlinopatía es la LGMD más común.

Aun así, en un gran número de pacientes con distrofia muscular, el patrón de expresión para las proteínas (distrofina, α , β , γ y δ SGs, laminina $\alpha 2$ y disferlina) es normal en el análisis de biopsias. Barraza, en el 2001, reportó dieciséis de estos casos, de 33 pacientes estudiados, es decir el 48.4% y Meza, en 2005, reportó 33 casos similares de 74 pacientes estudiados, es decir el 48.6%. Estos pacientes se mantienen sin un diagnóstico preciso.

OBJETIVO GENERAL

Analizar bioquímicamente la expresión de caveolina-3, laminina $\alpha 2$, teletonina, emerina, lámina A y lámina C en pacientes mexicanos con distrofias musculares, así como analizar la presencia de mutaciones en el gen de disferlina en pacientes con LGMD2B.

Objetivos particulares

- Crear un banco de biopsias de músculo esquelético y de DNA de pacientes con distrofia muscular.
- Clasificar a un grupo de pacientes con distrofias musculares de acuerdo al patrón de herencia y las características clínicas de la enfermedad.
- Evaluar mediante inmunofluorescencia indirecta la expresión proteínica de caveolina-3, laminina $\alpha 2$, teletonina, emerina, lámina A y lámina C en biopsias musculares de pacientes con distrofia muscular.
- Establecer la posible correlación existente entre genotipo y fenotipo en el grupo de pacientes con distrofia muscular analizado.
- Determinar la existencia de mutaciones en familias con un patrón de expresión deficiente para disferlina.

METODOLOGÍA

Pacientes

A los pacientes captados en el servicio de Medicina Física y Rehabilitación del Hospital Infantil de México; el Servicio de Rehabilitación del Instituto Nacional de Rehabilitación; el Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS; el Servicio de Neurología del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional La Raza, IMSS; el Servicio de Patología Neuromuscular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía y el Servicio de Patología del Instituto Nacional de Pediatría, con un posible diagnóstico de distrofia muscular, se les aplicó un cuestionario (Anexo 1) con el fin de seleccionar a todos aquellos individuos que cumplieran los criterios clínicos para las distrofias musculares (Bushby y Beckmann, 1995). En cada caso se recabaron antecedentes familiares, así como datos clínicos y paraclínicos del paciente. Como criterio de inclusión se consideró un cuadro clínico compatible con distrofia muscular.

Biopsias musculares

Previo consentimiento informado (Anexo 2), se tomó de los pacientes una biopsia de músculo cuádriceps o deltoides, la cual se fijó en isopentano (2- Metilbutano, SIGMA) congelado con nitrógeno líquido a -160°C y se mantuvo a una temperatura de -70°C a -80°C hasta su uso.

Inmunofluorescencia indirecta

A partir de las biopsias de músculo esquelético se realizaron cortes transversales de entre 7 y 10 μm de grosor con un criostato MICROM HM550. Se colocaron en portaobjetos previamente tratados con poli-L-lisina (SIGMA-ALDRICH), junto a un control positivo obtenido de músculo esquelético sin alteraciones histológicas donado por el Servicio de

Patología Neuromuscular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Antes del bloqueo, el tejido se permeó con Tritón X-100 al 0.3% p/v, PBS 1X a temperatura ambiente durante 10 min. Para bloquear la señal de fondo (señal inespecífica) los cortes se incubaron con solución bloqueadora, la cual se compone de amortiguador de sales de fosfato de sodio (PBS 1X) y albúmina sérica bovina (SIGMA-Fracción V) al 5.0% p/v, durante 60 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo las muestras se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 4) a 4°C toda la noche. Al término de este tiempo, las preparaciones se lavaron cuatro veces con PBS 1X frío por 5 min cada vez y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario respectivo. Transcurrido este tiempo las laminillas se lavaron cuatro veces con PBS 1X frío, 5 min cada vez. Posteriormente se eliminó el exceso de solución amortiguadora y se adicionaron 10 µl de medio de montaje Vecta Shield con 4¹,6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorido, DAPI (Laboratorios Vector) y se montó la preparación. Las señales de fluorescencia de las muestras se observaron con un microscopio de fluorescencia (Carl-Zeiss, Axioplan II-Apotome) con un aumento final de 400X y se les tomó una fotografía.

Tabla 4. Condiciones para inmunofluorescencias con anticuerpos específicos.

Anticuerpo primario	[]/Diluyente	Anticuerpo secundario	[]/Diluyente
Emerina , NeoMarker Inc. región amino terminal	1:300/BSA 1X	CY-3 cabra anti-ratón, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.	1:300/BSA 1X
Lámina C, Santa Cruz Biotechnology Inc.	1:50/BSA 1X	CY-3 cabra anti-ratón, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.	1:300/PBS 1X
Lámina A, Santa Cruz Biotechnology Inc.	1:50/PBS 1X	CY-3 burro anti-cabra, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.	1:100/PBS 1X
Laminina α 2, Chemicon International	1:5000/PBS 1X	CY-3 cabra anti-ratón, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.	1:250/PBS 1X
Caveolina-3, Santa Cruz Biotechnology Inc.	1:150/BSA 5X	CY-3 cabra anti-ratón, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.	1:200/BSA 5X
Teletonina, Santa Cruz Biotechnology Inc.	1:150/BSA 5X	CY-3 burro anti-cabra, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.	1:100/PBS 1X

Extracción de DNA

Previo consentimiento firmado (Anexo 2), se obtuvieron 5 ml de sangre periférica de cada uno de los pacientes que conforman el grupo de estudio. Las muestras de sangre se colectaron en tubos Vacutainer™ utilizando EDTA como anticoagulante, éstas se centrifugaron a 3,500 rpm durante 15 min. Los leucocitos en la interfase se separaron por aspiración con un bulbo a través de una pipeta pasteur y se colectaron en un tubo cónico de 16 ml para ser lavados 2 ó 3 veces y así eliminar los eritrocitos remanentes, utilizando para ello un amortiguador de lisis de eritrocitos RCLB (por sus siglas en inglés Red Cell Lysis Buffer; TRIS 10mM pH 7.6, MgCl₂ 5mM y NaCl 10mM). La pastilla de células blancas resultantes se resuspendió en 180 µl de NaCl 5mM, que se colectaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril y se le adicionaron 90µl de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% con el fin de romper las membranas celulares. Se mezcló repetidamente con micropipeta y se dejó incubar durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 615.9 µl de una solución saturada de NaCl para precipitar las proteínas y restos celulares producto de la lisis. Se mezcló por pipeteo con punta ancha y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente para después centrífugar a 14,000 rpm durante 15 min, recuperando el sobrenadante en un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril. El DNA se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto frío. Se dejó incubando durante 5 min a temperatura ambiente, para permitir que el DNA precipitara por completo y posteriormente se eliminó el sobrenadante. Con el fin de eliminar el exceso de sales y obtener un DNA limpio, se hicieron de 2 a 3 lavados con 1 ml de etanol al 75% dos veces a 14,000 rpm durante 5 min. Finalmente se eliminó el etanol dejando secar el DNA a temperatura ambiente para posteriormente solubilizarlo en un volumen de 100 µl de agua estéril.

La concentración de todas las muestras obtenidas se calculó por medio de un análisis espectrofotométrico (espectrofotómetro Ultrospec 2000 Pharmacia-biotech) con luz UV realizando lecturas a 260 y 280 nm.

Sabiendo que $1\text{D.O.}_{260} = 50\text{ ng}/\mu\text{l}$ de DNA,

La concentración se calculó con la siguiente fórmula:

$$[\text{DNA}] \text{ ng}/\mu\text{l} = A_{260} (\text{dilución}^{-1})(50 \text{ ng}/\mu\text{l})$$

La relación 260/280 indica la pureza de DNA obtenido. Se considera que las relaciones comprendidas entre 1.8 y 2.0 unidades de D.O. son las óptimas (Sambrook *et al*, 1989).

Para determinar la calidad de las muestras se realizaron electroforesis en geles horizontales de agarosa 1% teñidos con bromuro de etidio [0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$] utilizando como amortiguador TBE 1X (Tris-base 89 mM, ácido bórico 89mM y EDTA 2 mM) (Sambrook *et al*, 1989). Las muestras de 1 μl de DNA se mezclaron con colorante de corrida que contiene azul de bromofenol al 0.1% y glicerol al 30% y se corrieron a 100 Volts durante 12 min. El DNA en geles de agarosa se visualizó en un analizador de imágenes. Todas las muestras se ajustaron a una concentración de 100 ng/ μl .

Extracción de RNA total de músculo esquelético de biopsias de pacientes con LGMD2B

El RNA total fue aislado a partir de las biopsias de pacientes con LGMD2B por medio del método de extracción fenólica con TRIZOL (Reagent® Invitrogen™ Life Technologies) de Chomczynski (Chomczynski y Sacchi, 1987). Este método se basa en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para la lisis de las células y la separación de la muestra en dos fases (acuosa y orgánica). Seguida de la extracción y precipitación del RNA total con cloroformo e isopropanol respectivamente a partir de la fase

acuosa. De 20 a 100 μg de cada muestra en presencia de 1.0 ml de TRIZOL frío (fenol-sales de guanidina), se homogenizaron con un homogenizador (Polytron® PT 1200, Kinematica AG), en un tubo de 1.5 ml. Las aspas del homogenizador fueron previamente lavadas con NaOH 1.0 N en agua DEPC (dietil-pirocarbonato) 0.1%.

El tejido homogenizado se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min a 4°C para precipitar restos celulares y proteínas. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril libre de RNAsas previamente enfriado y se le adicionaron 200 μl de cloroformo frío, se agitó vigorosamente durante 15 seg y se incubó en hielo durante 5 min. Posteriormente la muestra se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min a 4°C para separar por diferencia de densidad la fase fenólica orgánica que contiene al DNA y restos de proteínas desnaturalizadas y la fase superior acuosa que contiene el RNA en cloroformo.

La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se adicionaron 500 μl de isopropanol frío para precipitar el RNA. La pastilla se lavó con etanol al 75% y se centrifugó durante 5 min a 12,000 rpm a 4°C (2 veces). En el último lavado, el etanol se eliminó y la pastilla se secó a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 min. Al final, la pastilla de RNA se disolvió en 50 μl de agua DEPC estéril fría, se agitó y se tomó una alícuota de 5 μl para más adelante cuantificar y determinar la integridad del RNA total. Al resto se le agregó 1/10 del volumen total de acetato de potasio 2.0 M y 2 volúmenes de etanol absoluto y se almacenó a -70°C para los subsecuentes ensayos (RT-PCR's).

Se verificó la integridad del RNA por medio de electroforesis corriendo 3 μl de éste en geles horizontales de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio [0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$] utilizando como amortiguador TBE 1X. Las muestras de RNA se mezclaron con colorante de corrida que contiene azul de bromofenol al 0.1% y glicerol al 30%, y se corrieron a 70 Volts durante 15 min. Las cámaras de electroforesis se lavaron previamente durante 15

min con una solución de NaOH 0.2N y se enjuagaron con agua DEPC. Todas las soluciones y reactivos empleados se prepararon con agua DEPC con la finalidad de inactivar RNAsas. El RNA se visualizó en un analizador de imágenes.

Las muestras de RNA obtenidas se cuantificaron espectrofotométricamente (espectrofotómetro Ultrospec 2000 Pharmacia-biotech) realizando lecturas a 260 y 280 nm.

Sabiendo que $1D.O._{260} = 40 \text{ ng}/\mu\text{l}$ de RNA,

La concentración se calculó con la siguiente fórmula:

$$[\text{RNA}] \text{ ng}/\mu\text{l} = A_{260} (\text{dilución}^{-1})(40 \text{ ng}/\mu\text{l})$$

La relación 260/280 indica la pureza de RNA obtenido. Se considera que las relaciones comprendidas entre 1.8 y 2.0 unidades de D.O. son las óptimas (Sambrook *et al*, 1989).

Transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

A partir del RNA total de los pacientes con LGMD2B se sintetizó cDNA (DNA complementario) por medio de transcripción reversa utilizando el método de oligonucleótidos al azar el cual se realizó de la siguiente manera. 2 μg de RNA total precipitado se resuspendieron en 10.5 μl de agua DEPC y se mezcló con 0.5 μl de oligonucleótidos al azar (0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Esta mezcla se desnaturalizó a 72 °C durante 3 min en un termociclador (T1 Thermocycler, Biometra™), posteriormente la mezcla se colocó en hielo donde se le agregó la siguiente mezcla: 1 μl de solución de dNTP's 10 mM, 2 μl de DTT 0.1 M (dithiothreitol) como inhibidor de RNAsas y 1 μl de transcriptasa reversa M-MLV 200U/ μl (Invitrogen™ Life Technologies). Una vez que se adicionó esta mezcla se sometió a un ciclo de síntesis de cDNA durante 60 min a 37 °C y finalmente, un ciclo de 6 min a 94 °C. Terminados los ciclos el cDNA se almacenó a -20 °C.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para identificar algún cambio en la secuencia exónica del gen de disferlina basándonos en la secuencia de cDNA de este gen ([NM_003494](#)), con el programa OLIGO 4.1 (Primer analysis software, National Biosciences Inc. ©1989-92), se diseñaron 22 pares de oligonucleótidos (Tabla 5), en intervalos de entre 258 y 387 pares de bases (pb) y de manera que los amplificados quedaran sobrepuestos en los extremos para asegurar un análisis completo de secuencia. Las condiciones de reacción fueron: 2.5 μ l de cDNA, 1 unidad de Taq polimerasa (Invitrogen™ Life Technologies), 5 pmol de cada oligonucleótido (sentido y antisentido), 0.2 mM de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP's), 3mM de cloruro de magnesio, 50 mM de cloruro de potasio, 20mM de Tris-HCl (pH 8.4) y agua para llevar a un volumen final de 25 μ l.

La PCR consistió de una desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, seguida de 30 ciclos conformados por desnaturalización de 30 seg a 95 °C, alineamiento 30 seg a 60 °C y extensión de 30 seg a 72 °C, por ultimo una extensión final de 7 min a 72 °C. En todas las reacciones se incluyó un control negativo y se llevaron a cabo en un termociclador (T1 Termocycler, Biometra™). Los productos obtenidos de la PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa horizontal al 2.0% teñido con bromuro de etidio (0.5 μ g/ml). Los 25.0 μ l del volumen total se mezclaron con 2.0 μ l de colorante de corrida, azul cianolxileno al 0.25% en 30% de glicerol y se corrieron a 120 Volts durante 4 horas, junto con el control negativo y un marcador de peso molecular (escalera de 100 pb). Para la purificación de la banda correspondiente al tamaño esperado del producto amplificado, se siguió el protocolo de extracción rápida en gel por centrifugación en columnas de resina-sílica (Marligen Bioscience™ Inc.). Estos productos purificados se cuantificaron en un gel de agarosa 1% con un marcador de masa (Invitrogen™ Inc.) y las imágenes se analizaron en un

fotodocumentador con el programa Digital Imaging System. Debido a la baja expresión del transcrito de disferlina se realizó una segunda ronda de PCR's con 1 ng del producto amplificado ya purificado de la primera ronda de PCR's, bajo condiciones idénticas a la primera amplificación. Los productos de esta segunda ronda de amplificación también se purificaron, cuantificaron y almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabla 5. Oligonucleótidos para amplificar exones del gen DYSF. Secuencia, posición y tamaño esperado de los productos amplificados a partir de cDNA.

Oligonucleotido	Secuencia (5'-3')	Posición	Tamaño de producto amplificado (pb)
1S	GCAAAATGCCGTGCATTGG	15-366	371
1A	TGAAGACCCTCAGCATGCTT		
2S	AGCCCTCTTTGCGCCCTG	324-668	362
2A	GCAGGGGGGCATTGAAGC		
3S	TCGCCACCCTAGTCTGTC	644-953	327
3A	TGATCCCGGGTGTAGTGGG		
4S	CACCCCAAGGAACTACCTT	921-1289	387
4A	CGGGGCTCTCTGTAATGG		
5S	TCTCTCAGGACAGATGCTCT	1240-1602	382
5A	GGTCCACCAAGTTCTTCTTG		
6S	CAGATCTTTGGCTTCGAGAGT	1579-1919	360
6A	GATGTAGCAGGGCCAAAAG		
7S	TTGGATGACTACCTGGGCTT	1891-2201	330
7A	GATGCTGACCTCAAACCTGGA		
8S	CTGCAGGATGTGGATGATGC	2179-2534	375
8A	ATGGATGTCACCCAGAGGCT		
9S	GATGAGCTCATCGCAGGCT	2509-2827	337
9A	TGCCACAGTAGTTGGCACC		
10S	CCCACCAAGTCTCTTCTC	2801-3142	360
10A	ACCAATCTCCAGCCAGGT		
11S	AGTACCCAAGGACAGCTTC	3104-3450	366
11A	ACATCTTCTCAGCAGGGACC		
12S	GAGCGGAAGCCGAAGCACT	3430-3782	372
12A	GCAGGAAATCGTGGGTCTGT		
13S	AAGATTCCATGTCCGTCTCC	3743-4071	348
13A	CCATAAACTCGTCTGCACCA		
14S	AGCTGTACGACCATGACACT	4049-4398	369
14A	CCAGCTGGTAACTCTTCATG		
15S	CCATCGAGATCCTGGCATG	4367-4698	350
15A	TAGGCTCACATCGTCTGGG		
16S	TACTCGCGGAGAGTCCAT	4666-5023	376
16A	GTCTTCTGGGAGGGGATA		
17S	GTGATTGGTGAATTTAAGGCG	4990-5323	353
17A	TTTTCGTCCTTGGAGAGGAG		
18S	CCTCTGGAGAAGGACCTAAA	5281-5620	358
18A	GCTGAAGCACATGCAGAGC		
19S	AGTGGAGGAGCGTCTGGCT	5604-5951	367
19A	GAAGTTGCCTTCACCTCCA		
20S	AGACGTGCATTATCGTTCCC	5931-6251	340
20A	GCCCTTCACTGTTTTCTGCT		
21S	ATGCTTTCACCCAGAATGG	6215-6572	377
21A	CTTCATGGCAGCATAGTTCCG		
22S	GCCATCTTCATCTACGCCTT	6550-6832	303
22A	TCTGAGCTGATCCAAAAAAGC		

S: sentido, A: antisentido

Secuenciación y análisis de secuencias de los productos amplificados del gen de disferlina

Con los productos de PCR's purificados se secuenciaron la cadena sentido (S) y la antisentido (A) con las siguientes condiciones de reacción: 10 ng de cDNA por cada 100 pb a secuenciar, 1 µl de mix Big Dye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems™), 10 pmol de oligonucleotido y agua para llevar a un volumen final de 15 µl. La reacción se realizó en un termociclador (T1 Termocycler, Biometra™), consistió de una desnaturalización inicial de 3 min a 96 °C, seguida de 45 ciclos conformados por desnaturalización de 10 seg a 96 °C, alineamiento 10 seg a 55 °C y extensión de 4 min a 60 °C. Para la purificación de la reacción se siguió el protocolo por centrifugación en columnas de sefadex (Marligen Bioscience™ Inc.). Finalmente, las muestras se secaron a 40 °C durante 20 min en una centrífuga al vacío (Concentrator 5301 Eppendorf™). Las muestras procesadas se secuenciaron en un equipo Abi Prism™ 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems™) en el departamento de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Las secuencias obtenidas así como su secuencia traducida (obtenida con el programa DNAMAN versión 3.0 Lynnon BioSoft © 94-97) se alinearon a la secuencia consenso (NM_003494.) mediante el programa Pairwise alignment-needle and water from EMBOSS (<http://artedi.ebc.uu.se/programs/pairwise.html>).

Análisis de la segregación de la mutación 4253 G>A

Debido a que el cambio homocigoto de 4253 G>A encontrado en el exón 39 del gen de disferlina de una paciente con LGM2B no estaba reportado, se realizó un análisis en el programa NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) para conocer que endonucleasa podía servir para un análisis de restricción en 100 cromosomas normales no

relacionados y poder determinar si el cambio era un polimorfismo. Para este fin se diseñaron un par de oligonucleótidos, 5´ TCACCGTCAAGGTCATCGA 3´ el sentido y 5´ GGGTCACACAGGAAGCTCT 3´ el antisentido, basándonos en la secuencia del exón 39 de disferlina. Las condiciones de reacción fueron: 100 ng de DNA geonómico, 1 unidad de Taq polimerasa (Invitrogen™ Life Technologies), 5 pmol de cada oligonucleótido (sentido y antisentido), 0.2 mM de dNTP's, 3 mM de cloruro de magnesio, 50 mM de cloruro de potasio, 20mM de Tris-HCl (pH 8.4) y agua para llevar a un volumen final de 25 µl. La PCR consistió de una desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, seguida de 30 ciclos conformados por desnaturalización de 30 seg a 95 °C, alineamiento 30 seg a 57 °C y extensión de 30 seg a 72 °C, por ultimo una extensión final de 7 min a 72 °C. En todas las reacciones se incluyó un control negativo y se llevaron a cabo en un termociclador (T1 Termocycler, Biometra™). De los productos obtenidos de la PCR 2 µl se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa horizontal al 1.0% teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). Los 23.0 µl del volumen restante se incubaron para su digestión con la enzima de restricción *Hae III*, bajo las siguientes condiciones: se mezclaron los 23 µl del producto de PCR, 4 unidades de endonucleasa *Hae III* (New England Biolabs™), 5 µl de 1x NEB Buffer 2® a un pH de 7.9 y agua para llegar a un volumen final de 50 µl y se incubaron 16 horas a 37 °C. Los productos de digestión se analizaron por electroforesis en gel horizontal de agarosa al 4% a 60 Volts durante 6 horas y se revelaron con bromuro de etidio para visualizarlo en un analizador de imágenes. Con estos mismos oligonucleotidos usando una combinación de PCR y subsiguiente secuenciación se determinó la presencia de la mutación en los parientes cercanos de la familia del paciente LGM2B.

RESULTADOS

Pacientes estudiados

En este trabajo se reunieron los datos clínicos de 77 pacientes con diagnóstico sugerente de distrofia muscular. Con un intervalo de edades de 12 días a 53 años, de ellos 31 pertenecen a pacientes femeninos y 46 a masculinos, 38 corresponden a edad infantil (0-11 años), 4 son adolescentes (12-17 años) y 27 adultos (18 o más años); sin embargo, en 8 de los 77 pacientes no fue posible integrar este dato por tener una historia clínica incompleta (Tabla 6).

En ocho de los pacientes existen antecedentes familiares de la enfermedad. En dos pacientes sus progenitores son consanguíneos. En 47 pacientes los síntomas iniciales aparecieron en la infancia específicamente en 9 de ellos al nacer (siete con hipotonía, uno con amovilidad y uno con ptosis); en 5 pacientes la primera manifestación se presentó en la adolescencia y 9 pacientes más iniciaron manifestaciones clínicas de la enfermedad durante la etapa adulta. En 16 de los pacientes estudiados no se pudo consignar este aspecto de la historia clínica.

En todos los pacientes se tomaron biopsias de músculo deltoides o cuádriceps para analizar el patrón de expresión de las proteínas caveolina-3, laminina $\alpha 2$, teletonina, emerina, lámina A y lámina C. Las 77 biopsias, en un estudio realizado paralelamente a éste, se sometieron a un análisis por inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para las proteínas distrofina, $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ SGs y disferlina. De las 77 biopsias 45 (58.4%) mostraron una deficiencia primaria de alguna de estas proteínas y 32 (un 41%) exhibieron un patrón de expresión normal con estos anticuerpos. Las biopsias también se sometieron a tinción con hematoxilina y eosina para distinguir algunas de sus características a nivel celular.

De los nueve pacientes con inicio de síntomas al nacer, en cuatro nos reportaron la deficiencia de al menos una proteína del DGC, los 5 restantes mostraron un patrón de expresión normal para las proteínas del DGC y de este trabajo.

Cuatro de los pacientes presentaron anormalidades cardíacas sin especificarse el tipo, un paciente masculino de 16 años con deficiencia de distrofina; un paciente masculino de 45 años con deficiencia en disferlina; y dos más, uno femenino de 23 años y uno masculino de 35 años, quienes mostraron una expresión normal de todas las proteínas. Este penúltimo paciente (55 en tabla 6), presenta un cuadro clínico característico de distrofia tipo Emery-Dreifuss (contracturas tempranas, debilidad humeroperoneal y afección del tendón de Aquiles), no tiene antecedentes de historia familiar, y manifestó los primeros síntomas a los tres años de edad.

Con respecto a los niveles séricos de CPK, en 25 pacientes estuvieron elevados. En 22 pacientes el estudio de electromiografía reveló un patrón miopático y en todas las muestras se encontraron anormalidades histológicas sugerentes de un proceso distrófico en las fibras musculares.

De las 45 muestras con una deficiencia primaria de alguna de las proteínas: distrofina, α , β , γ , δ SGs y disferlina, en ninguna de ellas se detectó deficiencia de caveolina-3, laminina $\alpha 2$, teletonina, emerina, lámina A o lámina C, al analizarse por inmunofluorescencia (Tabla 7).

Tabla 6. Manifestaciones clínicas de los pacientes con distrofia muscular.

Np	Edad	Sexo	AHF	CS	Inicio	1er Síntoma	Progresión	AC	CPK U/L	EMG	DHD
1	33 años	m	Nd	-	20 años	debilidad en piernas	lenta	-	1521	nd	+
2	4 años	m	Nd	nd	en la infancia	nd	nd	nd	nd	nd	+
3	6 años	m	-	-	en la infancia	nd	nd	nd	nd	nd	+
4	5 años	m	Nd	nd	en la infancia	nd	nd	nd	nd	nd	+
5	3 años	m	-	-	1 año	debilidad pélvica	lenta	nd	709	-	+
6	9 años	m	-	-	2 años	debilidad muscular	lenta	nd	25270	+	+
7	11 años	m	-	-	5 años	debilidad muscular	lenta	-	40021	+	+
8	7 años	m	-	-	5 años	caídas frecuentes	lenta	nd	979	+	+
9	6 años	m	nd	nd	en la infancia	nd	nd	nd	nd	nd	+
10	9 años	m	-	-	6 años	caídas frecuentes	lenta	nd	nd	nd	+
11	17 años	m	-	-	9 años	debilidad en piernas	lenta	nd	22166	+	+
12	11 años	m	-	-	2 años	debilidad en piernas	lenta	-	8270	+	+
13	Nd	m	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+
14	7 años	m	-	-	2 años	caídas frecuentes	lenta	nd	15210	+	+
15	11 años	m	-	-	4 años	caídas frecuentes	lenta	nd	11808	nd	+
16	11 años	m	-	-	8 años	caídas frecuentes	lenta	nd	nd	nd	+
17	16 años	m	-	-	6 años	pie plano	lenta	+	8110	+	+
18	7 años	m	-	-	2 años	Fatiga de extremidades inferiores	lenta	-	7000	+	+
19	38 años	m	nd	-	28 años	calambres con actividad	lenta	-	402	nd	+
20	41	m	+	-	14 años	caídas frecuentes	lenta	+	903	+	+
21	4 meses	m	nd	nd	al nacer	hipotonía	rápida	nd	nd	nd	+
22	2 años	m	+	-	al nacer	hipotonía	lenta	-	8432	+	+
23	50 años	m	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+
24	Nd	f	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+
25	8 años	m	nd	nd	en la infancia	nd	nd	nd	nd	nd	+
26	10 años	m	-	-	1 año	debilidad muscular	lenta	-	640	+	+
27	Nd	m	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+
28	9 años	f	-	-	4 años	debilidad en piernas	lenta	nd	1314	+	+
29	9 años	f	+	-	2 años	caídas frecuentes	lenta	nd	284	nd	+
30	53 años	f	-	-	12 años	caídas, debilidad general	lenta	-	121	+	+
31	22 años	m	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+
32	43 años	f	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+
33	Nd	f	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+
34	2 años	m	nd	nd	en la infancia	nd	nd	nd	nd	nd	+
35	4 meses	f	-	-	al nacer	hipotonía	nd	nd	nd	nd	+
36	22 días	f	nd	nd	al nacer	Nd	nd	nd	nd	nd	+
37	3 años	f	-	-	al nacer	Ptosis	nd	nd	nd	nd	+
38	17 años	f	-	-	9 años	debilidad proximal	rápida	nd	nd	nd	+
39	8 años	f	nd	nd	en la infancia	nd	nd	nd	nd	nd	+
40	27 años	f	+	-	6 años	marcha de puntas	lenta	nd	1035	+	+
41	20 años	f	+	+	en la infancia	caídas frecuentes	lenta	-	700	+	+
42	25	f	-	-	16 años	caídas frecuentes	lenta	-	nd	+	+
43	23 años	f	-	+	19 años	debilidad en piernas	lenta	nd	6162	+	+
44	45 años	m	-	-	36 años	debilidad en piernas	lenta	+	normal	+	+
45	33 años	m	-	-	31 años	debilidad axial	lenta	-	14000	+	+
46	9 años	m	-	-	5 meses	debilidad muscular	lenta	-	800	Nd	+
47	25 años	m	+	-	19 años	debilidad en piernas	lenta	-	24825	+	+
48	33 años	m	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	Nd	+
49	29 años	m	-	-	16 años	debilidad muscular	lenta	nd	normal	+	+
50	4 años	m	-	-	2 años	debilidad en piernas	lenta	nd	369	+	+
51	12 días	f	-	-	al nacer	hipotonía	rápida	-	alta	-	+
52	nd	m	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Nd	+
53	6 años	m	nd	nd	en la infancia	nd	nd	nd	nd	Nd	+
54	29 años	f	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	Nd	+
55	23 años	f	-	-	3 años	debilidad proximal	lenta	+	493	+	+
56	7 años	m	-	-	1 año	debilidad en piernas	lenta	nd	nd	+	+
57	3 años	m	+	-	2 años	nd	nd	nd	nd	Nd	+
58	6 años	f	-	-	al nacer	amovilidad	nd	nd	nd	+	+
59	9 años	f	-	-	6 meses	debilidad en piernas	rápida	nd	2818	+	+
60	52 años	m	-	-	51 años	debilidad general	rápida	nd	nd	Nd	+
61	nd	f	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Nd	+
62	18 años	m	-	-	4 años	camina de puntas	nd	nd	333	Nd	+
63	23 años	f	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	Nd	+
64	25 años	m	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Nd	+
65	18 años	f	-	-	10 años	dolor en cadera	lenta	-	normal	+	+
66	49 años	f	-	-	42 años	dolor plantar	lenta	nd	1783	+	+
67	nd	f	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+
68	26	f	-	-	6 años	caídas frecuentes	lenta	+	715	+	+
69	2 años	f	-	-	3 meses	detención de desarrollo motor	rápida	nd	nd	nd	+
70	nd	m	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+
71	2 años	m	-	-	al nacer	hipotonía	rápida	nd	alta	+	+
72	35 años	m	-	-	20 años	debilidad muscular	lenta	+	5000	nd	+
73	10 meses	f	-	-	al nacer	hipotonía	rápida	nd	nd	+	+
74	9 años	m	-	-	5 años	debilidad proximal de extremidades inferiores	lenta	-	20000	+	+
75	14 años	f	-	-	12 años	marcha lenta	rápida	nd	9899	+	+
76	28 años	f	+	-	nd	-	-	-	nd	nd	+
77	6 meses	f	-	-	al nacer	hipotonía	rápida	nd	normal	nd	+

NP: número de paciente; AHF: antecedente de historia familiar; CS: consanguinidad; AC: afección cardíaca; CPK: fosfocreatinquinasa; EMG: electromiografía con patrón miopático; DHD: datos histopatológicos compatibles con proceso distrófico en las fibras musculares; m: masculino; f: femenino; -: negativo; +: positivo; nd: no determinado.

Tabla 7. Resultados de inmunofluorescencias en pacientes con una deficiencia primaria de alguna de las proteínas: distrofina, α , β , γ , δ SGs y disferlina.

NP	DYS2	DYS3	α	β	γ	δ	DC	DN	C-3	L- α 2	T	E	L-A	L-C
1	+	-	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+/-	-	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+
5	+	+/-	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+
6	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	-	-	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+
8	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+
9	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+
10	-		+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+/-	+/-	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+/-	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+
13	+/-		+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+
14	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	-	-	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+
16	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+
19	-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	-	-	+	+	+	+	+	+
20	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+
21	+/-	+/-	+	+/-	-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+
22	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	+/-	+/-	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	+/-	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26	-	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+
27	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+
28	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+
29	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+
31	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32	+	+	+/-	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+
33	+	+	+/-	+/-	+/-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
34	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35	+	+	+/-	+	+/-	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+
36	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+
37	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
38	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
39	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
41	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
42	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
43	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+
44	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+
45	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+

NP: número paciente; DYS2: distrofina extremo amino terminal; DYS3: distrofina extremo carboxilo terminal; α : α -SG; β : β -SG; γ : γ -SG; δ : δ -SG; DC: disferlina extremo carboxilo terminal; DN: disferlina extremo amino terminal; C-3: caveolina-3; L- α 2: laminina α 2; T: teletonina; E: emerina; L-A: lámina A; L-C: lámina C; +: normal; -: ausente; +/-: disminuida.

En el análisis de las 32 muestras con un patrón de expresión normal para distrofina, α , β , γ , δ SGs y disferlina, se detectó un paciente con deficiencia de laminina $\alpha 2$, la paciente corresponde al número 59 y a continuación se describe.

Se trata de un paciente del sexo femenino de 9 años de edad, sin antecedentes familiares (Figura 3). A los seis meses de edad inició con debilidad de las extremidades inferiores, actualmente muestra dificultad para subir escaleras, dificultad para levantar los brazos y debilidad de cinturas escapular, pélvica y tibial anterior. La afección ha sido de progresión lenta. Hasta la fecha están pendientes estudios para descartar cardiomiopatías y estudios de imagen de resonancia magnética para saber si hay alteraciones en el sistema nervioso central, ya que hipodensidad de materia blanca es característico de MDC1A (Jones *et al*, 2001). Aparentemente no muestra retraso mental porque su aprovechamiento escolar es bueno, sus niveles de CPK son altos (2818 U/L), los resultados de electromiografía son compatibles con un patrón miopático. Los datos obtenidos de los hallazgos histopatológicos revelan tejido muscular extensamente infiltrado por tejido adiposo, con pequeños grupos de fibras atróficas en las que se observa centralización nuclear. Mediante el estudio de inmunofluorescencia se identificó una disminución en la expresión de laminina $\alpha 2$ (Figura 4).

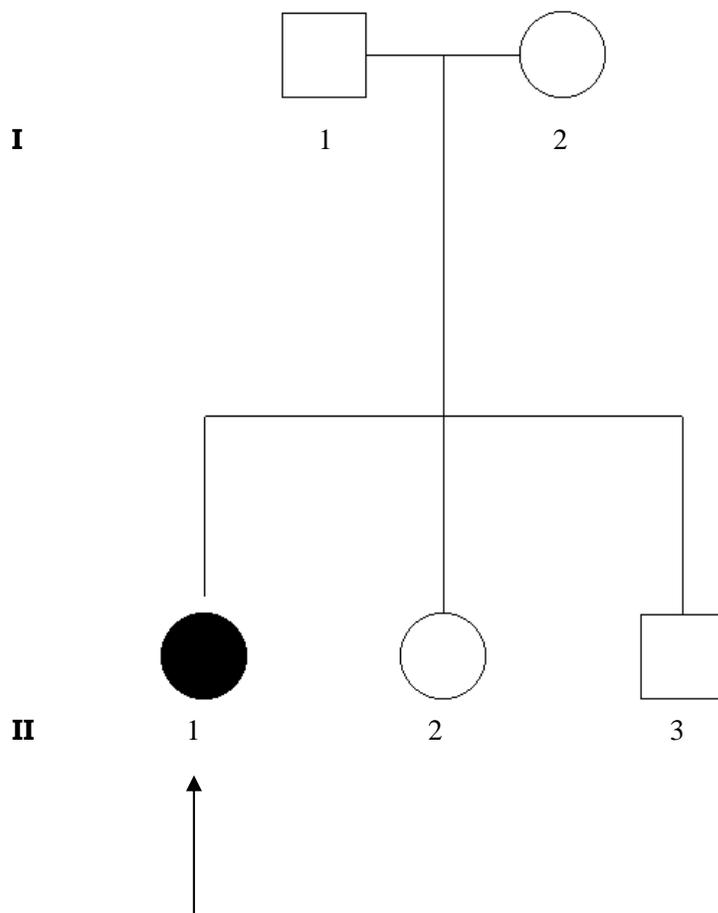


Figura 3. Árbol genealógico del paciente 59 (indicada con la flecha). Se trata de un paciente femenino de 9 años de edad, tiene una hermana de 11 años y un hermano de 15 años, la madre tiene 34 y el padre 38 años de edad. Los cuadros indican hombres; los círculos indican mujeres; el miembro de la familia que tiene sombreado todo su espacio es el paciente analizado, deficiente para α 2-laminina.

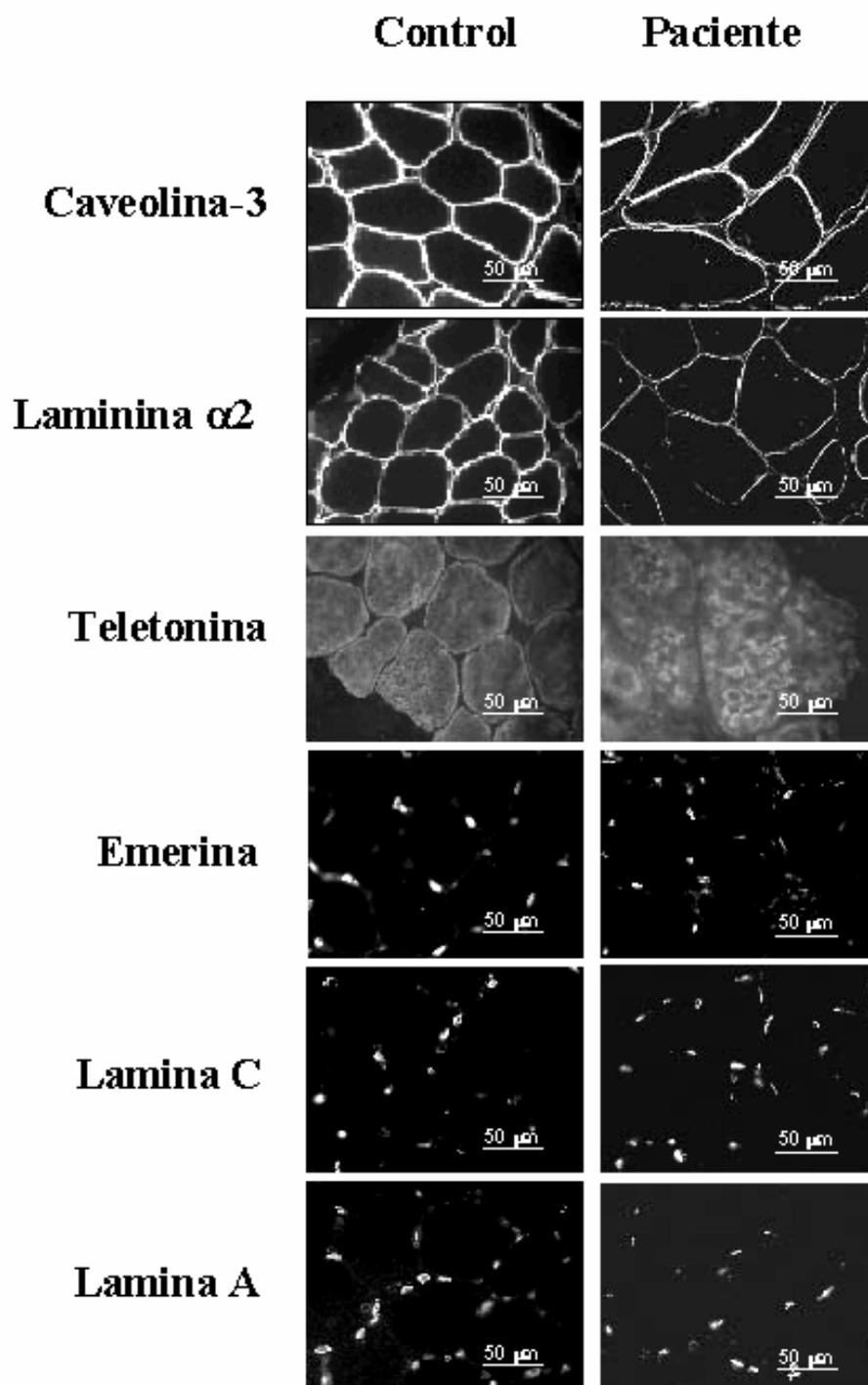


Figura 4. Imagen de inmunofluorescencia indirecta del paciente 59. Se observa disminución en la tinción para laminina $\alpha 2$, con tinción normal para caveolina-3, teletonina, emerina, lámina C y Lámina A.

Mutaciones en el gen de disferlina en pacientes con LGMD2B

La tabla 8 resume los datos clínicos de tres pacientes con deficiencia de disferlina considerados para realizar una búsqueda de la mutación en el gen DYSF, se trata de un paciente masculino de 33 años, y dos femeninos de 22 y 21 años respectivamente, son de familias no relacionadas, originarios de diferentes partes del país de poblaciones con pocos habitantes (por lo que se sospecha de endogamia en sus progenitores). Presentan debilidad muscular axial, con predominio en cintura pélvica, pantorrillas, piernas y bíceps, además de un evidente aumento de volumen en pantorrillas, los niveles de CPK son altos y los tres tienen imposibilidad a la marcha sobre las puntas de los pies, ninguno muestra evidencia de afección cardiorrespiratoria y los resultados de la EMG fueron consistentes con un típico patrón visto en enfermedades miopáticas. En cuanto al análisis histopatológico, reporta abundantes fibras en necrosis y regeneración. Todos exhibieron un fenotipo LGMD2B y los dos pacientes femeninos tienen antecedentes de historia familiar, con síntomas similares.

Tabla 8. Características clínicas de pacientes con LGMD2B.

NP	Sexo	Edad	Edad de inicio	CPK U/L	Consaguinidad	Lugar de origen	Familia afectada	Síntomas
1	m	33 años	32 años	14000	Ninguna (de una población de 200 Ha)	Oaxaca	No	Debilidad muscular axial predominantemente cintura pélvica, en pantorrillas, piernas y bíceps. Pantorrillas con aumento de volumen.
2	f	22 años	9 años	1358	Ninguna (de una población de 400 Ha)	Hidalgo	1 hermana	
3	f	21 años	18 años	12310	Ninguna (de una población de 400 Ha)	Guanajuato	2 hermanas y 1 prima	

NP: número de paciente; m: masculino; f: femenino; Ha: habitantes; CPK: fosfocreatinquinasa.

Usando una combinación de RT-PCR, los 55 exones del gen DYSF fueron amplificados y tras purificar los productos éstos fueron secuenciados mediante secuenciación automatizada en ambos sentidos de la cadena de cDNA. En los tres pacientes se encontraron cambios en la secuencia (Tabla 9), algunos reportados como polimorfismos que no afectan el aminoácido codificado. En uno de los pacientes se encontró un cambio homocigoto de una base guanina por una adenina en la posición 4253, en el exón 39, esta mutación produce el cambio de un aminoácido (el 1418 del gen DYSF) de glicina por uno de ácido aspártico (Figura 5).

Tabla 9. Cambios encontrados en la secuencia del gen DYSF en los pacientes analizados.

Exón	Cambio	Tipo de cambio	Pacientes que lo presentan	Frecuencia (%) reportada en la bibliografía	Enfermedad reportada para este cambio	Referencia
5	393 C>T CCC>CCU Pro	heterocigoto	1 y 2	13.75	normal	Kawabe <i>et al</i> , 2004
13	1185 C>A GAC>GAA Asp 395 Glu	heterocigoto	2	-	normal	no reportado
20	1827 T>C GAT>GAC Asp	heterocigoto	2	25	normal	Takahashi <i>et al</i> , 2003
25	2583 T>A TCT>TCA Ser	heterocigoto	1, 2 y 3	70	normal	Takahashi <i>et al</i> , 2003
38	4008 C>A ATC>ATA Ile	heterocigoto	2 y 3	45	normal	Cagliani <i>et al</i> , 2003
38	4068 C>T AGC>AGT Ser	homocigoto	1	3	normal	Takahashi <i>et al</i> , 2003
39	4253 G>A GGC>GAC Gly 1418 Asp	homocigoto	3	-	LGMD2B	no reportado

Pro: prolina, Asp: ácido aspártico, Glu: ácido glutámico, Ser: serina, Ile: isoleucina, Gly: glicina.

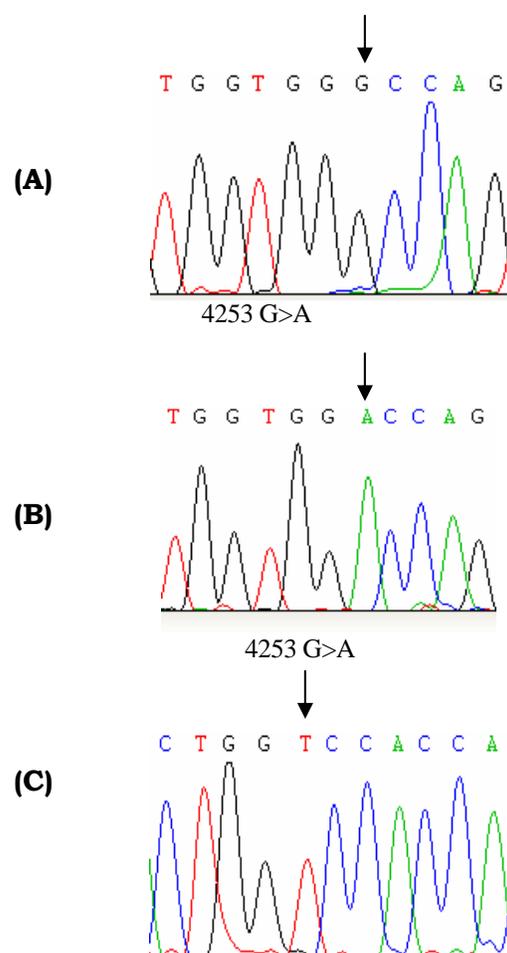


Figura 5. Secuencia que muestra la mutación 4253 G>A en el gen DYSF. La secuenciación del exón 39 con el par numero 15 de los oligonucleotidos diseñados para este fin muestra: (A) secuencia consenso del gen DYSF (NM 003494) (B) y (C) secuencias en ambos sentidos de la cadena de cDNA del paciente 3 mostrando el cambio homocigoto (indicado por la flecha).

La mutación identificada en el paciente que da origen al cambio de un aminoácido, fue confirmada por secuenciación directa de DNA genómico obtenido de la muestra de sangre periférica. Además se analizaron 100 cromosomas normales (50 masculinos y 50 femeninos) no relacionados para determinar mediante ensayos de polimorfismos de

longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) que el cambio no era un polimorfismo. Para tal fin en base a la secuencia del exón 39 de DYSF, se diseñaron un par de oligonucleótidos que nos permitieran amplificar un fragmento de DNA susceptible de analizar por RFLPs con un patrón de bandeo donde se pudiera apreciar a los portadores del cambio buscado en la población abierta, con el empleo del programa NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) se determinó a la enzima *Hae III* (secuencia de unión GGCC) cuyo punto de corte es entre un par de guaninas y un par de citocinas, como la indicada para dicho análisis (Figura 6). Los oligonucleótidos diseñados fueron los siguientes: 5' TCACCGTCAAGGTCATCGA 3' el sentido y 5' GGGTCACACAGGAAGCTCT 3' el antisentido, el producto de PCR es un fragmento de 94 pb. En la figura 7 se muestra un ejemplo de el patrón de bandeo obtenido a partir de la restricción enzimática con *Hae III* en un gel de agarosa al 4%.

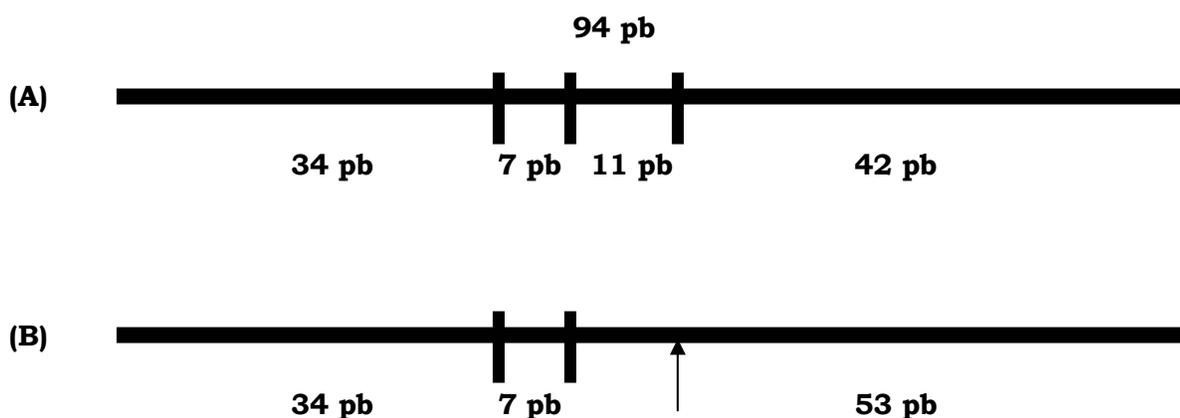


Figura 6. Esquema donde se representan los puntos de corte de *Hae III* en el fragmento de 94 pb producto de la PCR con los oligonucleótidos diseñados en base a la secuencia del exón 39 de DYSF. (A) cuando no existe un cambio en la secuencia con respecto al consenso, se generan 4 bandas después de la restricción con *Hae III* (producto de tres cortes), (B) cuando existe el cambio 4253 G>A se generan 3 bandas tras la restricción, ya que *Hae III* deja de tener un punto de unión para corte (indicado por la flecha). En el caso de presentarse un cambio de manera heterocigota, apreciaríamos una combinación de los dos patrones.

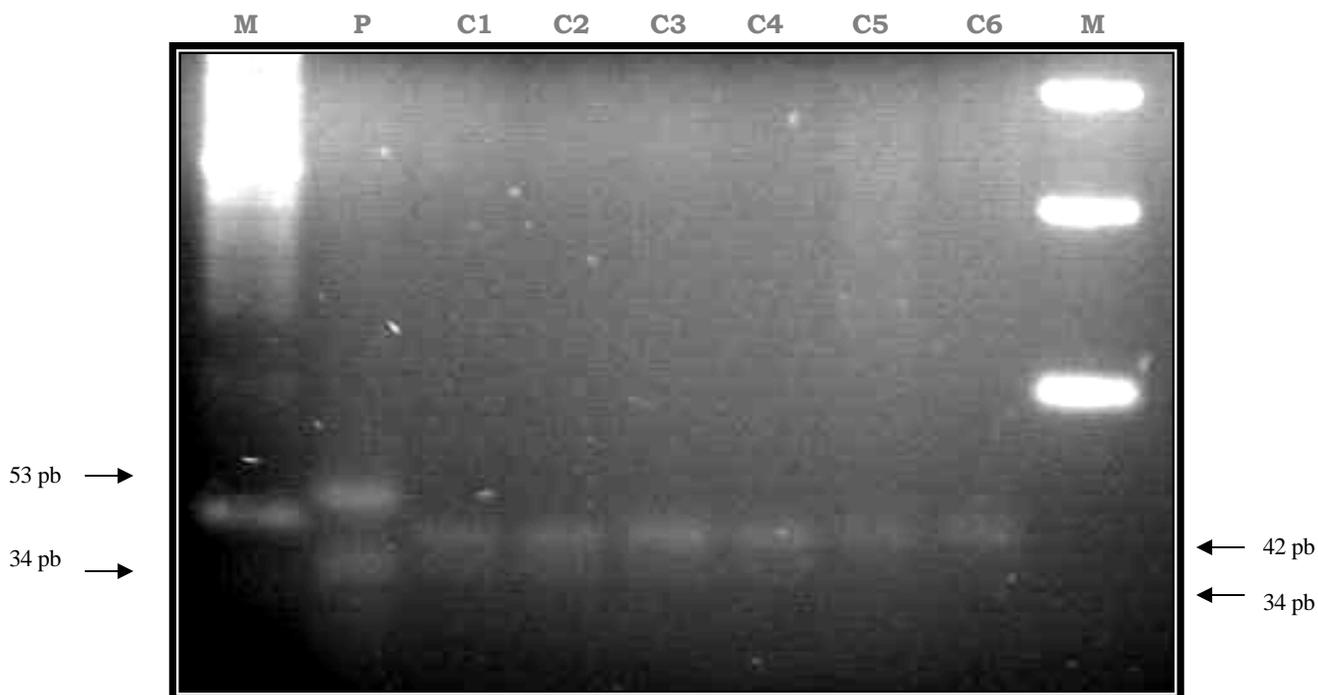


Figura 7. Electroforesis representativa de productos de PCR digeridos con *Hae III* en gel de agarosa al 4%. M: marcador de peso molecular (Promega, 50 pb y 100pb); P: paciente con mutación; se aprecian las dos bandas superiores del patrón (de 53 pb y 34 pb); C1-6: controles sin cambio donde se aprecian las dos bandas superiores del patrón (42 pb y 34 pb).

Una vez que se comprobó que el cambio 4253 G>A encontrado en el paciente no se trataba de un polimorfismo, utilizando los oligonucleotidos diseñados para el análisis de restricción, a partir de DNA obtenido de sangre periférica, de algunos familiares del paciente, se amplificó y secuenció en ambos sentidos para determinar quien presentaba la mutación. Como se muestra en el pedigree (Figura 8) tres miembros de la familia (III-3, III-4, III-10) son homocigotos para la mutación; seis integrantes (I-1, I-3, II-5, II-12, II-13, II-

19) son heterocigotos para la mutación; y tres miembros analizados (III-7, IV-1,IV-5) no presentan el cambio en ninguno de sus alelos. En los demás integrantes de la familia no se pudo realizar el estudio debido a que la mayoría de ellos radican en Estados Unidos de Norteamérica. Sin embargo, sabemos que el miembro II-14 presenta síntomas similares a III-3,III-4 y III-10.

En cuanto se tuvieron los resultados de la segregación de la mutación, a los miembros de la familia se les entregó el resultado y se les proporcionó asesoramiento genético.

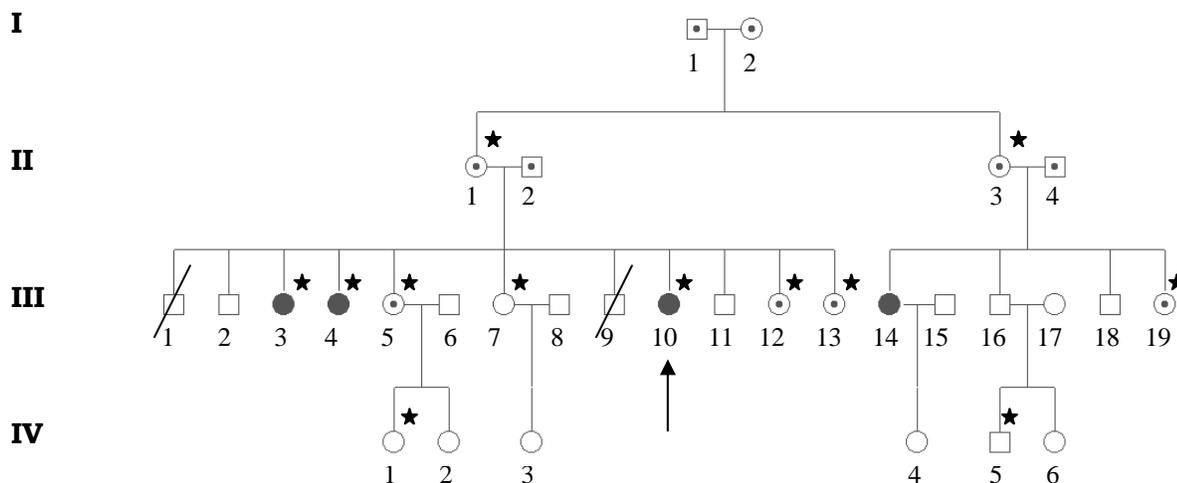


Figura 8. Pedigree de la familia del paciente con LGMD2B (indicado con una flecha). Los cuadros indican hombres; los círculos indican mujeres; los miembros que tienen marcada una línea horizontal han fallecido; los que tienen un punto en el centro de su espacio son heterocigotos para la mutación (453 G>A); los que tienen sombreado todo su espacio son homocigotos para la alteración; la estrella en la parte superior derecha indica los miembros de la familia en los que se pudo realizar el estudio; II-14 presenta síntomas similares a los miembros homocigotos para el cambio.

DISCUSIÓN

Las distrofias musculares representan un grupo de desordenes que se caracterizan principalmente por la pérdida progresiva de músculo esquelético (Maidment y Ellis, 2002). Son enfermedades que resultan de defectos genéticos en componentes de la membrana del músculo, de la matriz extracelular, de la sarcomera, del citosol, del núcleo y de la vía de glicosilación, ascendiendo a más de 30 los genes que han sido mapeados que se relacionan con estos padecimientos y de los cuales en la mayoría de los casos se ha identificado su producto (Vainzof y Zatz, 2003). Su curso clínico es altamente variable oscilando de severo en algunas formas congénitas con rápida progresión, a formas leves con inicio tardío y curso lento (Guglieri *et al*, 2005).

El diagnóstico de las distrofias musculares es complicado debido a que los signos y síntomas se sobreponen y en ocasiones son muy similares entre las diferentes distrofias. Actualmente es factible identificar a algunas de las proteínas defectuosas mediante pruebas de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos, lo que determina la posibilidad de establecer un diagnóstico más certero en estos pacientes. En nuestro país se han realizado estudios con un número limitado de anticuerpos, por esta razón en el presente trabajo se buscó determinar si los pacientes mexicanos con distrofia muscular exhibían deficiencia para alguna de las proteínas caveolina-3, laminina $\alpha 2$, teletonina, emerina, lámina A y lámina C.

De los pacientes analizados 1 de 77 (1.29%) mostró deficiencia de laminina $\alpha 2$. Jones *et al* (2001) en un análisis de pacientes australianos con distrofia muscular detectaron en 5 de 131 (4%) deficiencia de laminina $\alpha 2$, de los cuales uno mostró deficiencia secundaria de distrofina y α -SG, esto apoya el hecho de que por la sobreposición de síntomas entre las

diferentes distrofias, es aconsejable realizar análisis inmunohistoquímico lo más completo posible.

Debido a que son seis las distrofias musculares que pueden tener deficiencia de laminina $\alpha 2$, por un análisis en base al cuadro clínico del paciente identificado con deficiencia en esta proteína, cinco de estas enfermedades se descartaron. MDC1C y MEB debido a que en estos padecimientos están involucrados los músculos faciales, los cuales el paciente no tiene afectados. FMDC es descartada porque está asociada a retardo mental severo, MDC1B sólo ha sido reportada en una familia de Emiratos Árabes Unidos con espina rígida y serios problemas diafragmáticos involucrados (Brockington *et al*, 2000), por lo que también es descartada, así sólo nos quedan LGMD2I y MDC1A. De este paciente de género femenino, con buen aprovechamiento escolar, no se tienen resultados de una resonancia magnética, donde podríamos saber si presenta hipodensidad de materia blanca, característica distintiva de la MDC1A, pero no presente en todos los casos, tampoco contamos con estudios que nos permitan descartar cardiomiopatías las cuales son frecuentes en una distrofia que refiere una deficiencia primaria de la proteína relacionada con la fukutina (LGMD2I) y una deficiencia secundaria de laminina $\alpha 2$ (Walter *et al*, 2004). El fenotipo de este paciente es parecido a LGMD, con marcha independiente, fenotipo que muestra el 12% de los casos de MDC1A, de los cuales 3-35% presentan implicaciones cardiacas (Jones *et al*, 2001), por lo que los síntomas de LGMD2I y MDC1A se sobreponen. Con los datos clínicos que contamos y basándonos en que la edad promedio en que presentan el primer síntoma en LGMD2I es a los 10 años y que característicamente los pacientes de esta distrofia tienen pantorrillas hipertróficas, el paciente que analizamos no las presenta y tuvo los primeros síntomas a los seis meses de edad, algo característico en MDC, lo cual sugiere fuertemente que es un paciente con fenotipo MDC1A no clásico o “poco severo” (Jones *et al*, 2001).

Debido a que el gen LAMA2 que codifica laminina $\alpha 2$ es de considerable tamaño (65 exones en 9369 pb), a las complicaciones técnicas propias de la metodología de búsqueda de mutaciones y a que en fenotipos MDC1A no clásicos en los que se ha buscado la mutación solo en el 8% se ha encontrado (Jones *et al*, 2001), esto probablemente a que la mutación esté localizada en una región inexplorada no codificante en el gen LAMA2 o en otro gen conocido o no que interfiere con laminina $\alpha 2$, se decidió no buscar la mutación en el gen LAMA2 de éste caso.

Al paciente se le puede ofrecer una integración y análisis de los estudios paraclínicos ya mencionados una vez se cuente con ellos, además de posteriores estudios inmunohistoquímicos con mas anticuerpos relacionados con distrofias musculares.

De los demás pacientes, en cinco de ellos los síntomas iniciaron al nacimiento por lo que existen muchas probabilidades de que padezcan algún tipo de MDC, pero aun cuando los pacientes con MDC1A que representan el 40% de MDC son los únicos en los que se asegura una deficiencia en laminina $\alpha 2$, existe la posibilidad de que padezcan alguna otra distrofia, congénita o no, para la que aun no se cuenta con anticuerpos comerciales.

Uno de los pacientes de género femenino incluidos en este estudio mostró las características clínicas de una distrofia tipo Emery-Dreifuss, sin embargo no se detectó ninguna deficiencia de emerina, lámina A o lámina C. Manilal *et al* (1998) han reportado más de 20 casos similares en los que incluso no encuentran mutación en los genes que codifican estas proteínas relacionadas a EDMD. Ellos han propuesto que mutaciones en genes con alta homología con emerina (TMPO y LAMB1) pueden ser causantes de estos fenotipos.

En este estudio de 32 pacientes con un patrón de expresión normal para distrofina, $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ SGs y disferlina, al realizar el análisis de caveolina-3, laminina $\alpha 2$, teletonina, emerina,

lámina A y lámina C, 31 mostraron una expresión normal para todas las proteínas, por lo cual de 77 muestras iniciales 31 permanecen sin diagnóstico certero, es decir un 40.25%. Muy similar a lo que reportaron Vainzof *et al* (2001) en un estudio donde analizaron la expresión de teletonina, calpaina-3, disferlina, α, β, γ y δ SGs en 176 pacientes con diagnóstico clínico de LGMD (y positivos para distrofina), 94 de los pacientes mostraron una expresión normal de estas proteínas, es decir un 53.4% de las muestras analizadas, lo que nos revela un porcentaje alto de pacientes con distrofia muscular sin diagnóstico certero.

Estos resultados nos indican que la frecuencia relativa de ciertas distrofias musculares es tan baja en nuestro país que para ser registrada se necesita una muestra de pacientes más grande. Además, debemos seguir integrando metodologías diagnósticas para detectar deficiencia de la mayor cantidad de proteínas relacionadas a distrofias musculares en pacientes con estas enfermedades.

Por otra parte, debido a que últimamente se ha encontrado relación entre diferentes proteínas relacionadas a distrofia muscular que no forman entre sí algún complejo (por ejemplo la disminución de la expresión de calpaina-3, distrofina y γ SG en algunas MDC) (Ferreira *et al*, 2005), en este estudio también se buscó determinar si los pacientes con distrofia muscular, cuyo patrón de expresión deficiente en alguna de estas proteínas: distrofina, $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ SGs y disferlina, presentaban alteración en alguna de las proteínas: caveolina-3, laminina $\alpha 2$, teletonina, emerina, lámina A y lámina C. En todos los pacientes la expresión de las proteínas caveolina-3, laminina $\alpha 2$, teletonina, emerina, lámina A y lámina C, fue normal, sugiriendo que no existe una relación entre estas proteínas.

LGMD2B tiende a ser la distrofia mas frecuente en nuestro país después de DMD/BMD (reportes del laboratorio donde se realizó este trabajo) por lo que realizar una búsqueda de

mutaciones en el gen DYSF de estos pacientes, pese a las complicaciones técnicas debido al gran tamaño del gen (55 exones en 6538 pb) y a la ausencia de regiones comunes de mutación, es de gran interés para aumentar nuestra comprensión de los mecanismos asociados a variabilidad fenotípica.

El hecho de que sólo se haya encontrado la mutación relacionada a la enfermedad en uno de los tres pacientes analizados puede ser indicio de que para los dos restantes la mutación se localice en una región inexplorada no codificante como son las regiones intrónicas y promotoras del gen DYSF. Aoki *et al* (2001) han sugerido que posiblemente mutaciones en otro gen homólogo a DYSF (como mioferlina), podrían ser responsables de algunos fenotipos de LGMD2B y MM.

La importancia, trascendencia e impacto de este estudio está determinado por muchos factores como las dificultades diagnósticas, la complejidad de los exámenes complementarios necesarios para establecerlo, la escasez de clínicos expertos en su manejo, por ser enfermedades discapacitantes y con un gran impacto personal, familiar y social, por el hecho de que algunas pueden limitar la esperanza de vida, por su carácter hereditario y en su caso, por las posibilidades de establecer un asesoramiento genético.

CONCLUSIONES

- I. En el presente trabajo se creó un banco de biopsias musculares de 77 pacientes con cuadro clínico compatible con distrofia muscular.
- II. La expresión de caveolina-3, laminina $\alpha 2$, teletonina, emerina, lámina A y lámina C en 45 muestras con un patrón de expresión deficiente para alguna de las proteínas: distrofina, $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ SGs y disferlina fue normal.
- III. En el análisis de 32 pacientes reportados con patrón de expresión normal para distrofina, $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ SGs y disferlina, se detectó un paciente con deficiencia de laminina $\alpha 2$, con un cuadro clínico de MDC1A no “clásico”.
- IV. En este estudio se presenta una nueva mutación en el exón 39 del gen DYSF que cambia la producción de un aminoácido (Gly 1418 Asp) en la proteína. En la familia de la paciente se identificó a los portadores.

ANEXOS

1. CUESTIONARIO GENERAL DE MIOPATIAS

INSTITUCIÓN _____
FECHA _____
REGISTRO _____

Nombre _____
Edad _____ Fecha de Nac. _____
Lugar de Origen _____
Lugar de Residencia _____
Dirección _____
Telefono _____
Origen de padres _____
Consanguinidad Si No
Historia Familiar Si No especificar _____
Desarrollo Psicomotor (normal) (anormal) Sostén cefálico _____
Edad de caminar _____
Edad de hablar _____
Desempeño Escolar (bueno) (regular) (malo) Evolución: _____
Edad de inicio de síntomas _____
Primer síntoma _____

Miembros inferiores (edad).- Dificultad para:
Subir escaleras _____
Levantarse de una silla _____
Levantarse de decúbito dorsal _____
Levantarse de cuclillas (Gowers) _____
Pararse de puntas _____

Caídas fáciles _____
Limitación del perímetro de la marcha _____

Miembros Superiores (edad).- dificultad para:
Levantarlos _____
Cargar pesos _____
Doblarlos (flexión) _____
Extenderlos (extensión) _____
Cerrar o abrir las manos _____
Abrir frascos de botellas _____

Debilidad de cuello no si, inicio _____
Visión Doble (diplopia) no si, inicio _____
Alteración de movimientos faciales no si, inicio _____
Dificultad para deglutir (disfagia) no si, inicio _____
Dificultad para hablar (disartria) no si, inicio _____
Falta de aire (diseña) no si, inicio _____

Pérdida de la masa muscular (atrofia)	no	si, inicio y localización_____
Dolor muscular (mialgias)	no	si, inicio y localización_____
Mioglobinuria (orina roja asociada o no a mialgias)	no	si, inicio/describir_____
Calambres	no	si, inicio/localización_____
Problema visual	no	si, inicio_____
Problema auditivo	no	si, inicio_____
Miotonia	no	si, inicio/especificar_____

EXPLORACIÓN.-

Debilidad (debilidad y grado)_____

Reflejos (normales) (anormales), especificar_____

Respuesta plantar (normal) (anormal), especificar_____

Sensibilidad (normal) (anormal), especificar_____

Movimientos oculares (normal) (anormal), especificar_____

Ptosis (no) (unilateral) (bilateral)

Afectaciones ortopédicas (no) (si), especificar_____

Otros hallazgos_____

EMG (no realizada) (normal) (miopática) (neuropática)

VCN (no realizadas) (normales) (anormales)

CPK (no realizada) (normal) (anormal)

Biopsia Muscular (no realizada) (normal) (anormal)

Fecha_____

Músculo_____

Institución_____

N° Biopsia_____

Tratamiento (no) (si), especificar_____

Rehabilitación (no) (si)_____

Primer servicio que atendió al paciente_____

Árbol Genealógico

1. **CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA TOMA DE BIOPSIA
DE MÚSCULO ESQUELÉTICO Y DE MUESTRA DE SANGRE PERIFERICA**

La distrofia muscular es una enfermedad que se caracteriza por debilidad muscular y tiene carácter progresivo.

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

Me han sido explicados claramente los objetivos del estudio, los cuales no representan ningún riesgo para la salud de mi hijo (a), ni para ninguno de los miembros de mi familia, por lo cual estoy dispuesto a autorizar la realización de la biopsia muscular, aceptando formar parte del proyecto de investigación: “Estudio Bioquímico Molecular de Proteínas no Asociadas a Distrofia en Pacientes con Distrofia Muscular”. La información de los resultados se hará a través del personal médico del servicio de la consulta externa de Genética Médica.

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

NOMBRE DEL PACIENTE: _____

NOMBRE DE LA MADRE: _____

NOMBRE DEL PADRE: _____

Firma de la persona legalmente responsable del paciente

ABREVIATURAS

A	Adenina
A	Antisentido
AC	Afección cardiaca
AD	Autosómica dominante
AD	Autosómica dominante
AHF	Antecedente de historia familiar
AR	Autosómica recesiva
Asp	Ácido aspártico
BMD	Distrofia muscular de Becker
C	Citosina
C-3	Caveolina-3
CaM II	Cinasa dependiente de calcio-calmodulina tipo II
CAPN3	Gen que codifica para la proteína calpaina-3
CAV3	Gen que codifica para la proteína caveolina-3
cDNA	DNA complementario
CMT2	Polineuropatía autosómica recesiva axonal
COL6A1	Gen que codifica para la proteína colágena 6 cadena α 1
COL6A2	Gen que codifica para la proteína colágena 6 cadena α 2
COL6A3	Gen que codifica para proteína la colágena VI cadena α 3
CPK	Fosfocreatinquinasa
CS	Consaguinidad
D.O. ₂₆₀	Densidad óptica a una longitud de onda de 260 nm
DAGI	Gen que codifica para las proteínas α -dístroglicano y β -dístroglicano
DAPI	4 ¹ ,6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorido
DC	Disferlina extremo carboxilo terminal
DCG	Complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina
DCM	Cardiomiopatía dilatada
DEPC	Dietilpirucarbonato
DG	Dístroglicano

DHD	Datos histopatológicos compatibles con proceso distrófico en las fibras musculares
DM	Miopatía distal
DMAT	Miopatía del compartimiento distal anterior
DMAT	Miopatía del compartimiento distal anterior
DMC	Cardiomiopatía dilatada
DMD	Distrofia muscular de Duchenne/Gen que codifica para la proteína distrofina
DN	Disferlina extremo amino terminal
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfatados
DTT	Dithiothreitol
DYS2	Distrofina extremo amino terminal
DYS3	Distrofina extremo carboxilo terminal
DYSF	Gen que codifica para la proteína disferlina
E	Emerina
EDMD	Distrofia muscular de Emery-Dreifuss
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMD	Gen que codifica para la proteína emerina
EMG	Electromiografía
f	Femenino
FKRP	Gen que codifica para la proteína relacionada con la fukutina
FMDC	Distrofia muscular congénita Fukuyama
FSHD1	Distrofia muscular fasioescapulohumeral
FUKUTINA	Gen que codifica para la proteína fukutina
G	Guanina
GCG	Trinucleótido que codifica para el aminoácido alanina
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
Grb2	Proteína adaptadora de transducción de señales
Ha	Habitantes
HCK	Hipercikemia
HCL	Ácido clorhídrico

HCM	Cardiomiopatía hipertrófica
Ile	Isoleucina
IQ	Coefficiente intelectual
ITGA7	Gen que codifica para la proteína integrina $\alpha 7$
kb	Kilobases
kpn1	Secuencia larga repetida de DNA genómico no codificante
L-A	Lámina A
LAMA2	Gen que codifica para la proteína $\alpha 2$ -laminina
LAMB1	Laminina B1
LARGE	Gen que codifica para una supuesta glicosiltransferasa
L-C	Lámina C
LGMD	Distrofia muscular de cintura
LMNA	Gen que codifica para las proteínas lámina A y lámina C
m	Masculino
M	Molar
MDC	Distrofia muscular congénita
MEB	Enfermedad músculo-ojo-cerebro
min	Minutos
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
ml	Mililitros
mM	Micromolar
MM	Miopatía de Miyoshi
M-MLV	Virus de la leucemia murina de Molones
MRI	Imagen de resonancia magnética
mRNA	RNA mensajero
MyoD	Gen que codifica para la proteína de diferenciación miogénica
NaCl	Cloruro de sodio
nd	No determinado
ng	Nanogramos
nm	Nanometros
nNOS	Sintasa neuronal del óxido nítrico
OPMD	Distrofia muscular oculofaríngea

p/v	Peso/volumen
PABP2	Gen que codifica para la proteína 2 de unión a poli (A)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PH	Potencial hidrógeno
pmol	Picomoles
POMPGnT1	Gen que codifica para la proteína O-manosa β1,2 N-acetilglucosaminiltransferasa
POMT1	Gen que codifica para la proteína O-manosiltransferasa 1
POMT2	Gen que codifica para la proteína O-manosiltransferasa 2
Pro	Prolina
RCLB	Solución amortiguadora de lisis de células rojas
RFLPs	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
RNA	Ácido ribonucleico
RNASas	RNA nucleasas
rpm	Revoluciones por minuto
RSMD1	Distrofia muscular-1 de espina rígida
RT	Transcripción reversa
RT-PCR	Transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa
S	Sentido
SDS	Dodecil sulfato de sodio
seg	Segundos
SEPN1	Gen que codifica para la proteína selenoproteína N1
Ser	Serina
SGCA	Gen que codifica para la proteína α -sarcoglicano
SGCB	Gen que codifica para la proteína β -sarcoglicano
SGCD	Gen que codifica para la proteína δ -sarcoglicano
SGCG	Gen que codifica para la proteína γ -sarcoglicano
SGs	Sarcoglicanos
SG-SSPN	Complejo sarcoglicano-sarcospan
SNC	Sistema nervioso central
SSPN	Proteína sarcospan

T	Timina
TBE	Tris, ácido bórico, EDTA
TCAP	Gen que codifica para la proteína teletonina
TMD	Distrofia muscular tibial
TMD	Distrofia muscular tibial
TMPO	Gen que codifica para la proteína timopoiatina
TRIM32	Gen que codifica para la proteína TRIM32
TRIS	(Hidroximetil)-aminometano
TRIZOL	Solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina
TTID	Gen que codifica para la proteína miotilina
TTN	Gen que codifica para la proteína titina
U/L	Unidades por litro
UMDC	Distrofia muscular congénita de Ullrich
UMDC	Distrofia muscular Ullrich
UV	Ultravioleta
WW	Síndrome Walker Warburg
X-	Ligada al cromosoma X
ZASP	Gen que codifica para la proteína ZASP
α -DG	Proteína α -dístroglicano
β -DG	Proteína β -dístroglicano
ϵ -SG	Proteína epsilon sarcoglicano
μ g	Microgramos
μ l	Microlitros
μ m	Micrómetros
ζ -SG	Proteína zeta sarcoglicano

5. BIBLIOGRAFÍA

- [Alcantara MA, Villarreal MT, Del Castillo V, Gutierrez G, Saldana Y, Maulen I, Lee R, Macias M, Orozco L](#). High frequency of de novo deletions in Mexican Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. Implications for genetic counseling. *Clin Genet*. 1999; 55(5):376-380.
- [Alvarez Leal M, Ortiz Mariscal JD, Narro Juarez A, Solis Alanis JG, Morales Aguilera A](#). Evaluation of the activity of creatine phosphokinase for the detection of carriers of Duchenne-type muscular dystrophy in families in the city of Monterrey, Mexico. *Rev Invest Clin*. 1990; 42(1):39-45.
- [Alvarez Leal M, Morales Aguilera A, Perez Zuno JA, Segura Romero S, Quiroz Gongora MC, Paredes Garcia A](#). [Relations between delayed diagnosis and forms of onset in Duchenne muscular dystrophy] *Gac Med Mex*. 1994; 130(6):459-464.
- [Anderson JT, Rogers RP, Jarrett HW](#) Ca²⁺-calmodulin binds to the carboxyl-terminal domain of dystrophin. *J Biol Chem*. 1996; 271(12):6605-6610.
- [Arenas D, Coral R, Cisneros B, Penaloza L, Salamanca F, Kofman S, Mercado R, Mendez J, Martinez C, Montanez C](#). Carrier detection in Duchenne and Becker muscular dystrophy using dinucleotide repeat polymorphisms. A study in Mexican families. *Arch Med Res*. 1996; 27(2):151-156.
- [Baker NL, Morgelin M, Peat R, Goemans N, North KN, Bateman JF, Lamande SR](#). Dominant collagen VI mutations are a common cause of Ullrich congenital muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*. 2005; 14(2):279-293.
- [Bansal D, Campbell KP](#). Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. *Trends Cell Biol*. 2004; 14(4):206-213.
- Barraza, G. 2001. Tesis Especialidad (Especialidad en Genética Medica). Estudio inmunohistoquímico de las proteínas del complejo distrofina glicoproteína en pacientes con distrofias musculares. UNAM, Fac. de Medicina. México D.F. 98 p.
- [Barresi R, Moore SA, Stolle CA, Mendell JR, Campbell KP](#). Expression of gamma - sarcoglycan in smooth muscle and its interaction with the smooth muscle sarcoglycan-sarcospan complex. *J Biol Chem*. 2000; 275(49):38554-38560.

-
- [Baumbach LL, Chamberlain JS, Ward PA, Farwell NJ, Caskey CT](#). Molecular and clinical correlations of deletions leading to Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Neurology*. 1989; 39(4):465-474.
 - [Beltran-Valero de Bernabe D, Voit T, Longman C, Steinbrecher A, Straub V, Yuva Y, Herrmann R, Sperner J, Korenke C, Diesen C, Dobyns WB, Brunner HG, van Bokhoven H, Brockington M, Muntoni F](#). Mutations in the FKRP gene can cause muscle-eye-brain disease and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet*. 2004; 41(5):e61.
 - [Betz RC, Schoser BG, Kasper D, Ricker K, Ramirez A, Stein V, Torbergesen T, Lee YA, Nothen MM, Wienker TF, Malin JP, Propping P, Reis A, Mortier W, Jentsch TJ, Vorgerd M, Kubisch C](#). Mutations in CAV3 cause mechanical hyperirritability of skeletal muscle in rippling muscle disease. *Nat Genet*. 2001; 28(3):218-219.
 - [Blake DJ, Kroger S](#). The neurobiology of duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle? *Trends Neurosci*. 2000; 23(3):92-99.
 - [Bonne G, Mercuri E, Muchir A, Urtizberea A, Becane HM, Recan D, Merlini L, Wehnert M, Boor R, Reuner U, Vorgerd M, Wicklein EM, Eymard B, Duboc D, Penisson-Besnier I, Cuisset JM, Ferrer X, Desguerre I, Lacombe D, Bushby K, Pollitt C, Toniolo D, Fardeau M, Schwartz K, Muntoni F](#). Clinical and molecular genetic spectrum of autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy due to mutations of the lamin A/C gene. *Ann Neurol*. 2000; 48(2):170-180.
 - [Bonne G](#). The laminopathy saga. *Rev Neurol*. 2003 ; 37(8):772-774.
 - [Brais B, Bouchard JP, Xie YG, Rochefort DL, Chretien N, Tome FM, Lafreniere RG, Rommens JM, Uyama E, Nohira O, Blumen S, Korczyn AD, Heutink P, Mathieu J, Duranceau A, Codere F, Fardeau M, Rouleau GA](#). Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nat Genet*. 1998; 18(2):164-167.
 - [Brennan JE, Chao DS, Xia H, Aldape K, Brecht DS](#). Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell*. 1995; 82(5):743-752.

-
- Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC, Brecht DS. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell*. 1996; 84(5):757-767.
 - Brockington M, Sewry CA, Herrmann R, Naom I, Dearlove A, Rhodes M, Topaloglu H, Dubowitz V, Voit T, Muntoni F. Assignment of a form of congenital muscular dystrophy with secondary merosin deficiency to chromosome 1q42. *Am J Hum Genet*. 2000; 66(2):428-435.
 - Brockington M, Blake DJ, Prandini P, Brown SC, Torelli S, Benson MA, Ponting CP, Estournet B, Romero NB, Mercuri E, Voit T, Sewry CA, Guicheney P, Muntoni F. Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) cause a form of congenital muscular dystrophy with secondary laminin alpha2 deficiency and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Am J Hum Genet*. 2001; 69(6):1198-1209.
 - Bushby KM, Thambyayah M, Gardner-Medwin D. Prevalence and incidence of Becker muscular dystrophy. *Lancet* 1991; 337(8748):1022-1024.
 - Bushby KM, Beckmann JS. The limb-girdle muscular dystrophies--proposal for a new nomenclature. *Neuromuscul Disord*. 1995; 5(4):337-343.
 - Bushby K. The limb-girdle muscular dystrophies. *Eur J Paediatr Neurol*. 2001; 5(5):213-214.
 - Cagliani R, Fortunato F, Giorda R, Rodolico C, Bonaglia MC, Sironi M, D'Angelo MG, Prella A, Locatelli F, Toscano A, Bresolin N, Comi GP. Molecular analysis of LGMD-2B and MM patients: identification of novel DYSF mutations and possible founder effect in the Italian population. *Neuromuscul Disord*. 2003; 13(10):788-795.
 - Caldwell CJ, Matthey DL, Weller RO. Role of the basement membrane in the regeneration of skeletal muscle. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1990; 16(3):225-238.
 - Camelo AL, Awad RA, Madraza A, Aguilar F. Esophageal motility disorders in Mexican patients with Duchenne's muscular dystrophy. *Acta Gastroenterol Latinoam*. 1997; 27(3):119-122.
 - Campbell KP. Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell*. 1995; 80(5):675-679.

-
- Carbone I, Bruno C, Sotgia F, Bado M, Broda P, Masetti E, Panella A, Zara F, Bricarelli FD, Cordone G, Lisanti MP, Minetti C. Mutation in the CAV3 gene causes partial caveolin-3 deficiency and hyperCKemia. *Neurology*. 2000; 54(6):1373-1376.
 - Chae J, Minami N, Jin Y, Nakagawa M, Murayama K, Igarashi F, Nonaka I. Calpain 3 gene mutations: genetic and clinico-pathologic findings in limb-girdle muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 2001; 11(6-7):547-555.
 - Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162(1):156-159.
 - Chrobakova T, Hermanova M, Kroupova I, Vondracek P, Marikova T, Mazanec R, Zamecnik J, Stanek J, Havlova M, Fajkusova L. Mutations in Czech LGMD2A patients revealed by analysis of calpain3 mRNA and their phenotypic outcome. *Neuromuscul Disord*. 2004; 14(10):659-665.
 - Coral-Vazquez R, Arenas D, Cisneros B, Penaloza L, Kofman S, Salamanca F, Montanez C. Analysis of dystrophin gene deletions in patients from the Mexican population with Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Arch Med Res*. 1993; 24(1):1-6.
 - Coral-Vazquez R, Arenas D, Cisneros B, Penaloza L, Salamanca F, Kofman S, Mercado R, Montanez C. Pattern of deletions of the dystrophin gene in Mexican Duchenne/Becker muscular dystrophy patients: the use of new designed primers for the analysis of the major deletion "hot spot" region. *Am J Med Genet*. 1997; 70(3):240-246.
 - Coral-Vazquez R, Cohn RD, Moore SA, Hill JA, Weiss RM, Davisson RL, Straub V, Barresi R, Bansal D, Hrstka RF, Williamson R, Campbell KP. Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle: a novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy. *Cell*. 1999; 98(4):465-474.
 - Coral-Vazquez RM, Rosas-Vargas H, Meza-Espinosa P, Mendoza I, Huicochea JC, Ramon G, Salamanca F. Severe congenital muscular dystrophy in a Mexican family with a new nonsense mutation (R2578X) in the laminin alpha-2 gene. *J Hum Genet*. 2003; 48(2):91-95.

-
- [Cormand B, Pihko H, Bayes M, Valanne L, Santavuori P, Talim B, Gershoni-Baruch R, Ahmad A, van Bokhoven H, Brunner HG, Voit T, Topaloglu H, Dobyns WB, Lehesjoki AE.](#) Clinical and genetic distinction between Walker-Warburg syndrome and muscle-eye-brain disease. *Neurology*. 2001; 56(8):1059-1069.
 - [Crosbie RH, Heighway J, Venzke DP, Lee JC, Campbell KP.](#) Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem*. 1997; 272(50):31221-31224.
 - [de Bernabe DB, van Bokhoven H, van Beusekom E, Van den Akker W, Kant S, Dobyns WB, Cormand B, Currier S, Hamel B, Talim B, Topaloglu H, Brunner HG.](#) A homozygous nonsense mutation in the fukutin gene causes a Walker-Warburg syndrome phenotype. *J Med Genet*. 2003; 40(11):845-848.
 - [Dincer P, Balci B, Yuva Y, Talim B, Brockington M, Dincel D, Torelli S, Brown S, Kale G, Haliloglu G, Gerceker FO, Atalay RC, Yakicier C, Longman C, Muntoni F, Topaloglu H.](#) A novel form of recessive limb girdle muscular dystrophy with mental retardation and abnormal expression of alpha-dystroglycan. *Neuromuscul Disord*. 2003; 13(10):771-778.
 - [Durbeej M, Campbell KP.](#) Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models. *Curr Opin Genet Dev*. 2002; 12(3):349-361.
 - [Emery AE.](#) The muscular dystrophies. *Lancet*. 2002; 359(9307):687-695.
 - [Erazo-Torricelli R.](#) Updates in muscular dystrophies *Rev Neurol*. 2004; 39(9):860-871.
 - [Ettinger AJ, Feng G, Sanes JR.](#) epsilon-Sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutated in limb-girdle muscular dystrophy 2D. *J Biol Chem*. 1997; 272(51):32534-32538.
 - [Fairley EA, Riddell A, Ellis JA, Kendrick-Jones J.](#) The cell cycle dependent mislocalisation of emerin may contribute to the Emery-Dreifuss muscular dystrophy phenotype. *J Cell Sci*. 2002; 115(2):341-354.

-
- [Fatkin D](#), [MacRae C](#), [Sasaki T](#), [Wolff MR](#), [Porcu M](#), [Frenneaux M](#), [Atherton J](#), [Vidaillet HJ Jr](#), [Spudich S](#), [De Girolami U](#), [Seidman JG](#), [Seidman C](#), [Muntoni F](#), [Muehle G](#), [Johnson W](#), [McDonough B](#). Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *N Engl J Med*. 1999; 341(23):1715-1724.
 - [Ferreira LG](#), [Marie SK](#), [Liu EC](#), [Resende MB](#), [Carvalho MS](#), [Scaff M](#), [Reed UC](#). Dystrophin-glycoproteins associated in congenital muscular dystrophy: immunohistochemical analysis of 59 Brazilian cases. *Arq Neuropsiquiatr*. 2005; 63(3B):791-800.
 - [Frosk P](#), [Weiler T](#), [Nylen E](#), [Sudha T](#), [Greenberg CR](#), [Morgan K](#), [Fujiwara TM](#), [Wrogemann K](#). Limb-girdle muscular dystrophy type 2H associated with mutation in TRIM32, a putative E3-ubiquitin-ligase gene. *Am J Hum Genet*. 2002; 70(3):663-672.
 - [Fukuyama Y](#), [Osawa M](#), [Suzuki H](#). Congenital progressive muscular dystrophy of the Fukuyama type - clinical, genetic and pathological considerations. *Brain Dev*. 1981; 3(1):1-29.
 - [Furukawa T](#), [Toyokura Y](#). Congenital, hypotonic-sclerotic muscular dystrophy. *J Med Genet*. 1977; 14(6):426-429.
 - [Gamez J](#), [Navarro C](#), [Andreu AL](#), [Fernandez JM](#), [Palenzuela L](#), [Tejeira S](#), [Fernandez-Hojas R](#), [Schwartz S](#), [Karadimas C](#), [DiMauro S](#), [Hirano M](#), [Cervera C](#). Autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy: a large kindred with evidence for anticipation. *Neurology*. 2001; 56(4):450-454.
 - [Genschel J](#), [Schmidt HH](#). Mutations in the LMNA gene encoding lamin A/C. *Hum Mutat*. 2000; 16(6):451-459.
 - [Grain L](#), [Cortina-Borja M](#), [Forfar C](#), [Hilton-Jones D](#), [Hopkin J](#), [Burch M](#). Cardiac abnormalities and skeletal muscle weakness in carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophies and controls. *Neuromuscul Disord*. 2001; 11(2):186-1891.
 - [Guglieri M](#), [Magri F](#), [Comi GP](#). Molecular etiopathogenesis of limb girdle muscular and congenital muscular dystrophies: boundaries and contiguities. *Clin Chim Acta*. 2005; 361(1-2):54-79.
 - [Hackman JP](#), [Vihola AK](#), [Udd AB](#). The role of titin in muscular disorders. *Ann Med*. 2003; 35(6):434-441.

-
- Haq RU, Speer MC, Chu ML, Tandan R. Respiratory muscle involvement in Bethlem myopathy. *Neurology*. 1999; 52(1):174-176.
 - Hauser MA, Conde CB, Kowaljow V, Zeppa G, Taratuto AL, Torian UM, Vance J, Pericak-Vance MA, Speer MC, Rosa AL. Myotilin Mutation found in second pedigree with LGMD1A. *Am J Hum Genet*. 2002; 71(6):1428-432.
 - Hayashi YK, Chou FL, Engvall E, Ogawa M, Matsuda C, Hirabayashi S, Yokochi K, Ziober BL, Kramer RH, Kaufman SJ, Ozawa E, Goto Y, Nonaka I, Tsukahara T, Wang JZ, Hoffman EP, Arahata K. Mutations in the integrin alpha7 gene cause congenital myopathy. *Nat Genet*. 1998; 19(1):94-97.
 - Hayashi T, Arimura T, Ueda K, Shibata H, Hohda S, Takahashi M, Hori H, Koga Y, Oka N, Imaizumi T, Yasunami M, Kimura A. Identification and functional analysis of a caveolin-3 mutation associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 313(1):178-184.
 - Heydemann A, Huber JM, Demonbreun A, Hadhazy M, McNally EM. Genetic background influences muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 2005; 15(9-0):601-609.
 - Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*. 1987; 51(6):919-928.
 - Illa I, Serrano-Munuera C, Gallardo E, Lasa A, Rojas-Garcia R, Palmer J, Gallano P, Baiget M, Matsuda C, Brown RH. Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype. *Ann Neurol*. 2001; 49(1):130-134.
 - Irwin WA, Bergamin N, Sabatelli P, Reggiani C, Megighian A, Merlini L, Braghetta P, Columbaro M, Volpin D, Bressan GM, Bernardi P, Bonaldo P. Mitochondrial dysfunction and apoptosis in myopathic mice with collagen VI deficiency. *Nat Genet*. 2003; 35(4):367-371.
 - Jones KJ, Morgan G, Johnston H, Tobias V, Ouvrier RA, Wilkinson I, North KN. The expanding phenotype of laminin alpha2 chain (merosin) abnormalities: case series and review. *J Med Genet*. 2001; 38(10):649-657.
 - Kawabe K, Goto K, Nishino I, Angelini C, Hayashi YK. Dysferlin mutation analysis in a group of Italian patients with limb-girdle muscular dystrophy and Miyoshi myopathy. *Eur J Neurol*. 2004; 11(10):657-661.

-
- [Kim H, Rogers MJ, Richmond JE, McIntire SL](#). SNF-6 is an acetylcholine transporter interacting with the dystrophin complex in *aenorhabditis elegans*. *Nature*. 2004; 430(7002):891-896.
 - [Kirschner J, Bonnemann CG](#). The congenital and limb-girdle muscular dystrophies: sharpening the focus, blurring the boundaries. *Arch Neurol*. 2004; 61(2):189-199.
 - [Kondo-Iida E, Kobayashi K, Watanabe M, Sasaki J, Kumagai T, Koide H, Saito K, Osawa M, Nakamura Y, Toda T](#). Novel mutations and genotype-phenotype relationships in 107 families with Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD). *Hum Mol Genet*. 1999; 8(12):2303-2309.
 - [Leibowitz D, Dubowitz V](#). Intellect and behaviour in Duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol*. 1981; 23(5):577-590.
 - [Lescure A, Gautheret D, Carbon P, Krol A](#). Novel selenoproteins identified in silico and in vivo by using a conserved RNA structural motif. *J Biol Chem*. 1999; 274(53):38147-38154.
 - [Longman C, Brockington M, Torelli S, Jimenez-Mallebrera C, Kennedy C, Khalil N, Feng L, Saran RK, Voit T, Merlini L, Sewry CA, Brown SC, Muntoni F](#). Mutations in the human LARGE gene cause MDC1D, a novel form of congenital muscular dystrophy with severe mental retardation and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Hum Mol Genet*. 2003 ; 12(21):2853-2861.
 - [Maidment SL, Ellis JA](#). Muscular dystrophies, dilated cardiomyopathy, lipodystrophy and neuropathy: the nuclear connection. *Expert Rev Mol Med*. 2002; 2002:1-21.
 - [Manilal S, Recan D, Sewry CA, Hoeltzenbein M, Llense S, Leturcq F, Deburgrave N, Barbot J, Man N, Muntoni F, Wehnert M, Kaplan J, Morris GE](#). Mutations in Emery-Dreifuss muscular dystrophy and their effects on emerin protein expression. *Hum Mol Genet*. 1998; 7(5):855-864.
 - [McNally EM, Passos-Bueno MR, Bonnemann CG, Vainzof M, de Sa Moreira E, Lidov HG, Othmane KB, Denton PH, Vance JM, Zatz M, Kunkel LM](#). Mild and severe muscular dystrophy caused by a single gamma-sarcoglycan mutation. *Am J Hum Genet*. 1996; 59(5):1040-1047.
 - [McNally EM, de Sa Moreira E, Duggan DJ, Bonnemann CG, Lisanti MP, Lidov HG, Vainzof M, Passos-Bueno MR, Hoffman EP, Zatz M, Kunkel LM](#). Caveolin-3 in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*. 1998; 7(5):871-877.

-
- [Melacini P, Fanin M, Duggan DJ, Freda MP, Berardinelli A, Danieli GA, Barchitta A, Hoffman EP, Dalla Volta S, Angelini C.](#) Heart involvement in muscular dystrophies due to sarcoglycan gene mutations. *Muscle Nerve*. 1999; 22(4):473-479.
 - [Messina DN, Speer MC, Pericak-Vance MA, McNally EM.](#) Linkage of familial dilated cardiomyopathy with conduction defect and muscular dystrophy to chromosome q23. *Am J Hum Genet*. 1997; 61(4):909-917.
 - [Meza-Espinosa PA.](#) 2005. Tesis Maestria (Maestria en Ciencias Biologicas). Estudio por inmunofluorescencia del complejo de glicoproteinas unidas a distrofina (DGC) en biopsias musculares de pacientes con distrofia muscular y análisis molecular de una familia con una mutación en merosina. UNAM, Facultad de Ciencias. México D.F. 122 p.
 - [Minetti C, Sotgia F, Bruno C, Scartezzini P, Broda P, Bado M, Masetti E, Mazzocco M, Egeo A, Donati MA, Volonte D, Galbiati F, Cordone G, Bricarelli FD, Lisanti MP, Zara F.](#) Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat Genet*. 1998; 18(4):365-368.
 - [Moreira ES, Wiltshire TJ, Faulkner G, Nilforoushan A, Vainzof M, Suzuki OT, Valle G, Reeves R, Zatz M, Passos-Bueno MR, Jenne DE.](#) Limb-girdle muscular dystrophy type 2G is caused by mutations in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin. *Nat Genet*. 2000; 24(2):163-166.
 - [Nakamura A, Yoshida K, Takeda S, Dohi N, Ikeda S.](#) Progression of dystrophic features and activation of mitogen-activated protein kinases and calcineurin by physical exercise, in hearts of mdx mice. *FEBS Lett*. 2002; 520(1-3):18-24.
 - [Norwood FL, Sutherland-Smith AJ, Keep NH, Kendrick-Jones J.](#) 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*. 2000; 8(5):481-491.
 - [Noguchi S, McNally EM, Ben Othmane K, Hagiwara Y, Mizuno Y, Yoshida M, Yamamoto H, Bonnemann CG, Gussoni E, Denton PH, Kyriakides T, Middleton L, Hentati F, Ben Hamida M, Nonaka I, Vance JM, Kunkel LM, Ozawa E.](#) Mutations in the dystrophin-associated protein gamma-sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. *Science*. 1995; 270(5237):819-822.

-
- [Ozawa E, Noguchi S, Mizuno Y, Hagiwara Y, Yoshida M.](#) From dystrophinopathy to sarcoglycanopathy: evolution of a concept of muscular dystrophy. *Muscle Nerve*. 1998; 21(4):421-438.
 - [Palenzuela L, Andreu AL, Gamez J, Vila MR, Kunimatsu T, Meseguer A, Cervera C, Fernandez Cadenas I, van der Ven PF, Nygaard TG, Bonilla E, Hirano M.](#) A novel autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy (LGMD 1F) maps to 7q32.1-32.2. *Neurology*. 2003; 61(3):404-406.
 - [Pan TC, Zhang RZ, Sudano DG, Marie SK, Bonnemann CG, Chu ML.](#) New molecular mechanism for Ullrich congenital muscular dystrophy: a heterozygous in-frame deletion in the COL6A1 gene causes a severe phenotype. *Am J Hum Genet*. 2003; 73(2):355-369.
 - [Passos-Bueno MR, Moreira ES, Marie SK, Bashir R, Vasquez L, Love DR, Vainzof M, Iughetti P, Oliveira JR, Bakker E, Strachan T, Bushby K, Zatz M.](#) Main clinical features of the three mapped autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies and estimated proportion of each form in 13 Brazilian families. *J Med Genet*. 1996; 33(2):97-102.
 - [Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC, Krauss RM, Rubin EM.](#) An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science*. 2001; 294(5540):169-173.
 - [Piccolo F, Moore SA, Ford GC, Campbell KP.](#) Intracellular accumulation and reduced sarcolemmal expression of dysferlin in limb-girdle muscular dystrophies. *Ann Neurol*. 2000; 48(6):902-912.
 - [Pogue R, Anderson LV, Pyle A, Sewry C, Pollitt C, Johnson MA, Davison K, Moss JA, Mercuri E, Muntoni F, Bushby KM.](#) Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord*. 2001; 11(1):80-87.
 - [Porter JD.](#) Introduction to muscular dystrophy. *Microsc Res Tech*. 2000; 48(3-4):127-130.
 - [Prior TW, Bridgeman SJ.](#) Experience and strategy for the molecular testing of Duchenne muscular dystrophy. *J Mol Diagn*. 2005; 7(3):317-326.

-
- Richard I, Roudaut C, Saenz A, Pogue R, Grimbergen JE, Anderson LV, Beley C, Cobo AM, de Diego C, Eymard B, Gallano P, Ginjaar HB, Lasa A, Pollitt C, Topaloglu H, Urtizbera JA, de Visser M, van der Kooi A, Bushby K, Bakker E, Lopez de Munain A, Fardeau M, Beckmann JS. Calpainopathy-a survey of mutations and polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 1999; 64(6):1524-1540.
 - Saenz A, Leturcq F, Cobo AM, Poza JJ, Ferrer X, Otaegui D, Camano P, Urtasun M, Vilchez J, Gutierrez-Rivas E, Emparanza J, Merlini L, Paisan C, Goicoechea M, Blazquez L, Eymard B, Lochmuller H, Walter M, Bonnemann C, Figarella-Branger D, Kaplan JC, Urtizbera JA, Marti-Masso JF, Lopez de Munain A. LGMD2A: genotype-phenotype correlations based on a large mutational survey on the calpain 3 gene. *Brain.* 2005; 128(Pt 4):732-742.
 - Salamanca F, Coral R, Peñaloza R, Arenas D, Gonzalez M, Barrientos C, Buentello L. Molecular studies of Mendelian disorders, embryonic neoplasias, and polymorphisms in selected samples of the general population. A contribution to the genetic characterization of the Mexican population. *Arch Med Res.* 1995; 26(S)69-75.
 - Salmikangas P, Mykkanen OM, Gronholm M, Heiska L, Kere J, Carpen O. Myotilin, a novel sarcomeric protein with two Ig-like domains, is encoded by a candidate gene for limb-girdle muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 1999; 8(7):1329-1336.
 - Salmikangas P, van der Ven PF, Lalowski M, Taivainen A, Zhao F, Suila H, Schroder R, Lappalainen P, Furst DO, Carpen O. Myotilin, the limb-girdle muscular dystrophy 1A (LGMD1A) protein, cross-links actin filaments and controls sarcomere assembly. *Hum Mol Genet.* 2003; 12(2):189-203.
 - Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
 - Santavuori P, Pihko H, Sainio K, Lappi M, Somer H, Haltia M, Raitta C, Ketonen L, Leisti J. Muscle-eye-brain disease and Walker-Warburg syndrome. *Am J Med Genet.* 1990; 36(3):371-374.
 - Selcen D, Engel AG. Mutations in ZASP define a novel form of muscular dystrophy in humans. *Ann Neurol.* 2005; 57(2):269-276.
 - Scacheri PC, Gillanders EM, Subramony SH, Vedanarayanan V, Crowe CA, Thakore N, Binger M, Hoffman EP. Novel mutations in collagen VI genes: expansion of the Bethlem myopathy phenotype. *Neurology.* 2002; 58(4):593-602.

-
- Schlegel A, Volonte D, Engelman JA, Galbiati F, Mehta P, Zhang XL, Scherer PE, Lisanti MP. Crowded little caves: structure and function of caveolae. *Cell Signal*. 1998; 10(7):457-463.
 - Shokeir MH, Kobrinsky NL. Autosomal recessive muscular dystrophy in Manitoba Hutterites. *Clin Genet*. 1976; 9(2):197-202.
 - Speer MC, Vance JM, Grubber JM, Lennon Graham F, Stajich JM, Viles KD, Rogala A, McMichael R, Chutkow J, Goldsmith C, Tim RW, Pericak-Vance MA. Identification of a new autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy locus on chromosome 7. *Am J Hum Genet*. 1999; 64(2):556-562.
 - Starling A, Kok F, Passos-Bueno MR, Vainzof M, Zatz M. A new form of autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy (LGMD1G) with progressive fingers and toes flexion limitation maps to chromosome 4p21. *Eur J Hum Genet*. 2004; 12(12):1033-1040.
 - Steven L. Roberds, France Leturcq, Valérie Allamand, Federica Piccolo, Marc Jeanpierre, Richard D. Anderson, Leland E. Lim, Jane C. Lee, Fernando M.S. Tomé, Norma B. Romero, Michel Fardeau, Jacques S. Beckmann, Jean-Claude Kaplan, and Kevin P. Campbell. Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell*. 1994; 78(4):625-633.
 - Straub V, Campbell KP. Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Curr Opin Neurol*. 1997; 10(2):168-175.
 - Stuurman N, Heins S, Aebi U. Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J Struct Biol*. 1998; 122(1-2):42-66.
 - Takahashi T, Aoki M, Tateyama M, Kondo E, Mizuno T, Onodera Y, Takano R, Kawai H, Kamakura K, Mochizuki H, Shizuka-Ikeda M, Nakagawa M, Yoshida Y, Akanuma J, Hoshino K, Saito H, Nishizawa M, Kato S, Saito K, Miyachi T, Yamashita H, Kawai M, Matsumura T, Kuzuhara S, Ibi T, Sahashi K, Nakai H, Kohnosu T, Nonaka I, Arahata K, Brown RH Jr, Saito H, Itoyama Y. Dysferlin mutations in Japanese Miyoshi myopathy: relationship to phenotype. *Neurology*. 2003; 60(11):1799-1804.
 - Tateyama M, Aoki M, Nishino I, Hayashi YK, Sekiguchi S, Shiga Y, Takahashi T, Onodera Y, Haginoya K, Kobayashi K, Iinuma K, Nonaka I, Arahata K, Itoyama Y. Mutation in the caveolin-3 gene causes a peculiar form of distal myopathy. *Neurology*. 2002; 58(2):323-325.

-
- [Tonini MM, Passos-Bueno MR, Cerqueira A, Pavanello R, Vainzof M, Dubowitz V, Zatz M.](#) Facioscapulohumeral (FSHD1) and other forms of muscular dystrophy in the same family: is there more in muscular dystrophy than meets the eye? *Neuromuscul Disord.* 2002; 12(6):554-557.
 - [Tyler KL.](#) Origins and early descriptions of "Duchenne muscular dystrophy". *Muscle Nerve.* 2003; 28(4):402-422.
 - [Udd B.](#) Limb-girdle type muscular dystrophy in a large family with distal myopathy: homozygous manifestation of a dominant gene? *J Med Genet.* 1992; 29(6):383-389.
 - [Ueyama H, Kumamoto T, Nagao S, Masuda T, Horinouchi H, Fujimoto S, Tsuda T.](#) A new dysferlin gene mutation in two Japanese families with limb-girdle muscular dystrophy 2B and Miyoshi myopathy. *Neuromuscul Disord.* 2001; 11(2):139-145.
 - [Urtasun M, Lopez de Munain A.](#) Limb girdle dystrophy: a syndrome clinically and genetically heterogeneous. *Neurologia.* 1999; 14(3):97-101.
 - [Vainzof M, Passos-Bueno MR, Pavanello RC, Zatz M.](#) Is dystrophin always altered in Becker muscular dystrophy patients? *J Neurol Sci.* 1995; 131(1):99-104.
 - [Vainzof M, Passos-Bueno MR, Pavanello RC, Marie SK, Oliveira AS, Zatz M.](#) Sarcoglycanopathies are responsible for 68% of severe autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in the Brazilian population. *J Neurol Sci.* 1999; 164(1):44-49.
 - [Vainzof M, Anderson LV, McNally EM, Davis DB, Faulkner G, Valle G, Moreira ES, avanello RC, Passos-Bueno MR, Zatz M.](#) Dysferlin protein analysis in limb-girdle muscular dystrophies. *J Mol Neurosci.* 2001; 17(1):71-80.
 - [Vainzof M, Zatz M.](#) Protein defects in neuromuscular diseases. *Braz J Med Biol Res.* 2003; 36(5):543-555.
 - [Vainzof M, Richard P, Herrmann R, Jimenez-Mallebrera C, Talim B, Yamamoto LU, Ledeuil C, Mein R, Abbs S, Brockington M, Romero NB, Zatz M, Topaloglu H, Voit T, Sewry C, Muntoni F, Guicheney P, Tome FM.](#) Prenatal diagnosis in laminin alpha2 chain (merosin)-deficient congenital muscular dystrophy: a collective experience of five international centers. *Neuromuscul Disord.* 2005; 15(9-10):588-594.
 - [van der Kooi AJ, de Visser M, Barth PG.](#) Limb girdle muscular dystrophy: reappraisal of a rejected entity. *Clin Neurol Neurosurg.* 1994; 96(3):209-218.

-
- [Walter MC, Petersen JA, Stucka R, Fischer D, Schroder R, Vorgerd M, Schroers A, Schreiber H, Hanemann CO, Knirsch U, Rosenbohm A, Huebner A, Barisic N, Horvath R, Komoly S, Reilich P, Muller-Felber W, Pongratz D, Muller JS, Auerswald EA, Lochmuller H.](#) FKRP (826C>A) frequently causes limb-girdle muscular dystrophy in German patients. *J Med Genet.* 2004; 41(4):e50.
 - [Weller B, Karpati G, Carpenter S.](#) Dystrophin-deficient mdx muscle fibers are preferentially vulnerable to necrosis induced by experimental lengthening contractions. *J Neurol Sci.* 1990; 100(1-2):9-13.
 - [Wheeler MT, Zarnegar S, McNally EM.](#) Zeta-sarcoglycan, a novel component of the sarcoglycan complex, is reduced in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2002; 11(18):2147-2154.
 - [Whitelaw E, Martin DI.](#) Retrotransposons as epigenetic mediators of phenotypic variation in mammals. *Nat Genet.* 2001; 27(4):361-365.
 - [Yang B, Jung D, Motto D, Meyer J, Koretzky G, Campbell KP.](#) SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2. *J Biol Chem.* 1995; 270(20):11711-11714.
 - [Zatz M, de Paula F, Starling A, Vainzof M.](#) The 10 autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord.* 2003; 13(7-8):532-544.
 - [Zatz M.](#) Diagnosis, carrier detection, and genetic counseling in the muscular dystrophies. *Pediatr Clin North Am.* 1978; 25(3):557-573.