



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LAS
DISTROFIAS MUSCULARES:
Duchenne/Becker y Cinturas**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
BLADIMIR ROQUE RAMÍREZ**

ASESOR: DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LAS
DISTROFIAS MUSCULARES:
Duchenne/Becker y Cinturas**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
BLADIMIR ROQUE RAMÍREZ**

ASESOR: DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2006

DEDICATORIAS

Este trabajo va dedicado a mis padres Adrián y Mercedes, por haber soñado pero sobre todo por haber luchado para ver cumplidos sus sueños..... 9 de 9..... felicidades papá, mamá, lo lograron..... los quiero mucho.

Así también dedico este trabajo a mis amigos que crecieron con migo y que por azares del destino no tuvieron la oportunidad de seguir estudiando (Jorge, Mauricio y Elmer).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a mis hermanos Tulita, Santiago, Octavio, Henos, Adrián, Ma. de Jesús, Pedro y Misaél por su apoyo y comprensión pero sobre todo por hacer más ligero mi camino..... gracias hermanos.

A mis amigos, grandes amigos de la universidad que siempre estuvieron ahí cuando los necesite a Asaf, Itzel, Víctor, Ana, Araceli, Lucia, Silvia Selene, Selene G. B., Olga, Alejandro F., Miguel, Omar, Gabino, Joel, Alejandro y Sergio por esos bellos momentos que pasamos juntos en el salón de clases, en las jardineras, en la ñoñoteca, en las fiesta, etc... gracias por brindarme su amistad durante todo este tiempo... no lo olvidaré y espero que nuestra amistad nunca termine. Ha!!! y no olviden que cuando gusten TecoaYork los espera.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de genética molecular Manolo, Gabo, Ricardo, Chio, Alexa, Benja, Liliana, Omar, Viola y Sofía por su cooperación y buenas aportaciones que hicieron a este trabajo... gracias, sin su ayuda no lo hubiera logrado. Nos seguiremos viendo por unos años más.

Agradecimiento especial

Al Dr. Ramón Coral, primero que nada por su amistad, por saber compartir su conocimiento con los demás (siempre al pendiente de todo), por su ayuda y comprensión... gracias doc, ha sido para mí un gran maestro y figura a seguir.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

“El día pasa..... despiertes o no”

ÍNDICE GENERAL

Resumen	i
Abreviaturas	ii
Índice de figuras, tablas y gráficas	iii
1.- Introducción	2
1.1 Generalidades	2
1.2 Distrofinopatías	8
1.3 LGMDs	9
1.3.1 Sarcoglicanopatías	10
1.3.2 Disferlinopatías	14
1.3.3. Caveolinopatías	45
1.3.4 Teletoninopatías	16
1.3.5 Laminopatías	17
1.4 Emerinopatías	17
1.5 Merosinopatías	18
2.- Justificación	19
3.- Hipótesis	20
4.- Objetivo general	20
5.- Objetivos particulares	20
6.- Material y métodos	21
6.1- Pacientes	21
6.2- Criterios de inclusión	21
6.3- Biopsia muscular	22
6.4- Técnicas de inmunofluorescencia	23
6.4.1- Anticuerpos	24
6.5.- Técnica de Western blot	25
6.5.1- Extracción de proteínas	25
6.5.2- Separación de proteínas	25
6.5.3- Transferencia de proteínas	25
6.5.4- Identificación de proteínas	26
6.5.5.- Cuantificación de proteínas	27
7.- Resultados	27
7.1- Grupo de estudio	28
8.- Discusión	54
9.- Conclusiones	65
10.- Bibliografía	66
11.- Perspectivas	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Músculos afectados en las diferentes distrofias musculares	3
Figura 2. Localización celular de proteínas asociadas con distrofia muscular	5
Figura 3. Sarcoglicanos α , β , γ , δ y ϵ	13
Figura 4. Árbol genealógico del paciente 210	32
Figura 5. Inmunofluorescencias del paciente 210	33
Figura 6. Árbol genealógico del paciente 218	34
Figura 7. Inmunofluorescencias del paciente 218	35
Figura 8. Árbol genealógico del paciente 194	36
Figura 9. Inmunofluorescencias del paciente 194	37
Figura 10. Árbol genealógico del paciente 204	38
Figura 11. Inmunofluorescencias del paciente 204	39
Figura 12. Árbol genealógico del paciente 203	40
Figura 13. Inmunofluorescencias del paciente 203	41
Figura 14. Inmunofluorescencias de pacientes deficientes de disferlina	45
Figura 15. Western blot	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las distrofias musculares	7
Tabla 2. Grupo de estudio	28
Tabla 3. Grupo de estudio	29
Tabla 4. Resultados de la inmunofluorescencia	30
Tabla 5. Resultados de la inmunofluorescencia	31
Tabla 6. Pacientes con deficiencia en disferlina	43
Tabla 7. Cuantificación de disferlina	48
Tabla 8. Cuantificación de disferlina	48
Tabla 9. Inmunofluorescencia vs Western blot	49

ÍNDICE GRÁFICAS

Gráfica 1. Dx Clínico vs Dx Molecular	42
Gráfica 2. Expresión de disferlina	50
Gráfica 3. Dx Clínico vs Dx Molecular	51
Gráfica 4. Distribución de las distrofias de cinturas	52
Gráfica 5. Número de pacientes por año	72

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AD-EDMD	Distrofia muscular de Emery-Dreifuss autosómica dominante.
ATP	Adenosiltrifosfato.
BSA	Albúmina sérica bovina.
CAV3	Gen de caveolina-3.
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario.
COOH	Carboxilo.
CPK	Creatininfosfocinasa.
Cy3	Cianina 3.
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol.
DFEH	Distrofia facioescapulohumeral.
DG	Distroglicano.
DGC	Complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina.
DMAT	Miopatía de compartimento distal anterior.
DMB	Distrofia muscular de Becker.
DMC	Distrofia muscular congénita.
DMD	Distrofia muscular de Duchenne.
DMED	Distrofia muscular de Emery y Dreifuss.
DNA	Acido desoxirribonucleico.
Dx	Diagnóstico.
DYSF	Gen de disferlina.
FKRP	Gen de fukutina.
HCK	HiperCkhemia.
H-E	Hematoxilina-Eosina.
Kb	Kilo bases.
Kd	Kilo dalton.
LGMD	Distrofia muscular de cinturas.
LMNA	Gen de Lámina A/C.
mA	Mili ampers.
mdx	Ratón deficiente de distrofina.
MHC	Cadena pesada de miosina.
mL	Mililitros.
MM	Miopatía de Miyoshi.
NH₃	Amino.
nNOS	Sintetasa de ácido nítrico neural.
PBS	Buffer salino de fosfato.
RNA_m	Ácido ribonucleico mensajero.
SG	Sarcoglicano.
SG-SSPN	Complejo sarcoglicano-sarcospan.
TBS	Buffer salino tris
TEMED	N,N,N'N'-tetrametiletildiamina
Xp21	Brazo corto del cromosoma X región 2 banda 1.
X-EDMD	Distrofia muscular de Emery y Dreifuss ligada al cromosoma X.

RESUMEN

Las distrofias musculares son un grupo muy heterogéneo de enfermedades hereditarias que se caracterizan principalmente por el deterioro y debilidad progresiva de los músculos. La edad de inicio de estas enfermedades van desde el nacimiento hasta la edad adulta siendo en la mayoría de los casos letales antes de la cuarta década de vida. Estos trastornos se presentan por el defecto en los genes que codifican para diferentes proteínas entre ellas las del complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina (DGC).

Dado a la gran variabilidad clínica inter e intrafamiliar que presentan los pacientes, ha sido muy difícil clasificar a las distrofias musculares en base sólo a las características clínicas que presentan, debido a esto y al gran número de genes relacionados con esta patología, es necesario hacer un diagnóstico correcto que nos permita identificar la causa primaria de la enfermedad. Actualmente, las técnicas empleadas en la genética y la biología molecular nos han permitido clasificar de una manera más certera a las distrofias musculares de acuerdo a la etiología de las mismas.

Debido a lo anterior, en este trabajo, se llevó a cabo el análisis por inmunofluorescencia indirecta de 11 proteínas asociadas y no asociadas al DGC (distrofina, disferlina, sarcoglicanos: α , β , γ y δ , caveolina-3, merosina, teletonina, emerina NH3 y lamina A/C) en 31 biopsias musculares de pacientes con un cuadro clínico distrófico. Los resultados muestran que la principal causa de distrofia muscular es la deficiencia de la proteína distrofina (31.25%), seguida por disferlina (25.8%) y α -SG (3.22%). Así mismo, se realizó la técnica de Western blot en pacientes deficientes por inmunofluorescencia de disferlina la cual fue la principal causa de distrofia muscular de cinturas.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1- GENERALIDADES

Las distrofias musculares son enfermedades hereditarias que se caracterizan principalmente por el deterioro y debilidad progresiva de los músculos así como también por procesos de necrosis-regeneración de las fibras musculares, núcleos centrales y por el reemplazo del músculo por tejido conectivo y adiposo. Estos trastornos se diferencian entre sí, por el modo de herencia (ligada al cromosóma X, a genes autosómicos dominantes y autosómicos recesivos), por la edad en que aparecen los síntomas, por los tipos de síntomas que se desarrollan y por la distribución de los grupos musculares afectados. Dado a lo anterior y a la gran variabilidad clínica inter e intrafamiliar que se presentan en los pacientes, ha sido muy difícil la clasificación de las distrofias musculares, no obstante de que en los últimos 10 años se ha incrementado el número de genes involucrados con estas patologías sumando a más de 30 el número de proteínas relacionadas con las distrofias musculares (Tabla 1).

Clínicamente las distrofias musculares se clasifican en distrofinopatías (Duchenne/Becker) (DMD/B), distrofia facioescapulohumeral (DFEH), distrofias de cinturas (LGMD), distrofia de Emery-Dreifuss (DMED), distrofias musculares congénitas (DMC), distrofia distal y distrofias oculofaríngeas. (Emery, 2002). (Figura 1).

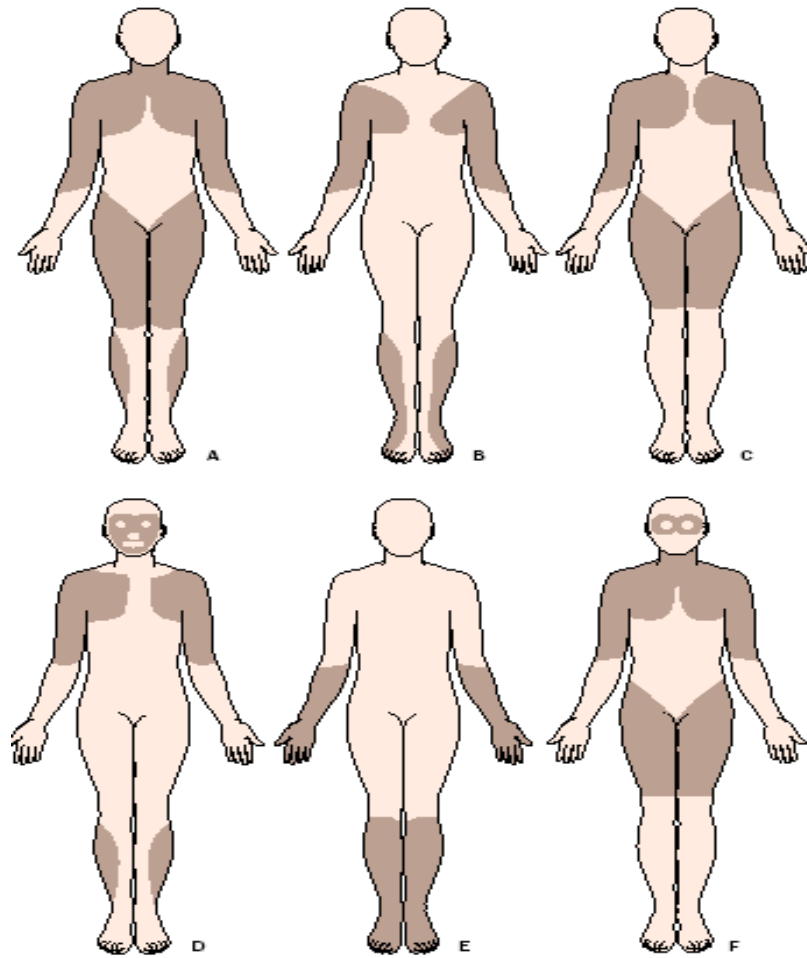


Figura 1. Grupo de músculos afectados en las diferentes distrofias musculares. A) DMD/B, B) Distrofia muscular tipo Emery-Dreifuss, C) LGMD, D) Distrofia muscular facioescapulohumeral, E) Distrofia muscular distal y F) Distrofia muscular oculofaríngea. (Emery, 2002).

El descubrimiento del gen que codifica para la distrofina (Koenig, 1987) y la identificación de la misma fué el primer paso para comenzar a entender la patogénesis de las distrofias musculares desde un punto de vista molecular. En consecuencia, durante el proceso de análisis de la distrofina para comprender su función en el músculo esquelético y sobre todo en la membrana celular, se descubrieron una serie de proteínas subsarcolemales, transmembranales y de la matriz extracelular que al igual que distrofina, su ausencia o disminución, provocan diversos tipos de distrofia muscular (Matsumura et al. 1993 and Angelini et al, 1999).

Aunado a lo anterior, existe un complejo de glicoproteínas asociado a distrofina (DGC) en donde alteraciones en alguno de sus componentes generan principalmente distrofias musculares de tipo Duchenne/Becker, de cinturas y congénitas (Figura 2). El DGC está formado por la interacción de diversas proteínas unidas íntimamente con distrofina en el sarcolema celular del músculo esquelético, cardíaco y liso (Campbell, 1995; Straub et al., 1999; Yoshida and Ozawa, 1990).

De acuerdo a las características bioquímicas, el DGC se subdivide en tres subcomplejos (Campbell, 1995) (Figura 2). El primer subcomplejo se ubica por debajo del sarcolema (subsarcolemal) y está formado por la distrofina, las sintrofinas α , $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, la α -distrobrevina y la sintetasa de ácido nítrico neural (nNOS). Tanto las sintrofinas como las distrobrevinas están unidas al extremo carboxilo terminal de la distrofina o su homólogo autosómico, la utrofina. El segundo subcomplejo en el DGC está compuesto por α -dístroglicano (α -DG) y β -dístroglicano (β -DG). α -dístroglicano se une a α -2-laminina (merosina) en la matriz extracelular mientras que β -dístroglicano, que es una proteína transmembranal, se une a la distrofina/utrofina a nivel intracelular. Recientemente se han encontrado diversos trastornos con un fenotipo DMC relacionados con una deficiencia en la glicosilación de α -DG (Costanza, 2005), esto se debe a una deficiencia en la actividad de la enzima que glicosila a α -DG (Aruto, 2001). Esta enzima es codificada por el gen FKRP que codifica para la proteína Fukutina (Fukuyama et al. 1981 and Hayashi et al. 2001). El tercer subcomplejo del DGC denominado sarcoglicano-sarcospán (SG-SSPN) está formado por un grupo de proteínas transmembranales llamadas sarcoglicanos (SG) (α / ϵ , β , γ , δ y ζ) y la proteína sarcospán.

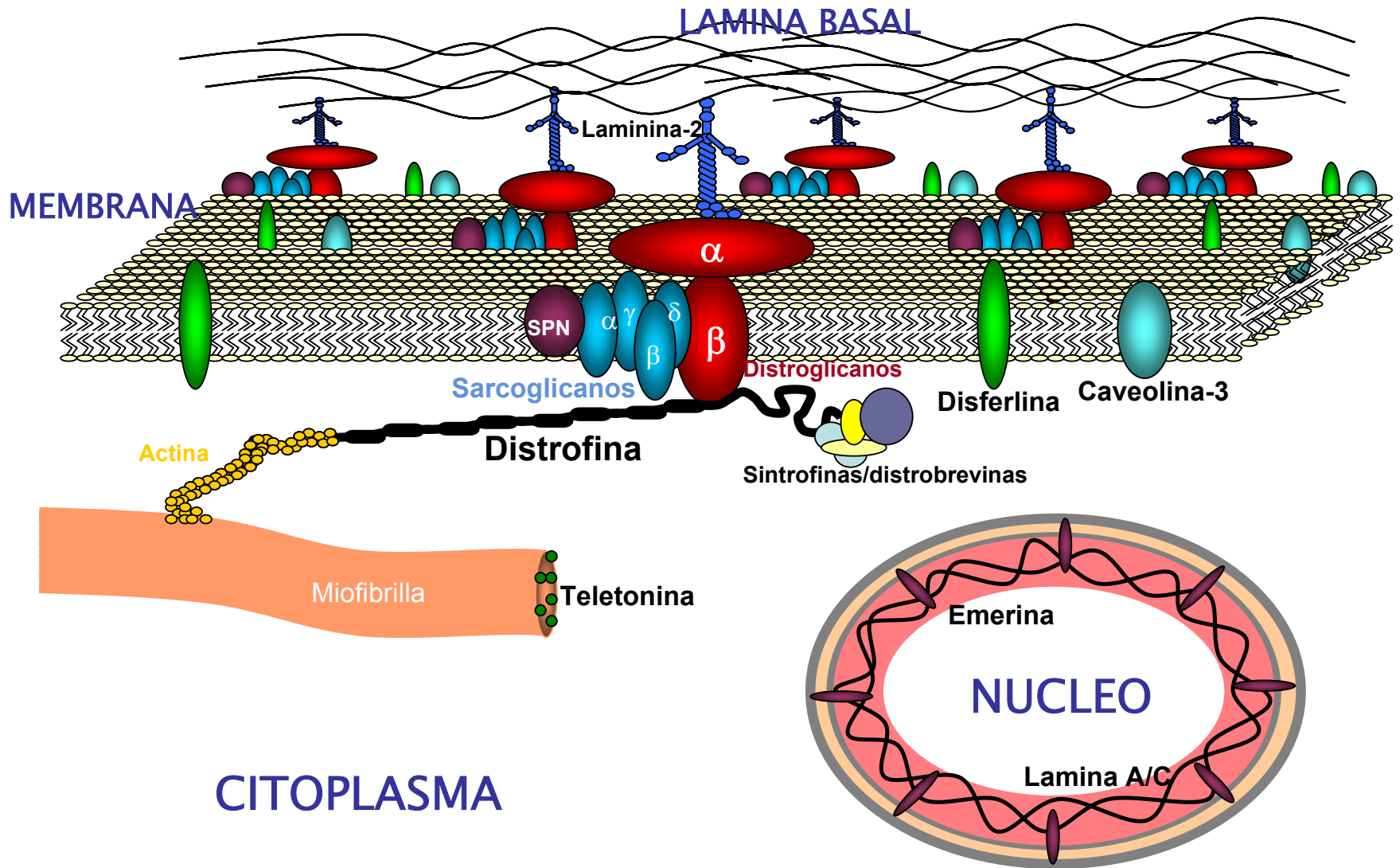


Figura 2. Localización celular de algunas proteínas asociadas con distrofia muscular.

Una de las primeras funciones que se le adjudicó al DGC fue la de conferir estabilidad a la fibra muscular y una conexión entre la matriz extracelular y el citoesqueleto intracelular (Ervasti, 1993). Actualmente, son varias las funciones que se les han asignado al DGC, existe evidencia de que éste es un importante complejo transmembranal de señalización debido a que cada vez se encuentran más moléculas relacionadas en procesos de señalización que interactúan con este complejo (Ort et al, 2000 and Yang et al, 1995), por otro lado se ha encontrado una estrecha analogía entre el DGC y otros complejos involucrados en vías de señalización tales como el complejo de integrinas en la membrana celular y el complejo de caveolina-3 en la caveola. Cuando hay disrupción en cualquiera de estos complejos se genera una interrupción en las vías de señalización donde se sugiere existe un mecanismo común de patogénesis que lleva a la muerte celular por defecto de cualquiera de los dos complejos (Hynes 1992; Okamoto et al, 1998 and Smart et al, 1999). Aunado a esto, se han detectado grupos de cisterna característicos en moléculas receptoras sobre la estructura de los SG (Matsumura et al, 1999), en el caso especial de α SG se ha sugerido que presenta una actividad ecto-ATPasa dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} que regula la concentración de ATP extracelular modulando así la actividad del receptor P2X purinérgico que funciona como un canal de cationes inespecíficos (Betto et al, 1999.; Dorianna et. al, 2004).

Existen otras proteínas no relacionadas con el DGC que generan distrofia muscular tales como disferlina y caveolina-3 que son proteínas transmembranales; teletonina que se encuentra en el sarcómero; lamina A/C y emerina que se encuentran en el núcleo. En la actualidad se han reportado más de 30 proteínas relacionadas con distrofia muscular (Tabla 1).

TABLA 1. Clasificación genética de las distrofias musculares

TIPO DE DISTROFIA	MODO DE HERENCIA	LOCUS	PRODUCTO DEL GEN
Distrofia muscular ligada al X			
Duchenne/Becker	XR	Xp21	Distrofina
Emery-Dreifuss	XR	Xq28	Emerina
Emery-Dreifuss	AD	1q11	Lamina A/C
Distrofias musculares de cinturas			
Autosómicas dominantes			
LGMD 1 A	AD	5q22-q34	
LGMD 1 B	AD	1q1-21	Lamina A/C
LGMD 1 C	AD	3p25	Caveolina-3
LGMD 1 D	AD	6q22	
LGMD 1 E	AD	7	
Autonómicas recesivas			
LGMD 2 A	AR	15q15	Calpaina-3
LGMD 2 B	AR	2p13	Disferlina
LGMD 2 C	AR	13q12	γ -Sarcoglicano
LGMD 2 D	AR	17q12-q21	α -Sarcoglicano
LGMD 2 E	AR	4q12	β -Sarcoglicano
LGMD 2 F	AR	5q33-q34	δ -Sarcoglicano
LGMD 2 G	AR	17q11-q12	Teletonina (TCAP)
LGMD 2 H	AR	9q3-q34	
Distrofia muscular distal			
Miopatía de Miyoshi	AR	2p13	Disferlina
Distrofia tibial muscular	AD	2q31	Titina
Distrofias musculares congénitas			
Clásica o pura CMD	AR	6q22	Laminina α -2
Fukuyama CMD	AR	12q31-q33	Fukutina
Miopatía congénita integrina α 7	AR	12q13	Integrina α 7
Espina rígida CMD	AR	1p35-36	
Enfermedad músculo-ojo-cerebro	AR	1p32-p34	
Otras formas de distrofia muscular			
Miopatía Bethlem	AD	21q22	Colagena VI α 1
	AD	21q22	Colagena VI α 2
	AD	2q37	Colagena VI α 3
Epidermis bulosa y MD	AR	8q24-qter	Plectina
Distrofia muscular oculofaríngea	AD	14q11.2-q13	Proteína unida a poli A
Distrofia muscular facioescapulohumeral	AD	4q35	
Distrofia miotónica	AD	19q13	Proteinasa Miotónica

(AD) autosómica dominante; (AR) autosómica recesiva; (LGMD) distrofias musculares de cintura; (XR) recesiva unida al cromosoma X. (Modificado de Cohn et al., 2000).

1.2- DISTROFINOPATÍAS

Las distrofinopatías son causadas por el defecto en el gen recesivo ubicado en Xp21 que codifica para la proteína distrofina y que incluye fundamentalmente las DMD/B. El gen puede presentar deleciones, duplicaciones o mutaciones puntuales y la gravedad del fenotipo depende principalmente del sitio de la mutación mas que de su tamaño (Emery, 1991). Se tiene reportado que el 65 % de los pacientes presentan deleciones, otro 5% duplicaciones y un 30 % presenta mutaciones puntuales (Hu et al, 1990 and Roberts et al, 1994)..

El gen de la distrofina mide 2.4 Mb de ADN y es el más grande del genoma humano (Hoffman et al., 1987; den Dunnen et al., 1989, 1992; Nobile and Marchi 1994) y contiene 79 exones que producen un RNAm de 14 Kb que codifica para una proteína de 3685 aminoácidos con un peso de 427 Kd (Koenig et al, 1987; Den Dunnen et al, 1989; Tennyson et al, 1995).

De los dos tipos de distrofia que se presentan por mutaciones en este gen, la DMD es la más severa y tiene una frecuencia que va de 1 en 3 500 a 1 en 4 000 varones nacidos vivos (Werneck and Bonilla, 1990; van Essen et al., 1992; Engel et al., 1994). Esta comienza entre los 2 y los 4 años de vida con retraso motor en el 40 % de los pacientes, el 30 % presenta marcha anormal y un 8 % trastornos del lenguaje y el habla, el 20% presenta un IQ menor a 70 y la distrofina se encuentra en cantidades menores al 3% en relación a una expresión normal. Los signos característicos son debilidad de cinturas, hipertrofia o pseudohipertrofia gemelar, debilidad de los flexores del cuello, retracción aquiliana, escoliosis, signo de Gowers

positivo (maniobra de pararse trepados sobre si mismos) y pérdida de la ambulaci3n antes de los 13 a1os. La muerte se debe principalmente al fallo respiratorio o cardiaco en la segunda d3cada de vida.

En la DMB la distribuci3n de la p3rdida y debilidad muscular es muy similar a lo que pasa en DMD pero la evoluci3n de los s3ntomas es m3s lenta. La DMB tiene una frecuencia de 1 en 18 500 varones nacidos vivos (Bushby, 1991). La distrofina se expresa de un 10 al 40 % en relaci3n a su expresi3n normal o se produce una prote3na parcialmente funcional de un tama1o m3s peque1o (Hoffman et al. 1988; Nicholson et al.1990). En las DMB, los s3ntomas empiezan alrededor de los 12 a1os, la p3rdida de la ambulaci3n se da despu3s de los 16, generalmente los pacientes mueren en la cuarta o quinta d3cada de vida debido a miocardipat3as. En algunos casos se presenta retraso mental. Tanto en DMD y DMB se presentan niveles altos de CPK (Creatinin fosfocinasa) lo que orienta al diagn3stico.

Entre el 5 y el 10 % de las mujeres portadoras muestran cierto grado de debilidad muscular proximal e hipertr3fia de gemelos y se evidencia m3s com3nmente en la adolescencia (Bieber, 1990).

1.3- DISTROFIAS MUSCULARES DE CINTURAS (LGMDs)

En las distrofias musculares de cinturas (LGMDs) la debilidad muscular se presenta principalmente en los m3sculos proximales de las extremidades y la cintura escapular. Estas enfermedades se presentan por el defecto de diversas prote3nas sarcolemales y subsarcolemales, en particular por mutaciones en los genes que

codifican para los sarcoglicanos (SG), disferlina, caveolina-3, teletonina, lamina A/C, emerina y calpaina-3. Actualmente se han descrito diversas proteínas asociadas a este tipo de distrofias por lo que se han dividido en distrofias de cinturas de herencia dominante (LGMD 1) y distrofias de cinturas de herencia recesiva (LGMD 2).

1.3.1- Sarcoglicanopatías

Representan del 20 -25 % de las LGMD y constituyen el 40-50 % de los casos graves (Colomer, 1999). La edad promedio de inicio va de los 6-8 años aunque puede variar y se caracterizan por un fenotipo similar al de Duchenne con hipertrofia de las pantorrillas y debilidad proximal, pero con mayor atrofia de los músculos de la cintura escapular (Urtasun et al, 1998. Angelini et al, 1999. Politano et al, 2001). El cuadro clínico es generalmente grave, con progresión y pérdida de la marcha en la segunda década de vida aunque puede ocurrir antes. En las sarcoglicanopatías, la ausencia de un SG lleva a alteraciones de la permeabilidad de la membrana y por ende a la muerte celular, ambos procesos son característicos en las distrofias musculares.

Las proteínas que conforman el subcomplejo de sarcoglicanos son 6: α , β , γ , δ , ϵ y ζ SG con un peso molecular de 50, 43, 35, 35, 50 y 33 Kd respectivamente (Etinger et al., 1997; Straub et al., 1999). α , β , γ y δ SG forman un subcomplejo en músculo esquelético y cardíaco principalmente y su deficiencia genera las LGMD de tipo 2D, 2E, 2C y 2F respectivamente. Existe un complejo alternativo en el músculo estriado, en el cual ϵ SG reemplaza a α SG. Por otra parte los SG β , δ , ϵ y ζ forman otro subcomplejo en el músculo liso vascular (VSM). Además del problema en músculo esquelético se ha observado que en muchos pacientes con deficiencia en

algún SG también presentan cardiomiopatía dilatada siendo ésta más frecuente en pacientes con deficiencia de β , γ y δ SG. Asimismo, se ha encontrado necrosis isquémica en modelos de ratones deficiente de β , γ y δ SG (Coral-Vázquez et al, 1999; Hack et al, 1998 and Durbeej et al, 2000) lo que sugiere un papel importante de estas proteínas en la función vascular.

Se ha observado también que la mutación en uno de los SG desestabiliza el complejo y ocasiona la reducción o pérdida secundaria de los otros SG (Mizuno et al, 1995) y de sarcospan (Duclos et al, 1998; Coral-Vazquez et al,1999).

α SG fue la primer proteína estudiada del complejo, es una proteína transmembranal de tipo I con una secuencia señal amino terminal, un dominio señal transmembranal, dos sitios predictivos de glicosilación en el lado amino y un lado carboxilo terminal citoplasmático. La ausencia de α SG genera la LGMD 2D la cual no cursa con afecciones cardiacas, las mutaciones en α SG son las más frecuentes y las que originan fenotipos menos graves en los que se observan residuos la proteína (Eymard et al., 1997). Los reportes de cardiomiopatías en pacientes deficientes de α SG son raros lo que sugiere que su función en músculo esquelético y músculo cardiaco es diferente. Por otro lado, el RNAm de α SG es abundante en músculo esquelético, se encuentra también en bajos niveles en músculo cardiaco y pulmón. El RNAm presente en músculo cardiaco es más corto que el de músculo esquelético y carece de la secuencia base que codifica para el dominio transmembranal, por ende, la baja expresión de α SG en el músculo cardiaco puede explicar la baja disfunción cardiaca que presentan algunos pacientes con LGMD 2D.

β SG es una proteína transmembranal de tipo II, la secuencia primaria revela que posee un dominio señal transmembranal y tres sitios predictivos de glicosilación por el lado amino, contiene el lado amino terminal a nivel intracelular con regiones hidrofóbicas. β SG se expresada en músculo esquelético, cardíaco y liso, su RNAm se puede encontrar en otros tejidos incluyendo cerebro (Fougerousse et al., 1998). Las mutaciones en β SG afectan la membrana celular observándose cierta relación con una forma severa de distrofia muscular.

El RNAm de γ SG se ha encontrado en músculo esquelético y cardíaco exclusivamente. Es una proteína transmembranal tipo II (Noguchi et al., 1995). El extremo carboxilo terminal de γ SG es homólogo al de β y δ SG con subunidades conservadas de cisterna en una posición fija similar a los sitios de unión de proteínas ricos en cisterna (McNally et al., 1996b) Mutaciones en el lado carboxilo terminal que afectan los residuos conservados de cisterna evitan el despliegue y ensamblaje de la proteína en el complejo (Piccolo et al., 1996)

δ SG es expresado en músculo esquelético, corazón y en niveles bajos en músculo liso. Es una proteína transmembranal tipo II, con γ SG es 58 % homólogo a nivel de nucleótidos y 69 % similar a nivel de aminoácidos (Figura 3). Mediante un splice alternativo en el exón 8, aparece en otros sitios del músculo cardíaco y esquelético pero carece de residuos conservados de cisterna (Jung et al., 1996).

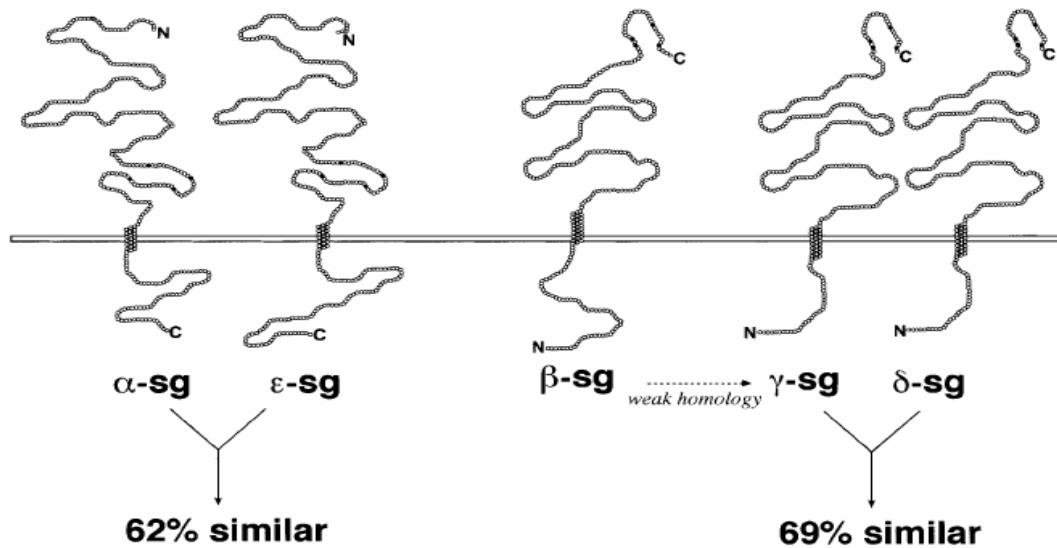


Figura 3. Comparación estructural entre α , β , γ , δ y ε SG. (Hack, 2000)

ε SG es una proteína transmembranal tipo I (Audrey J et al, 1997) parecida en un 62 % a nivel de aminoácidos con α SG (Hack et al, 2000), presenta una secuencia señal amino terminal y un dominio transmembranal (Figura 3). Los dominios de residuos de cisteína son perfectamente conservados tanto en α SG como en ε SGG. El lado carboxilo terminal se encuentra a nivel citoplasmático. Presenta nueve exones al igual que α SG. Se ha observado que ε SG disminuye su expresión en ratones *mdx* (deficientes de distrofina) (McNally et al., 1998), pero al parecer se mantiene su expresión en deficiencia primaria de α y γ SG (Chan et al., 1998). Se ha observado que mutaciones en el gen de ε -sarcoglicano causa tortícolis y calambres, algunos pacientes muestran anomalías psiquiátricas que incluyen ataques de pánico y desarrollan actitud obsesiva compulsiva (Zimprich et al, 2001).

ζ SG ha sido recientemente identificado y aún no se conoce mucho a cerca de él, se sabe que se expresa en músculo esquelético, cardíaco y liso vascular (Wheeler

2002) siendo un componente integral del complejo de sarcoglicanos por lo que se le atribuye un papel importante en la patogénesis de las distrofias musculares (Matthew et al, 2002).

1.3.2- Disferlinopatías

Las disferlinopatías expresan tres fenotipos distintos que se diferencian por la distribución de la debilidad, una presentación proximal (LGMD 2B), una distal posterior como la miopatía de Miyoshi (MM) y una miopatía de compartimento distal anterior (DMAT). La primera es menos severa con una aparición tardía en la segunda o tercera década de vida con una lenta progresión de la debilidad proximal de la cintura pélvica y de hombros (Kawabe et. al. 2004). La MM es la más común, la edad de inicio esta entre los 18 y 20 años de edad, se caracteriza por la aparición temprana de la debilidad en los miembros posteriores de las extremidades (Anderson et. al, 1999). La DMAT se diferencia de la MM por la rápida progresión de la debilidad en músculo anterior tibial (Illa et. al, 2001). Aunque disferlina también se expresa en cardiomiocitos, no se presenta disfunción cardíaca.

Las disferlinopatías se presentan por un defecto del gen DYSF que codifica para la proteína disferlina. El gen de disferlina contiene 55 exones que abarcan aproximadamente 150 Kb de DNA genómico que codifican para una proteína de 237 Kd. Disferlina se expresa en músculo esquelético, en corazón y en riñón. Presenta un dominio C-terminal transmembranal y múltiples dominios C2 con sensores de calcio que modulan la fusión de membranas y el transporte de vesículas (Bashir et. al, 1998). En el músculo esquelético disferlina se localiza en el sarcolema y en vesículas citoplásmicas. Se sabe que disferlina participa en la reparación de la

membrana en el músculo esquelético. Recientes estudios sugieren (Dimple and Campbell, 2004) que la reparación de la membrana requiere de la acumulación y fusión de vesículas en el sitio de la disrupción en donde disferlina interactúa con otras proteínas como las anexinas A1 y A2, así como también con otras moléculas desconocidas todavía. Cabe señalar que disferlina no es un componente integral del DGC, sin embargo se ha observado que en algunas LGMDs se altera su distribución, cuando su localización disminuye en membrana plasmática, aumenta en las vesículas citoplásmicas (Piccolo et. al, 2000) lo que sugiere una asociación funcional entre disferlina y el DGC. Se ha encontrado también una interacción directa de disferlina con caveolina-3 (Matsuda et al, 2001).

1.3.3- Caveolinopatías

Las caveolinopatías se presentan por mutaciones en el gen CAV3 que codifica para la proteína caveolina-3 y presentan un modo de herencia autosómica dominante, esta enfermedad se expresa en cuatro fenotipos diferentes, como distrofia muscular de cinturas tipo 1C (LGMD 1C), como enfermedad del músculo ondulado (RMD), como una miopatía distal (DM) y como una hiperkalemia hidiopática (HCK) (Carbone et al, 2000).

Caveolina-3 es una proteína músculo específico y forma parte del grupo de las caveolinas al cual pertenecen las proteínas caveolina 1 y 2. Las caveolinas son proteínas integrales de membrana y presentan un peso de 21-25 Kd. Caveolina -3 se expresa músculo esquelético, diafragma y corazón (Tang et al 1996) mientras que caveolina 1 y 2 se expresan particularmente en adipositos, fibroblastos, endotelio y células epiteliales (Scherer et al, 1997). Caveolina-3 esta asociada con el

complejo de distroglicanos específicamente con el dominio intracelular de β DG. Forma parte de las caveolas que son invaginaciones de la membrana plasmática que van de 50 a 100nm. Las caveolas participan en procesos de transporte de moléculas receptoras y en procesos de transducción de señales (transporte de mensajeros secundarios) (Lisanti et al,1994). Caveolina-3 también organiza y concentra específicamente lípidos y proteínas dentro de los microdominios de la caveola (Engelman et al, 1998).

1.3.4- Teletoninopatías

Las teletoninopatías son originadas por un defecto en el gen que codifica para una proteína sarcomérica llamada teletonina, esta se localiza en las discos Z de los sarcómeros, los sarcómeros son la unidad de contracción del músculo esquelético y cardiaco. Las mutaciones en el gen de teletonina generan la distrofia muscular de cinturas tipo 2G (LGMD 2G) que se manifiesta clínicamente por una marcada atrofia y debilidad en la musculatura distal de las piernas incluyendo las cuatro extremidades proximales, las afecciones cardíacas sólo se observaron en la mitad de los miembros de una familia estudiados por Moreira y colaboradores en el 2000. La edad de inicio de los síntomas va de los 2 a los 15 años.

Teletonina no es una proteína integral del DGC, tiene un peso de 19 Kd y presenta un dominio carboxilo terminal que es fosforilado por la cinasa titina, se ha observado que la ausencia de teletonina no afecta la integridad del sarcómero y que tampoco se ve afectado el DGC por la ausencia de la misma (Mariz et al, 2002).

Distrofias musculares asociadas a proteínas de la membrana nuclear.

1.3.5- Laminopatías

Las laminopatías son enfermedades autosómicas dominantes y se originan por mutaciones en el gen LMNA que codifica para la proteína nuclear lamina A/C en donde su deficiencia origina dos fenotipos diferentes de distrofia muscular, uno de ellos se presenta como distrofia muscular de cinturas tipo 1B (LGMD 1B) y el otro con un fenotipo similar a la distrofia muscular de Emery-Dreifuss (AD-EDMD) (Bonne et al, 1999). El primer caso es una forma rara que presenta miocardiopatía dilatada con defectos en la conducción atrioventricular que normalmente se presentan al inicio de los síntomas musculares y se incrementan con la edad. En el segundo caso los pacientes presentan debilidad progresiva en los músculos que envuelven al húmero y el peroné, presentan también contracturas de tendones y arritmias cardíacas o cardiomiopatía.

1.4- Emerinopatías

Las mutaciones en el gen ubicado en la región Xq28 que codifica para la proteína emerina (Bione et al, 1994), generan la distrofia muscular de Emery-Dreifuss (X-EDMD) que es una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X (Emery y Dreifuss, 1966) clínicamente idéntica a la AD-EDMD.

La LGMD 1B y la AD-EDMD, clínicamente son muy parecidas con X-EDMD. Esa correlación clínica demuestra que lamina A/C, emerina y otras proteínas integrales de la membrana nuclear forman una red interna que dan soporte a la misma durante el

estrés causado por la contracción muscular (Sakaki et al, 2001. Stuurmann et al, 1998).

El cDNA de humano de emerina abarca 2.1 kb , contiene 6 exones y codifica para una proteína de 34 Kd que presenta 254 aminoácidos ((Bione et al, 1995).

DISTROFIAS MUSCULARES CONGÉNITAS

1.5-Merosinopatías

Las merosinopatías se presentan por la mutación en el gen que codifica para la proteína merosina (α -2-laminina), la deficiencia de esta proteína es responsable de la distrofia muscular congénita tipo 1A (MDC 1A) que representa mas de una tercera parte de las distrofias musculares congénitas (Dubowitz et al, 1995). Cerca del 50% de los pacientes con distrofia muscular congénita muestran ausencia total o parcial de merosina lo que genera una dramática alteración en la arquitectura molecular de la membrana celular (Helbling et al, 1995).

La ausencia total de merosina causa una profunda hipotonía desde el nacimiento o en los primeros momentos de vida, en algunos casos suele presentarse retraso motor sólo con habilidad para sentarse en los primeros 2 o 3 años de vida inhabilitándose su deambulacion. Algunos niños presentan desmielinización periférica, probablemente por que merosina se expresa en las células de Schwann (Shorer et al, 1995). Más del 30 % de lo pacientes mueren en el primer año de vida por complicaciones cardiopulmonares.

Merosina es una proteína de matriz extracelular, la unión entre α -DG y la lamina basal en el músculo esquelético esta mediada por esta proteína, merosina se une al colágeno VI y a α -DG formando así un puente entre la matriz extracelular y el citoesqueleto de la célula (Campbell, 1995).

2.- JUSTIFICACIÓN

La gran variabilidad clínica y el número de genes involucrados en las distrofias musculares ha dificultado el diagnóstico correcto de estas enfermedades. La DMD/B ha sido la distrofia muscular más estudiada en todo el mundo. En México en particular, la mayoría de los estudios moleculares se habían enfocado en esta forma de distrofia muscular. Anteriormente en nuestro país no se contaba con un estudio clínico-molecular que permitiera el diagnóstico certero de estas enfermedades, actualmente, en el laboratorio de Genética Molecular del Hospital de Pediatría IMSS, se cuenta con el estudio molecular de las distrofias musculares complementado con la exploración clínica del paciente. Esto permitirá comprender mejor la etiopatología de estas enfermedades, así como también, nos ayudará a elegir el mejor tratamiento para el paciente esperando mejorar su calidad de vida. Este estudio también, ayudará a dar el correcto asesoramiento genético tanto al paciente como a la familia puesto que son enfermedades hereditarias. Por otro lado, el estudio de un número representativo de casos permitirá tener datos relacionados a la frecuencia con la cual se presentan estas enfermedades en la población mexicana.

3.- HIPOTESIS

Los pacientes diagnosticados clínicamente con distrofia muscular, tendrán ausencia o deficiencia de las proteínas que se analicen.

4.- OJETIVO GENERAL

Analizar la expresión de proteínas asociadas con distrofias musculares a través de inmunofluorescencia indirecta en biopsias musculares de pacientes con un cuadro clínico distrófico.

5.- OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar mediante inmunofluorescencia indirecta, con anticuerpos específicos, la deficiencia de las proteínas distrofina, disferlina, sarcoglicanos: α , β , γ y δ , caveolina-3, merosina, teletonina, emerina NH3 y lamina A/C.
- Cuantificar a través de Western blot a la proteína Disferlina en pacientes en los que se ha detectado por inmunofluorescencia indirecta disminución, deficiencia o ausencia de esta proteína.

6.- MATERIAL Y MÉTODOS

6.1.- Pacientes.

Se analizaron 31 pacientes diagnosticados clínicamente con distrofia muscular que fueron captados en diferentes hospitales del sector salud como el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS (HP CMN SXXI), Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS (HE CMN SXXI), Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Dr. Manuel Velasco Suárez (INN y N), Instituto Nacional de Rehabilitación (INR), Hospital Infantil de México (HIM), Centro Médico Nacional 20 de Noviembre del ISSSTE (CMN 20 de Noviembre), Centro Médico Nacional La Raza. (CMN La Raza) y Hospital General de México (HGM).

Estos pacientes se registraron y se les asignó un número de acuerdo al orden en que llegaban al laboratorio.

6.2.- Criterios de inclusión

- Cuadro clínico compatible con distrofia muscular.
- Niveles elevados de CPK.
- Biopsia muscular de cuádriceps o deltoides que presente variación en el tamaño de fibras, necrosis y eventualmente reemplazo por grasa y tejido conectivo, según el grado de avance de la miopatía.

- Árbol genealógico que muestre una segregación sugestiva de herencia autosómica recesiva o antecedentes de padres consanguíneos, herencia autosómica dominante o herencia recesiva ligada al X, que constituyen los modelos de herencia conocidos en las distrofias musculares. Aunque se incluyen también los casos aparentemente esporádicos o aislados.

6.3.- Biopsia muscular

Las biopsias se tomaron del cuádriceps o deltoides, aproximadamente de 0.5cm de diámetro por 1cm de longitud. Fueron montadas en la base de un fragmento de corcho con goma de tragacanto, se fijaron con isopentano (2-metil butano SIGMA) y se enfriaron con nitrógeno líquido con una orientación perpendicular al corcho para que las criosecciones mostraran fibras orientadas en forma transversal. Se obtuvieron criosecciones de las diferentes muestras de los pacientes de aproximadamente un grosor de 7-10 micras. Las criosecciones fueron recolectadas en un portaobjetos con poli L Lisina (SIGMA-ALDRICH), se colocaron 2 cortes por pacientes y 4 pacientes por portaobjetos, cada portaobjetos con su correspondiente criosección de músculo control.

Para analizar las características histológicas de cada paciente, antes de montar las criosecciones junto a los demás cortes a utilizar, se tiñeron por separado con Hematoxilina-Eosina (H-E). En esta prueba, se pudieron observar cambios distróficos que se definían por degeneración-regeneración de fibras musculares,

variación en el tamaño de éstas, núcleos centrales, proliferación de tejido conectivo y necrosis celular.

Las biopsias utilizadas para la prueba de Western blot fueron de los pacientes en los que se observó deficiencia de la proteína de interés. Se realizaron 10 cortes de cada paciente de 6 micras y se depositaron dentro de un tubo Eppendorf de 1.5 mL en donde se hizo la extracción de proteínas.

6.4.- Técnicas de inmunofluorescencia

Los cortes transversales de músculo esquelético contenidos en los portaobjetos, se bloquearon durante 30min con albúmina sérica bovina al 5%(BSA) (RESEARCH ORGANICS) preparada en un buffer salino de fosfato al 1X (PBS), se incubaron con los diferentes anticuerpos primarios toda la noche entre 12 y 18 horas a 4 °C. Se realizaron 3 lavados de 5min con PBS 1X, posteriormente se incubó durante 1 hora con el anticuerpo secundario, nuevamente se lavaron 3 veces por 5min con PBS 1X. Finalmente se les adicionó Vectashield-DAPI (VECTOR LABORATORIES) para preservar las laminillas y al mismo tiempo poder observar los núcleos de las fibras musculares debido a la fluorescencia azul que presenta el DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol) a una longitud de onda de 365nm. Las laminillas fueron analizadas en el microscopio de fluorescencia (ZEISS, Axio Visión 4.4).

6.4.1.- Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados fueron hechos en ratón dirigidos contra las proteínas humanas distrofina C-terminal (1:200 PBS)(Dys 2, Novocastra), distrofina N-terminal (1:200 PBS) (Dys 3, Novocastra), α -sarcoglicano (1:200 PBS)(Novocastra), β -sarcoglicano (1:200PBS) (Novocastra), γ -sarcoglicano (1:200 PBS) (Novocastra), δ -sarcoglicano (1:200 PBS) (Novocastra), disferlina C-terminal (1:150 BSA 5%) (H1, Novocastra), disferlina N-terminal (1:150 BSA 5%) (H2, Novocastra), caveolina-3 (1:150 BSA 5%) (Santa Cruz), merosina o α -2-laminina (1:5000 PBS) (Chemicon), Emerina N-terminal (1:300 BSA 1%) (Neo Markers), lamina A/C C-terminal (1:50 BSA 1%) (Santa Cruz Biotechnology, monoclonal) y dos anticuerpos primarios hechos en cabra dirigidos contra las proteínas: lamina A/C N-terminal (1:50 PBS) (Santa Cruz Biotechnology, policlonal) y teletonina (1:100 PBS) (Santa Cruz Biotechnology, policlonal) de humano.

Por ende se utilizaron dos tipos de anticuerpos secundarios, uno hecho en cabra que reconocía a los anticuerpos primarios hechos en ratón (Jackson), y uno más hecho en ratón (Jackson) que reconocía a los anticuerpos primarios hechos en cabra. Ambos anticuerpos tenían ligado al fluorocromo Cy3 (cianina 3) que emite una fluorescencia roja a una longitud de onda de 510nm.

6.5.- Técnica de Western blot

6.5.1.- Extracción de proteínas.

Los 10 cortes de 6 micras obtenidos en el criostato fueron depositados en un tubo Eppendorf de 1.5mL, se les adicionó 30 μ L de buffer de extracción de proteínas pH 6.8 (125mM Tris-HCl, 4% de dodecil sulfato de sodio, 4M de urea, 5% de 2-mercaptohetanol, 10 % de glicerol y 0.0025% de azul de bromofenol), posteriormente las muestras se sonicaron y se incubaron durante 3min a 100°C, se centrifugaron a 14000rpm durante 5min y se recuperó el sobrenadante.

6.5.2.- Separación electroforética de las proteínas.

La separación de las proteínas se realizó en un gel de acrilamida (bis-acrilamida al 30.8%, buffer de corrida, agua desionizada, glicerol, persulfato y TEDMED) con un gradiente de concentración que iba del 5 a 10 % con un gel concentrador al 3%. Se depositaron 14 μ L de la muestra por pozo dejando correr el gel toda la noche a 5mA a 4°C.

Sí el gel se hace por duplicado, uno de ellos se tiñe con azul de cumazie para confirmar la integridad y separación de proteínas.

6.5.3.- Transferencia de las proteínas.

Una vez separadas las proteínas se prosiguió a hacer la transferencia de las mismas a una membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL, amersham pharmacia bistec,

Germany) a 300mA durante 2 horas y media, se tiñó con Rojo Ponceau para verificar la transferencia de las mismas.

6.5.4.- Identificación de las proteínas.

Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con leche descremada al 5 % (Svelty, Nestle) en TBS-Tween 20 al 0.3 % (NaCl 137mM, KCl 2.7mM, Na₂HPO₄·7H₂O 4.3mM, KH₂HPO₄ 1.4mM) durante 1 hora a 37°C en agitación, se incubaron con el anticuerpo primario contra disferlina C-terminal (1:500 TBS-Tween 20) toda la noche y con agitación a 4°C. Se lavaron 6 veces por 5min con TBS-Tween 20 y con agitación a temperatura ambiente, a continuación se incubaron con el anticuerpo secundario (1:5000 TBS-Twin 20%) durante 1 hora. Dicho anticuerpo ligado a la enzima peroxidasa. Nuevamente las membranas se lavaron 6 veces por 5min con TBS-Tween 20 con agitación a temperatura ambiente y se adicionó el reactivo quimiolumincente (Luminol-Peróxido en relación 1 a 1 en volumen) (SuperSignal^R, PIERCE), finalmente se expusieron sobre las membranas tiras de placas para revelado (KODAK, BioMax Light Film) en las cuales, después de 30 segundos de exposición, se pudieron observar las bandas correspondientes al peso de la proteína.

Para normalizar la carga de proteínas se utilizó como marcador la cadena pesada de miosina utilizando para ello el anticuerpo MHC (H-300) (1:500 TBS-Twin20%) (Santa Cruz Biotechnology).

6.5.5.- Cuantificación de las proteínas.

La cuantificación de la proteína se realizó en el analizador de imágenes (Alphalmage Light Cabinet. Alpha Ease^R FC Software, Versión 4.1), en el cual se analizó la relación entre las áreas de la mancha correspondiente a la proteína de interés (disferlina) y la mancha de la proteína normalizante (cadena pesada de miosina), finalmente se hizo la comparación entre el valor arrojado por el control frente a los valores de cada paciente.

7.- RESULTADOS

Se estudiaron 31 pacientes (Tablas 2 y 3) diagnosticados clínicamente con distrofia muscular . De este grupo de pacientes, 21 fueron hombres y 10 mujeres, 15 de ellos están dentro de la edad pediátrica (0-15 años) mientras que 10 de ellos eran adultos. En 5 de los casos no fue posible saber la edad. En cuanto al rango de edad de los pacientes, se encuentran entre 1 y los 54 años así como su edad de inicio de los síntomas va de entre los 8 meses y los 36 años y medio. En la mayoría de los casos los niveles de CPK están por encima de los niveles normales (0-190 UI/L). Doce de estos pacientes fueron referidos clínicamente sólo como distrofia muscular en 5 de los casos se concluyó DMD/B, mientras que en 4 pacientes el cuadro clínico permitió sugerir una LGMD (Tablas 2 y 3).

7.1.- Grupo de estudio.

TABLA 2. Datos clínicos del grupo de estudio

#	Edad	Sexo	Edad de inicio	Diagnóstico probable	CPK UI/L	Procedencia
174	7 años	M	2 años	Distrofia muscular Duchenne	15210	INR
175	8a 10m	M	5 años	Distrofia muscular Duchenne	11808	HP CMN SXXI
183	7 años	M	5 años	Distrofia Muscular	11708	HIM
184	7 años	M	2 a 6m	Distrofia muscular Duchenne	Alato	CMN La Raza
188	14 años	F		Distrofia Muscular		CMN SXXI
189	9 años	M	1 a 6m	Distrofia Muscular	7695	INR
190	1 año	M		Distrofia Muscular		CMN La Raza
191	15 años	M	11 años	Distrofia Muscular		HP CMN SXXI
192	13 años	M	11 años	Distrofia muscular	3058	INR
193	33 años	F	12 años	Distrofia muscular	2089	INR
194	11 años	F	5a 6m	Distrofia muscular de cinturas		CMN 20 de Noviembre
195		F		Distrofia Muscular		CMN SXXI
200	25 años	F	21 años	Distrofia Muscular	4095	HGM
202	36 años	M	35a 6m	Distrofia Muscular		INNN
203	21 años	M	10 años	Distrofia muscular Duchenne	1495	INNN
204	37 años	F	20 años	Distrofia Muscular de Cinturas	2585	INNN

: número de registro en el laboratorio; M: masculino; F: femenino; CPK: creatinfosfocinasa.

TABLA 3. Datos clínicos del grupo de estudio

#	Edad	Sexo	Edad de inicio	Diagnóstico probable	CPK UI/L	Procedencia
205	54 años	F	18 años	Distrofia Muscular de Cinturas	196	INNN
206	36 años	M	32 años	Distrofia Muscular		HE CMN SXXI
207	3 años	M	2 años	Distrofia Muscular	Normal	HE CMN SXXI
208	6años	F	2 años	Distrofia Muscular	Normal	CMN SXII
209	4 a 6m	M	2 años	Distrofia Muscular		CMN SXXI
210	6 años	M	4 años	Distrofia muscular Duchenne		CMN SXXI
211	7 años	M	4 años	Distrofia Muscular	196	CMN / INNN
216	4 a 11m	M	8 meses	Distrofia Muscular	Alato	CMN La Raza
217	22 años	M	17 años	Distrofia Muscular	11595	INNN
218	9 a 8 m	M	2 años	Distrofia Muscular	Alato	
219	9 años	F	8 años	Distrofia Muscular de Cinturas	30000	CMN La Raza
220	13 años	M	11 años	Distrofia Muscular	Normal	CMN SXXI
221		F		Distrofia Muscular		INNN
222	31 años	M	6 años	Distrofia Muscular		INNN
223	16 años	M	13 años	Distrofia Muscular	4307	INNN

: número de registro en el laboratorio; M: masculino; F: femenino; CPK: creatinfosfocinasa.

TABLA 5. Resultados del análisis por inmunofluorescencia indirecta

#	Dys2	Dys3	α	β	γ	δ	H2	H2	Caveolina3	Merosina	Teletonina	Emerina NH3	Lamina A/C COOH	Lamina A/C NH3
174	++	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
175	---	---	+++	+++	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
183	---	---	+++	+++	+	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
184	---	---	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
188	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
189	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
190	---	---	++	++	++	++	+++	---	+++	+++	+++	+++	+++	+++
191	+++	+++	+++	+++	+++	++	---	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
192	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
193	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
194	++	++	---	+	+	+	+/-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
195	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
200	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---	---	+++	+++	+++	+++	+++	+++
202	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
203	++	+	+++	+++	+++	+++	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
204	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---	---	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Inmunofluorescencia indirecta de 16 pacientes en los cuales se puede observar el grado de deficiencia de la proteína afectada. En los casos 174, 175, 183, 184, 189 y 203 la deficiencia principal se observa en distrofina. En el paciente 194 la deficiencia principal se observa en α -sarcoglicano. En los paciente 191, 195, 200, 2002 y 204 la deficiencia principal se da en disferlina. El 188, 192, 193 y 195 están normal todas las proteínas analizadas. Interpretación de resultados: (+++) normal, (++) deficiente, (+) muy deficiente y (---) negativo.

TABLA 5. Resultados del análisis por inmunofluorescencia indirecta

#	Dys2	Dys3	α	β	γ	δ	H1	H2	Caveolina3	Merosina	Teletonina	Emerina NH3	Lamina A/C COOH	Lamina A/C NH3
205	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
206	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+/-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
207	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
208	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
209	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
210	---	---	++	++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
211	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
216	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
217	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
218	+	+	+++	+++	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
219	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
220	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
221	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
222	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
223	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Inmunofluorescencia indirecta de 15 pacientes en los cuales se puede observar el grado de deficiencia de la proteína afectada. En los casos 210, 218 y 223 la deficiencia principal se observa en distrofina. En los paciente 205, 206 y 211 la deficiencia principal se da en disferlina. El 207, 208, 209, 216, 217, 219, 220, 221 y 222 se encuentran normal todas las proteínas analizadas. El análisis se hizo por duplicado para corroborar los resultados. Interpretación de resultados: (+++) normal, (++) deficiente, (+) muy deficiente y (---) negativo.

Se encontró que 5 pacientes masculinos (175, 183, 184, 190 y 210) dieron una inmunotinción negativa para distrofina, tanto en el lado carboxilo como en el lado amino de la proteína característico en la DMD (Tabla 4 y 5. Interesantemente, en todos los casos se encontró deficiencia secundaria de al menos en uno de los sarcoglicanos (Tablas 4 y 5). Un caso representativo de lo anterior se ejemplifica en las imágenes de las inmunofluorescencias del músculo del individuo 210 (figura 5), las cuales muestran la deficiencia total de distrofina con reducción secundaria de todos los sarcoglicanos. Este paciente es una persona de sexo masculino de 6 años de edad, producto de la segunda gestación, que inicia con los síntomas a los 4 años con caídas frecuentes y dificultad para correr y subir escaleras. Presenta hipertrofia de gemelos y niveles elevados de CPK. Signo de Gowers positivo diagnosticado clínicamente con DMD. De estos cinco pacientes tres fueron diagnosticados con DMD. La edad de estos pacientes oscila entre los 6 y 10 años con una edad de inicio de los síntomas entre 2 y 5 años, los músculos afectados principalmente son los de las extremidades inferiores y superiores, en todos los casos los niveles de CPK son muy elevados y presentan signo de Gowers positivo.

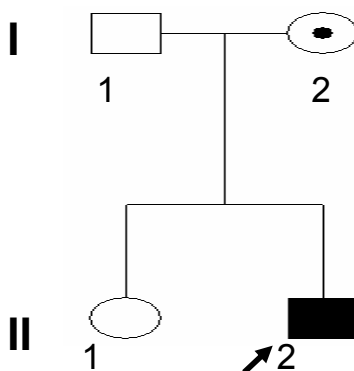


Figura 4. Árbol genealógico del paciente 210 (II-2) con DMD. Seguramente la madre (I-2) es portadora, y la hermana (II-1) tiene el 50 % de probabilidad de ser portadora también.

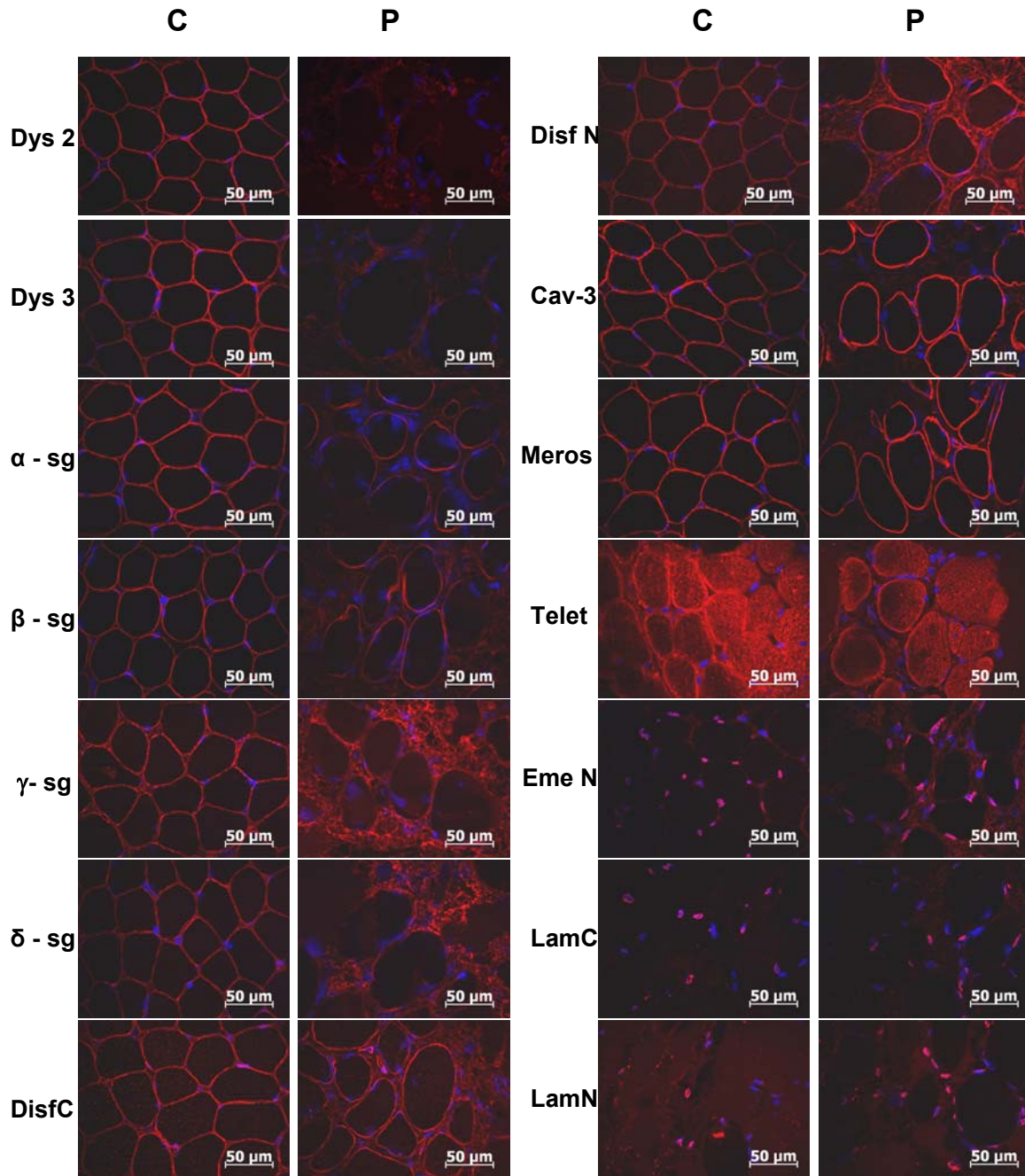


Figura 5. Inmunohistoquímica del paciente 210. En este panel de inmunofluorescencias el paciente 210 se muestra negativo (---) en ambos lados de Distrofina, deficiente (++) para α y β sarcoglicanos, muy deficiente (+) para γ y δ SG, resto normal. Se observa un ligero aumento en expresión de Caveolina-3 lo cual esta reportado para pacientes deficientes de distrofina. Dys2 (Distrofina COOH), Dys3 (Distrofina NH₃), α -sg (α -sarcoglicano), β -sg (β -sarcoglicano), γ -sg (γ -sarcoglicano), δ -sg (δ -sarcoglicano), DisfC (Disferlina COOH), DisfN (Disferlina NH₃), Cav-3 (Caveolina-3), Meros (Merosina), Telet (Teletonina), Eme N (Emerina NH₃), LamC (Lamina A/C COOH) y LamN (Lamina A/C NH₃). C (músculo control). P (músculo del paciente).

En 5 pacientes de los 31 analizados (174, 189, 203, 218 y 223) se encontró una deficiencia en la expresión de distrofina ya sea en el lado carboxilo, en el lado amino o por ambos lados (característico en la DMB la cual es menos severa que DMD), los 5 pacientes son del sexo masculino. Solo en 2 de los casos (174 y 218) se encontró deficiencia secundaria en alguno de los sarcoglicanos (Tablas 4 y 5). De estos 5 pacientes, 2 fueron diagnosticados como DMD y 3 solo como distrofias. Estos pacientes presentan una edad de entre los 7 y 21 años con una edad de inicio de los síntomas entre los 18 meses y 10 años, la musculatura afectada al igual que en el caso anterior son los músculos de las extremidades superiores e inferiores. Niveles de CPK elevados y Gowers (+).

En la figura 7 se muestran las imágenes de las inmunofluorescencias del músculo del paciente 218 el cual es un caso representativo de DMB, este individuo presenta deficiencia parcial de distrofina con reducción secundaria en algunos sarcoglicanos. Es un varón de 9 años 8 meses de edad y diagnóstico clínico de distrofia, el inicio de los síntomas se dio a los 2 años.

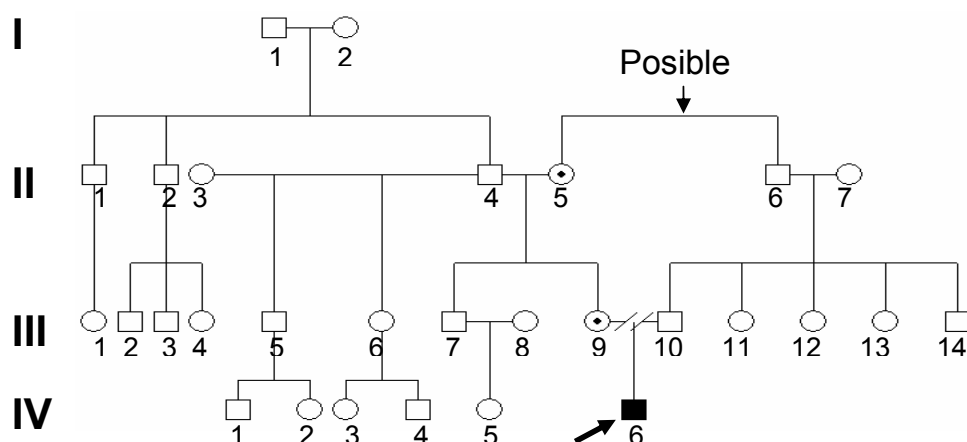


Figura 6. Árbol genealógico del paciente 218 (IV-6) con DMB. II-2 y III-9 portadoras obligadas. II-5 presenta debilidad muscular y mialgias.

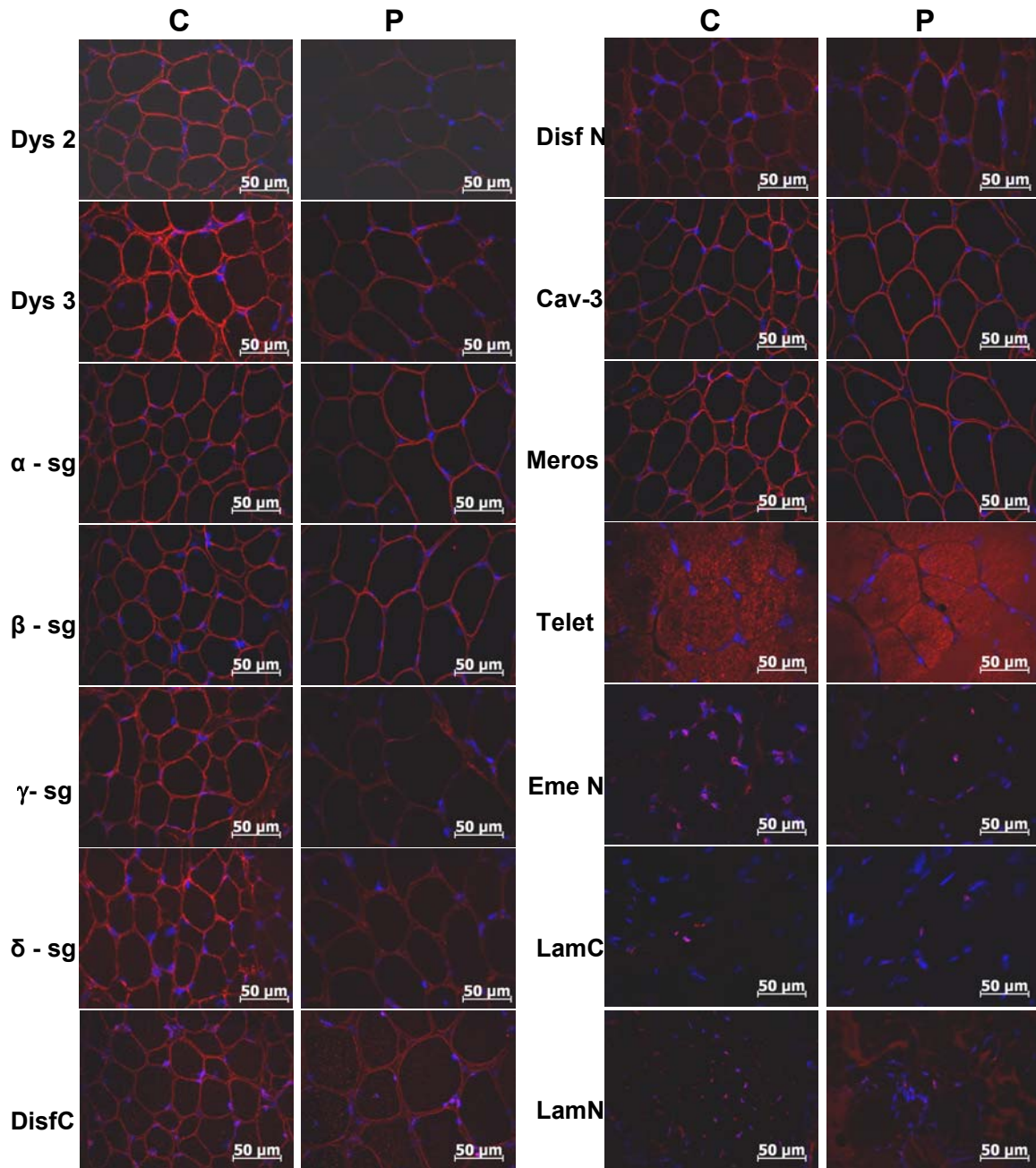


Figura 7. Inmunohistoquímica del paciente 218. En estas inmunofluorescencias el paciente 218 se observa muy deficiente (+) en ambos lados de Distrofina y deficiente (++) en γ y δ SG. El resto de las proteínas analizadas se encuentran en una expresión normal. Dys2 (Distrofina COOH), Dys3 (Distrofina NH₃), α -sg (α -sarcoglicano), β -sg (β -sarcoglicano), γ -sg (γ -sarcoglicano), δ -sg (δ -sarcoglicano), DisfC (Disferlina COOH), DisfN (Disferlina NH₃), Cav-3 (Caveolina-3), Meros (Merosina), Telet (Teletonina), Eme N (Emerina NH₃), LamC (Lamina A/C COOH) y LamN (Lamina A/C NH₃). C (músculo control). P (músculo del paciente).

Se diagnosticó un paciente negativo (---) en α sarcoglicano , con una expresión muy deficiente (+) en sarcoglicanos β , γ , δ y parte COOH de disferlina y con deficiencia (++) en ambos lados de Distrofina y lado NH₃ de disferlina (Figura 9). Es una paciente femenina de 11 años de edad (194) quién inició los síntomas a los 5 años y medio con caídas repentinas al ir caminando. A los 3 meses se observó deformidad de la columna dorso-lumbar. No puede incorporarse sola, presenta atrofia muscular en forma progresiva en brazos, cintura escapular, cintura pélvica, muslos y piernas en forma bilateral. Tiene secuelas de rubéola congénita consistente en catarata de ojo izquierdo. Sordera en oído derecho e hipoacusia del izquierdo. Presenta soplo cardiaco y retraso psicomotor. Es el producto de la tercera gestación de 4, el pedigree (Figura 8) muestra que no hay consanguinidad entre los padres.

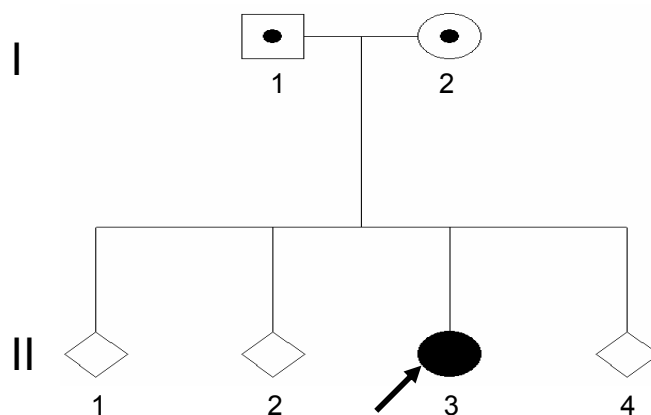


Figura 8. Árbol genealógico del paciente 194 (II-3) con LGMD (Deficiencia de alfa sarcoglicano). Por tener un modo de herencia autosómico recesivo ambos padres (I-1 y I-2) deben ser portadores obligados. II-1, II-2 y II-4 tienen un 25% de probabilidad de ser portadores de la mutación.

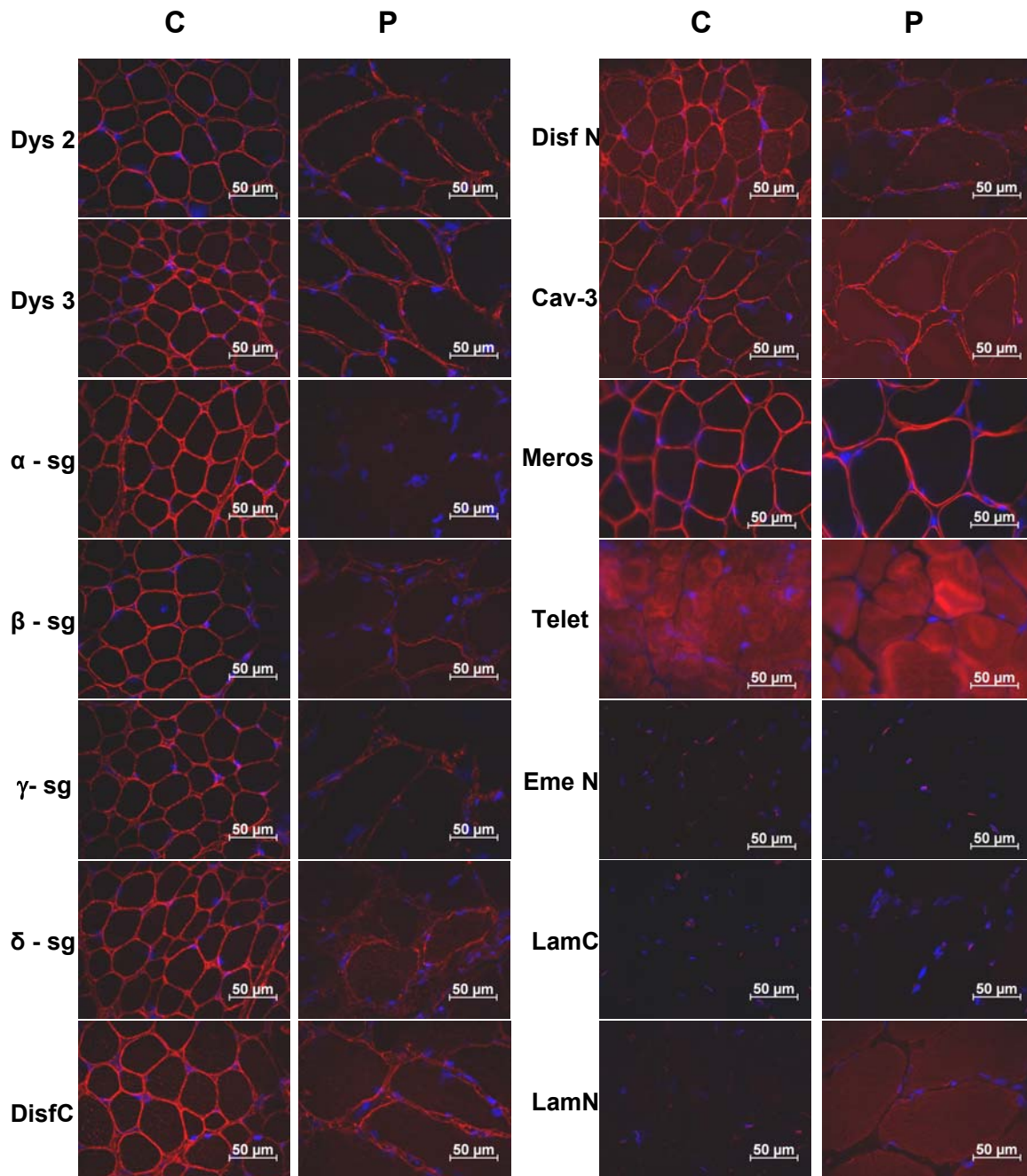


Figura 9. Inmunohistoquímica del paciente 194. La inmunofluorescencia muestra ausencia total (---) de α sarcoglicano, y una expresión muy deficiente (+) de los sarcoglicanos β , γ , δ y parte COOH de disferlina y con deficiencia (++) en ambos lados de Distrofina y lado NH₃ de disferlina. El resto de las proteínas analizadas se encuentran en una expresión normal. Dys2 (Distrofina COOH), Dys3 (Distrofina NH₃), α -sg (α -sarcoglicano), β -sg (β -sarcoglicano), γ -sg (γ -sarcoglicano), δ -sg (δ -sarcoglicano), DisfC (Disferlina COOH), DisfN (Disferlina NH₃), Cav-3 (Caveolina-3), Meros (Merosina), Telet (Teletonina), Eme N (Emerina NH₃), LamC (Lamina A/C COOH) y LamN (Lamina A/C NH₃). C (músculo control). P (músculo del paciente).

Se encontraron 8 pacientes con deficiencia primaria de disferlina, 2 paciente (200 y 204) nulo para la proteína tanto en la parte carboxilo como en la parte amino, 6 pacientes (191, 195, 202, 205, 206 y 211) con deficiencia de disferlina por uno o ambos lados de la proteína. El intervalo de edad de estos pacientes va desde 7 hasta 54 años y una edad de inicio de entre 4 y 20 años, la debilidad muscular se observó principalmente en las cinturas de las 4 extremidades proximales, debilidad distal de los miembros superiores y niveles de CPK elevados.

En la figura 11 se muestra un panel representativo de una paciente con disferlinopatía en donde las inmunofluorescencias del músculo se muestran negativas para la proteína disferlina tanto del lado carboxilo (COOH) como del lado amino (NH₃). Es una paciente femenina de 37 años de edad diagnosticada clínicamente con distrofia muscular de cinturas. La edad de inicio de los síntomas se dió a los 20 años con dolor muscular. Actualmente presenta debilidad muscular en cinturas de las 4 extremidades, limitaciones para la deambulaci3n y dificultad para subir escaleras e incluso para peinarse. Signo de Gowers (+). Sus niveles de CPK son de 2585 UI/L.

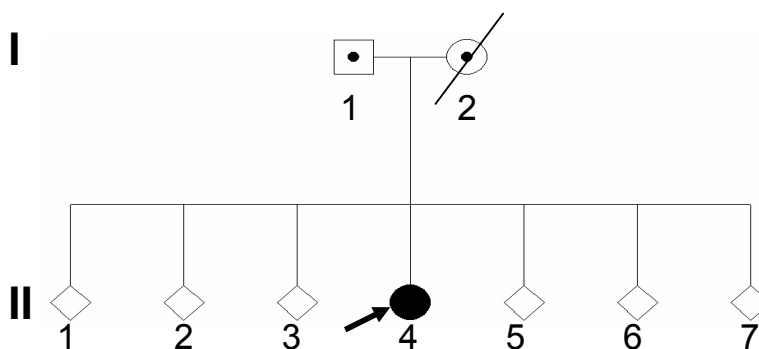


Figura 10. Árbol genealógico del paciente 204 (II-4). El padre (I-1) presente ligera debilidad muscular. Debido a que las disferlinopatías son enfermedades autosómicas recesivas, I-1 I-2 son portadores obligados. II-1, II-2, II-3, II-5, II-6 y II-7 tienen un 50 % de probabilidad de ser portadores y un 25 % de estar afectados.

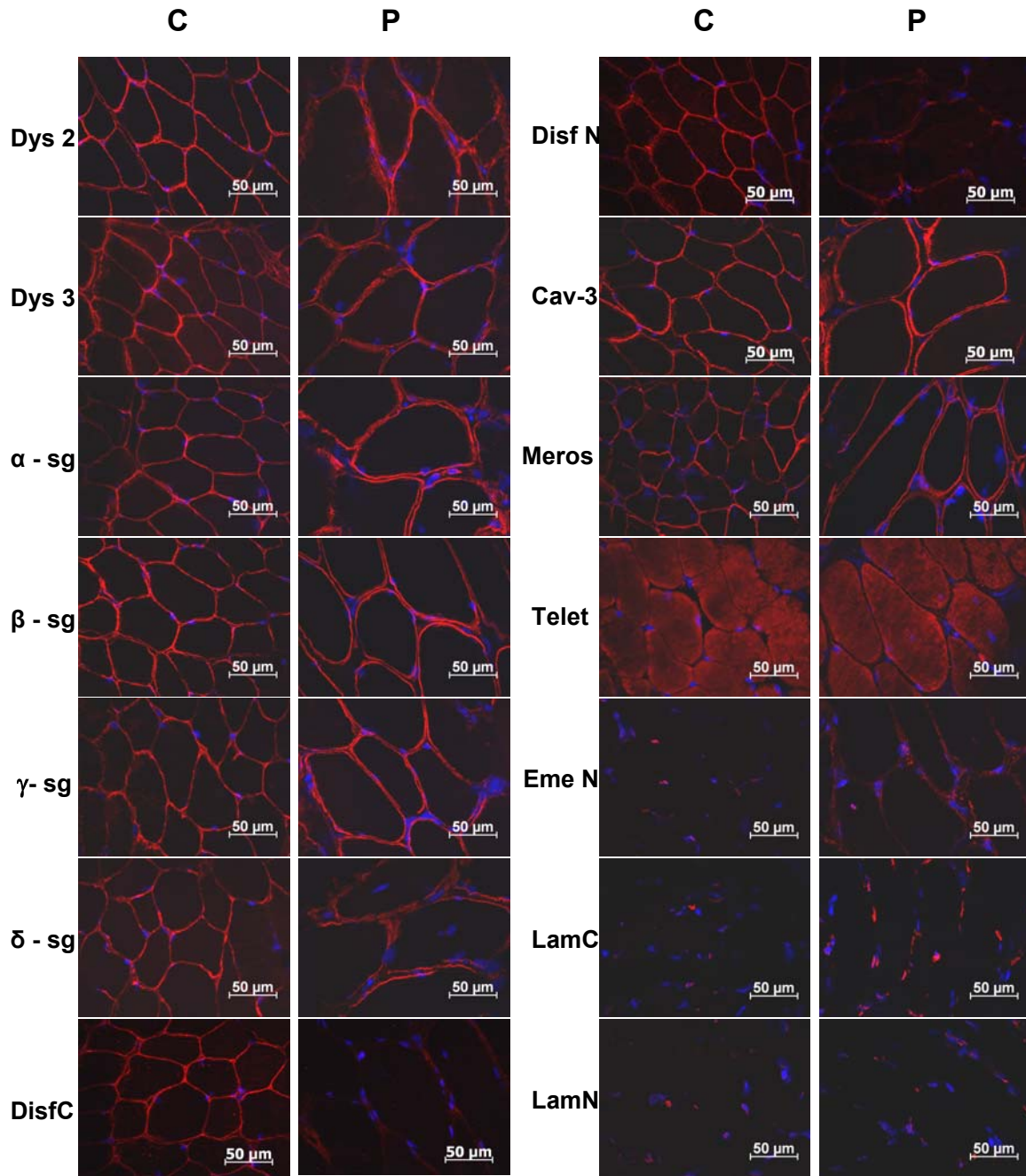


Figura 11. Inmunohistoquímica del paciente 204. Inmunofluorescencia negativa (---) para la proteína disferlina tanto del lado carboxilo (COOH) como del lado amino (NH₃). El resto de las proteínas analizadas se encuentran en una expresión normal. Dys2 (Distrofina COOH), Dys3 (Distrofina NH₃), α-sg (α-sarcoglicano), β-sg (β-sarcoglicano), γ-sg (γ-sarcoglicano), δ-sg (δ-sarcoglicano), DisfC (Disferlina COOH), DisfN (Disferlina NH₃), Cav-3 (Caveolina-3), Meros (Merosina), Telet (Teletonina), Eme N (Emerina NH₃), LamC (Lamina A/C COOH) y LamN (Lamina A/C NH₃). C (músculo control). P (músculo del paciente).

Se encontraron también pacientes nulos o deficientes en Distrofina con una disminución secundaria en Disferlina 183, 190 y 203 (Tablas 1 y 2). El intervalo de edad de estos pacientes va desde 1 hasta 21 años y una edad de inicio de entre 1 y 10 años, principalmente las extremidades inferiores son las más afectadas, presentan niveles elevados de CPK y signo de Gowers positivo.

En la figura 13 se presentan las inmunofluorescencias del músculo del paciente 203 (masculino) que muestra una reducción secundaria de disferlina debido a la deficiencia de distrofina. Es un paciente de 21 años diagnosticado clínicamente con DMD, el inicio de los síntomas se dio a los 10 años, presenta debilidad extrema en extremidades inferiores, fatiga después de realizar un esfuerzo físico, niveles de CPK de 1495 UI/L, signo de Gowers (+) y el estudio de electromiografía es concluyente de Miopatía.

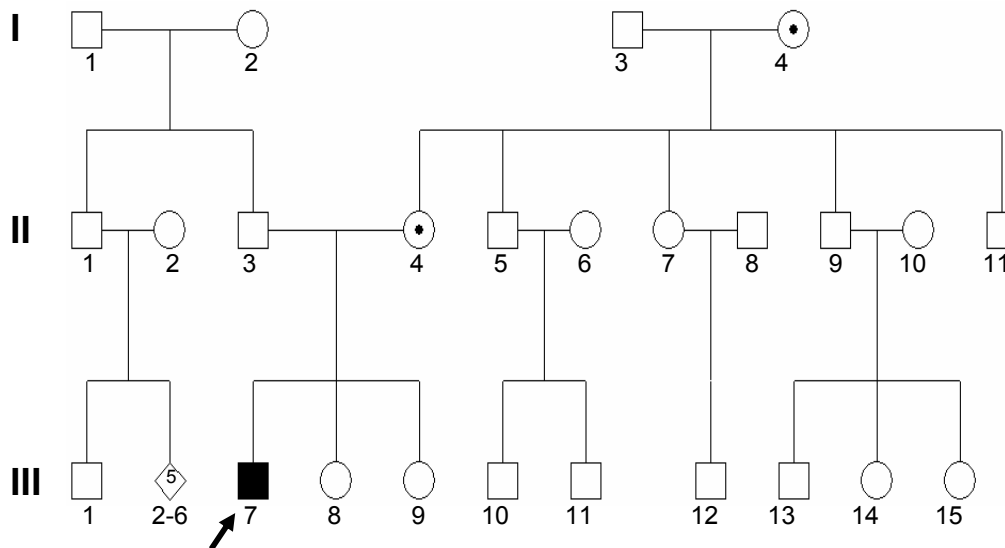


Figura 12. Árbol genealógico del paciente 203 (III-7). Dado la proteína afectada, podemos decir que I-4 y II-4 son portadoras obligadas y que II-7, III-8 y III-9 tienen un 50 % de probabilidad de ser portadoras. Cabe señalar que II-4 no puede ponerse de pie cuando está en cuclillas.

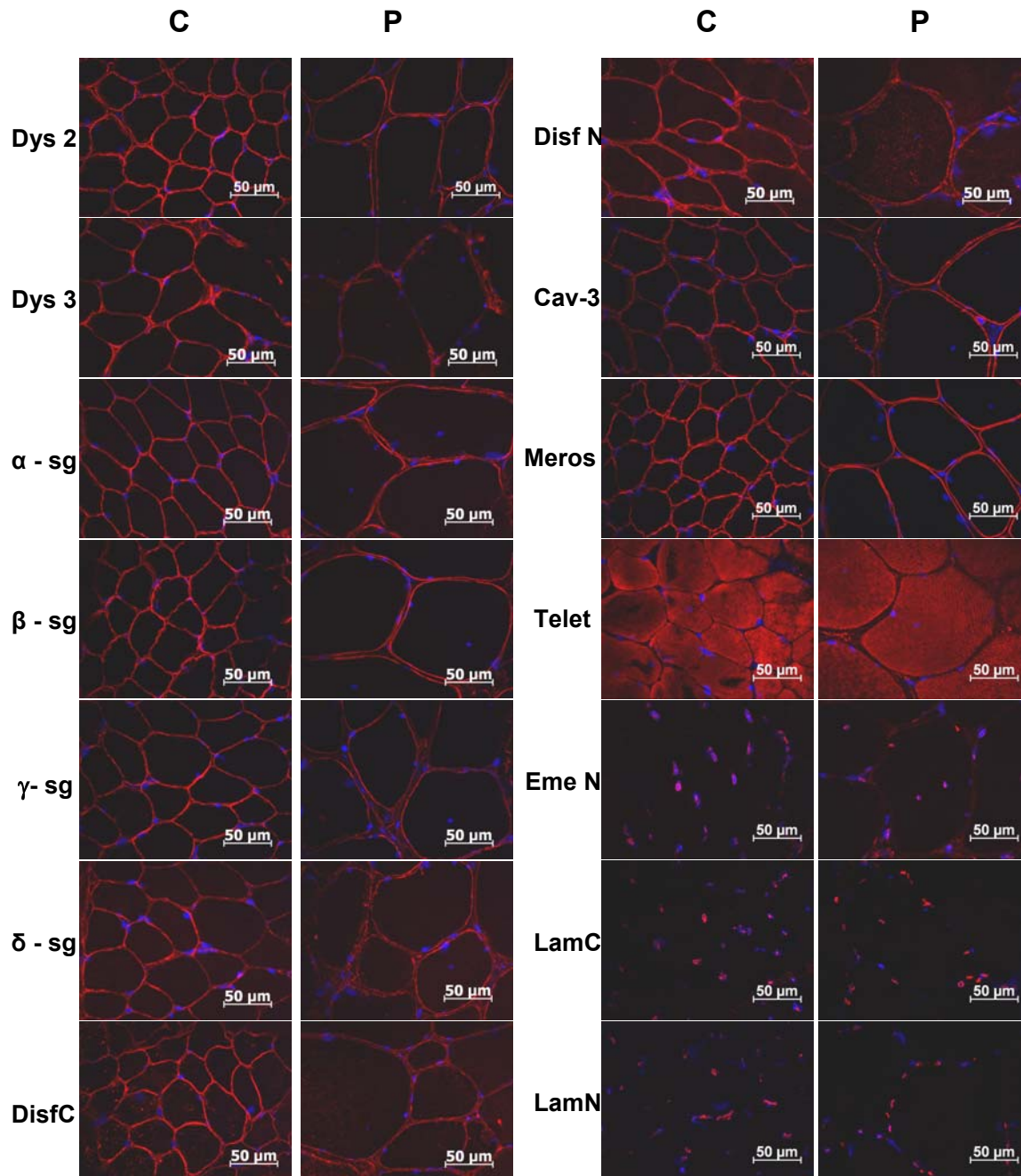
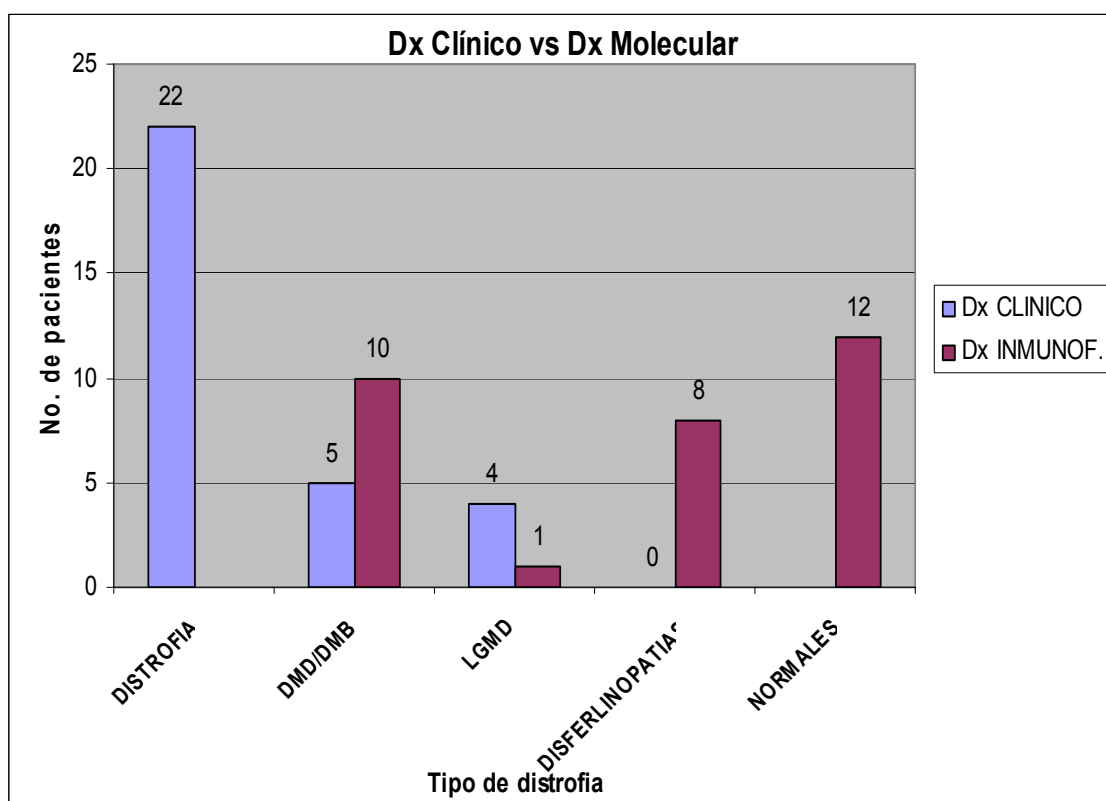


Figura 13. Inmunohistoquímica del paciente 203. En este panel de inmunofluorescencias se muestra deficiencia (++) en la parte carboxilo de distrofina y la parte amino de disferlina, así como también se encuentran muy deficientes (+) la parte amino de distrofina y el lado corboxilo de disferlina. El resto de las proteínas analizadas se encuentran en una expresión normal. Dys2 (Distrofina COOH), Dys3 (Distrofina NH₃), α-sg (α-sarcoglicano), β-sg (β-sarcoglicano), γ-sg (γ-sarcoglicano), δ-sg (δ-sarcoglicano), DisfC (Disferlina COOH), DisfN (Disferlina NH₃), Cav-3 (Caveolina-3), Meros (Merosina), Telet (Teletonina), Eme N (Emerina NH₃), LamC (Lamina A/C COOH) y LamN (Lamina A/C NH₃). C (músculo control). P (músculo del paciente).

La variabilidad clínica que presentaban los pacientes hace muy difícil el diagnóstico clínico correcto, el análisis por inmunofluorescencia nos permitió clasificar de una forma más certera a cada uno de los pacientes analizados.

Se puede observar que en la mayoría de los casos el diagnóstico molecular difiere del diagnóstico clínico que se realizó en base al fenotipo que presenta el paciente (Gráfica 1). De esta forma, al determinar la proteína afectada, nos permite clasificar correctamente al paciente y nos ayuda a comprender la fisiopatología de la enfermedad.



Gráfica 1. Diagnóstico clínico vs diagnóstico molecular. El análisis por inmunofluorescencia permitió hacer una clasificación certera de los pacientes analizados, de un total de 31 pacientes se encontraron 10 pacientes con DMD/DMB, 1 con LGMD, 8 clasificados con disferlinopatía y 12 de ellos no tenían ninguna alteración en las proteínas analizadas.

De los 31 pacientes analizados en este trabajo, en 8 de ellos se encontró una deficiencia total o parcial de Disferlina, lo cual nos llama la atención ya que es un porcentaje muy alto de acuerdo al número de pacientes estudiados.

Del año 2000 al 2005 a nuestro laboratorio se han canalizado 44 pacientes con un diagnóstico clínico de distrofia muscular de cinturas, dentro de este grupo, se encuentran las distrofias generadas por la deficiencia en disferlina la cual genera las distrofias musculares de cintura tipo 2B (LGMD2B) y la miopatía de Miyoshi.

TABLA 6. Resultado del diagnóstico por inmunofluorescencia de disferlina en 16 pacientes.

No.	Procedencia	Resultado de la inmunofluorescencia
57	INNN	Disfer ---
75	INNN	Disfer ++
77	CMN	Disfer ++
125	INNN	Disfer ---
126	INNN	Disfer ---
128	INNN	Disfer ---
152	INR	Disfer ++
165	INR	Disfer ++
191	HP CMN	Disfer ---
195	CMN	Disfer ++
200	INNN	Disfer ---
202	INNN	Disfer ++
204	INNN	Disfer ---
205	INNN	Disfer +
206	HE CMN	Disfer ++
211	CMN/INNN	Disfer ++

Resultados obtenidos durante 6 años en el laboratorio de genética humana del HP CMN SXXI (entre el 2000 y 2005). La columna uno muestra número de registro asignado al paciente, en columna dos se indica el lugar de donde es referido el paciente para el estudio y en la columna tres se muestra el resultado obtenido en la inmunofluorescencia.

De los 44 pacientes diagnosticados clínicamente con LGMD, por inmunofluorescencia se encontró que en 16 de ellos la proteína disferlina se encuentra ausente o deficiente y que en ocasiones (191) también se ve afectado algún sarcoglicano como efecto secundario de la deficiencia de esta proteína.

En relación a lo anterior, en la figura 14 se muestra el resultado del análisis por inmunofluorescencia de los pacientes (191, 195, 200, 202, 204, 205, 206 y 211) que mostraron deficiencia o disminución total en el lado carboxilo de la proteína disferlina. Sin embargo en algunos casos se logra observar una redistribución de la proteína a nivel citoplasmático (ejemplo paciente 205) la cual es común en pacientes que cursan con un cuadro clínico distrófico especialmente en pacientes con algunos tipos de LGMDs.

Cabe mencionar que en este trabajo se encontraron 8 de los 16 pacientes diagnosticados con disferlinopatía y que posteriormente fueron analizados por Western blot.

Una de las características observadas en los pacientes con disferlinopatía es que presentan el rango de edad más alto de todos los pacientes diagnosticados así como también el rango más amplio en la edad de inicio de los síntomas.

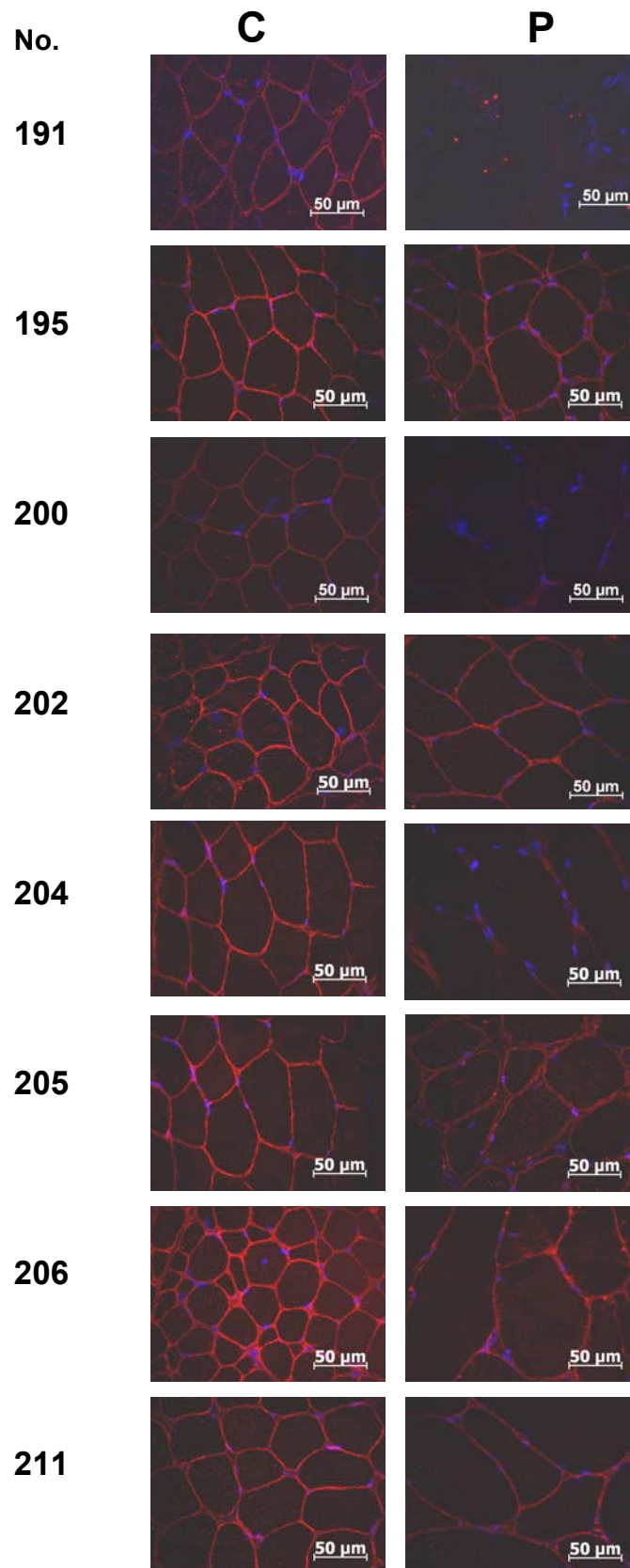


Figura 14. Inmunofluorescencias de pacientes deficientes y nulos de Disferlina. C (control). P (paciente). No. (número del paciente).

Western blot

Debido a los resultados obtenidos en este trabajo y a que en México no se tiene conocimiento de cómo se distribuyen las distrofias musculares originadas por la alteración de disferlina, se decidió hacer una prueba más sensible (western blot) para corroborar el diagnóstico en estos pacientes.

Se utilizó un individuo control para comparar la expresión de la proteína con respecto a los pacientes deficientes de la misma. Así mismo, se cuantificó la Cadena Pesada de Miosina (MHC) como un marcador que nos permitió normalizar la cantidad de proteína utilizada en la prueba. El peso molecular de disferlina es de 237 Kd y el de MHC es de 200 Kd.

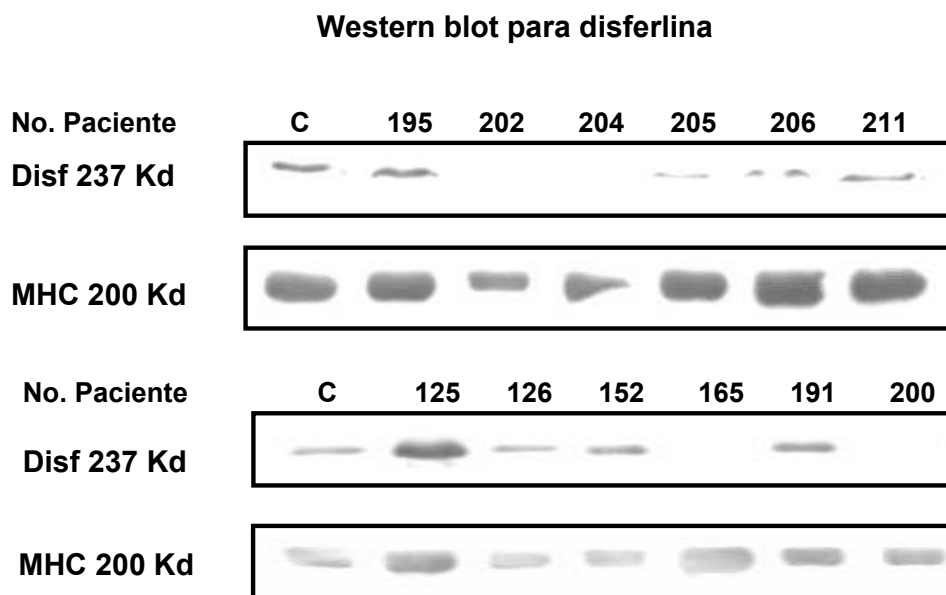


Figura 15.Disf: disferlina; MHC: miosina; C: control; Kd: kilo dalton.

Se analizaron 12 de los 16 pacientes diagnosticados como nulos o deficientes para Disferlina. (Figura 17). En los pacientes 165, 200, 202 y 204 se observó una expresión negativa de la proteína, sin embargo, cabe señalar que en el paciente 202

se observó una ligera sombra en la placa de revelado la cual no se ve en la imagen, esta ligera mancha se detectó en la cuantificación, por lo que, éste paciente se reportó como disminuido y no como negativo para la proteína. Así mismo, en los pacientes 205, 206 y 211 se observó una ligera deficiencia de la proteína. En contraste, los pacientes 125, 126, 152 y 195 se observaron con una expresión normal de disferlina en relación al marcador y al control utilizado, lo cual fue comprobado a la hora de cuantificar a la proteína.

Cuantificación de la proteína

La cuantificación se realizó en el analizador de imágenes en el cual se midió el área bajo la curva de las manchas correspondientes a disferlina y miosina tanto en los pacientes como en el control. Se obtuvo la relación existente en cada paciente de la proteína de interés (disferlina) y el marcador (MHC), posteriormente se comparó frente a la relación que se obtuvo en el control lo que nos dio el porcentaje de disminución. (Tabla s 7 y 8)

El porcentaje de disminución se obtuvo mediante las siguientes fórmulas:

AD: Área bajo la curva de Disferlina.

AM: Área bajo la curva de MHC.

D/M: Relación entre disferlina y miosina.

D/M C: Relación entre disferlina y miosina del control.

D/M P: Relación entre disferlina y miosina del paciente.

UR: Unidades Relativas.

URC: Unidad Relativa del Control = 1.

URP: Unidades Relativas del Paciente.

- 1.- $AD / AM = D/M$
- 2.- $(D/M P \times URC) / D/M C = URP$
- 3.- $URC - URP (100) = \% \text{ DE DISMINUCIÓN}$

TABLA 7. Cuantificación de Disferlina

No	Área	Relación Dysf / Miosina	Unidades relativas	% disminución
c	494878	0.320620044	1	0
	1543503			
195	493724	0.330276899	1.03011931	-3.011931005
	1494879			
202	12493	0.015370098	0.047938668	95.20613319
	812812			
204	1	7.76E-07	2.41886E-06	99.99975811
	1289433			
205	145548	0.0944896	0.29470896	70.52910398
	1540360			
206	410442	0.20850686	0.650323844	34.96761559
	1968482			
211	294923	0.162034654	0.505379051	49.46209488
	1820123			

Pacientes 195, 202, 204, 205, 206 y 211. Un porcentaje ≤ 0 significa expresión normal de la proteína.

TABLA 8. Cuantificación de Disferlina

No	Área	Relación Disfer/Mios	Unidades relativas	% de disminución
c	479180	0.947432316	1	0
	505767			
125	1688087	2.288807387	2.415800421	-141.5800421
	737540			
126	338823	0.947004338	0.999548276	0.045172394
	357784			
152	456185	1.429648155	1.508971281	-50.89712805
	319089			
165	1	1.60118E-06	1.69002E-06	99.999831
	624541			
191	606663	0.852767411	0.900082673	9.991732722
	711405			
200	1153	0.002105559	0.002222385	99.77776152
	547598			

Pacientes 125, 126, 152, 165, 191 y 200. Un porcentaje $\leq a 0$ significa expresión normal de la proteína.

De un total de 12 pacientes analizados se confirmó la disminución o ausencia de la proteína en 8 de ellos con algunos cambios con respecto a lo diagnosticado por inmunofluorescencia (125, 126, 165 y 191) (Tabla 9), en el resto de los pacientes el resultado del Western blot coincide con el diagnóstico de la inmunofluorescencia. Así pues, en la tabla 9 se comparan los resultados obtenidos a través de las dos pruebas.

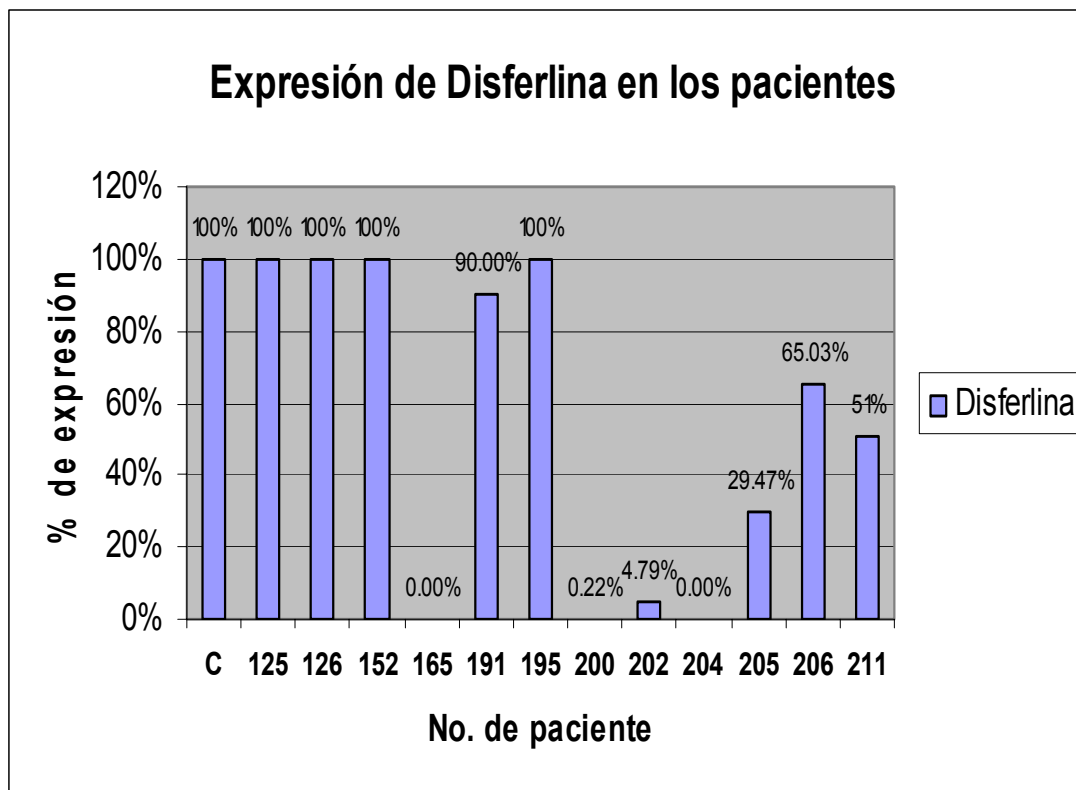
TABLA 9. Inmunofluorescencia vs Western blot

No.	Procedencia	Inmunofluorescencia	Western blot % de disminución	Nota
57	INNN	Disfer ---		No hubo biopsia
75	INNN	Disfer ++		No hubo biopsia
77	CMN	Disfer ++		No hubo biopsia
125	INNN	Disfer ---	Normal	
126	INNN	Disfer ---	Normal	
128	INNN	Disfer ---		No hubo biopsia
152	CNR	Disfer ++	Normal	
165	CNR	Disfer ++	100%	
191		Disfer ---	9.99%	
195	CMN	Disfer ++	Normal	
200	INNN	Disfer ---	100%	
202	INNN	Disfer ++	95.2%	
204	INNN	Disfer ---	100%	
205	INNN	Disfer +	70.53%	
206	CMN	Disfer ++	34.96%	
211	CMN/INNN	Disfer ++	49.46%	

De un total de 12 pacientes analizados se confirmó la disminución o ausencia de la proteína en 8 de ellos (165, 191, 200, 202, 204, 205, 206 y 211). En 4 (125, 126, 152 y 195) se encontró una expresión normal de la proteína. En el resto de los pacientes (57, 75, 77 y 128) no se contó con biopsia muscular par hacer la prueba.

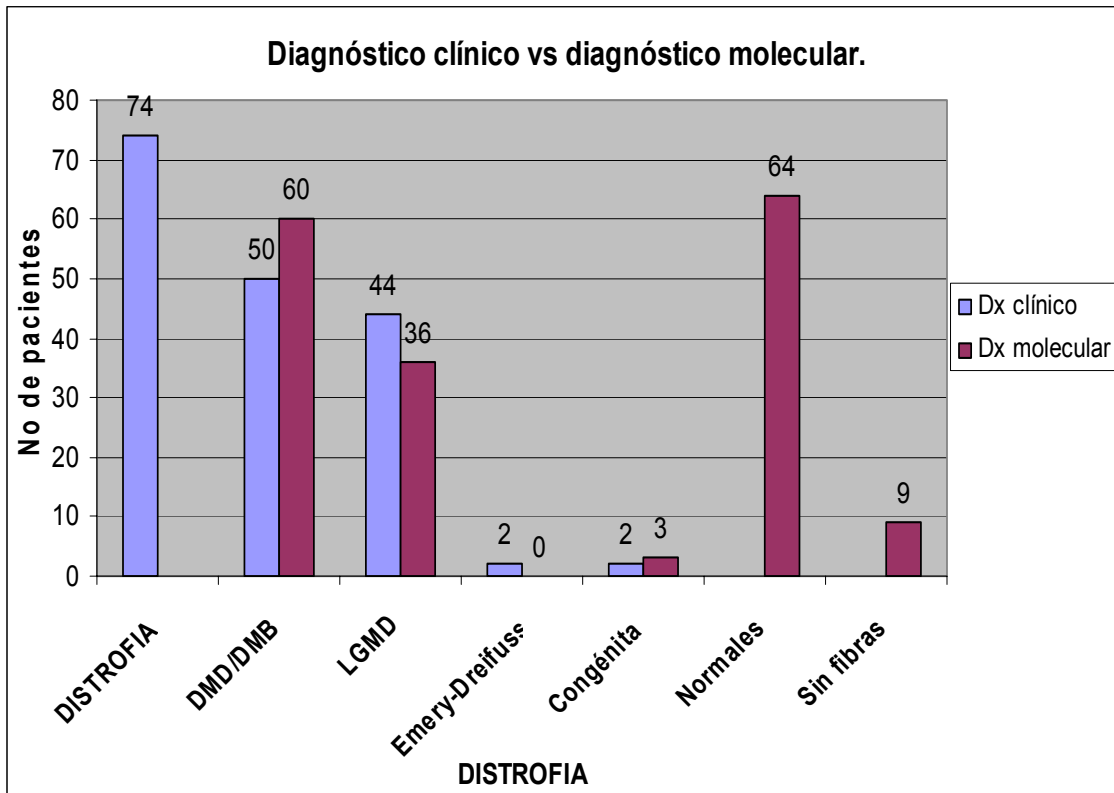
El porcentaje de expresión de la proteína se puede observar en la gráfica 2. No obstante se puede sugerir que en algunos casos la deficiencia parcial de disferlina es solo un efecto secundario de la ausencia principal de otra proteína no analizada

en este trabajo dado que este fenómeno se presenta en algunos casos con LGMDs. Se debe tomar en cuenta que únicamente se analizaron 11 proteínas relacionadas con distrofia muscular de las más de 30 que se han reportado.



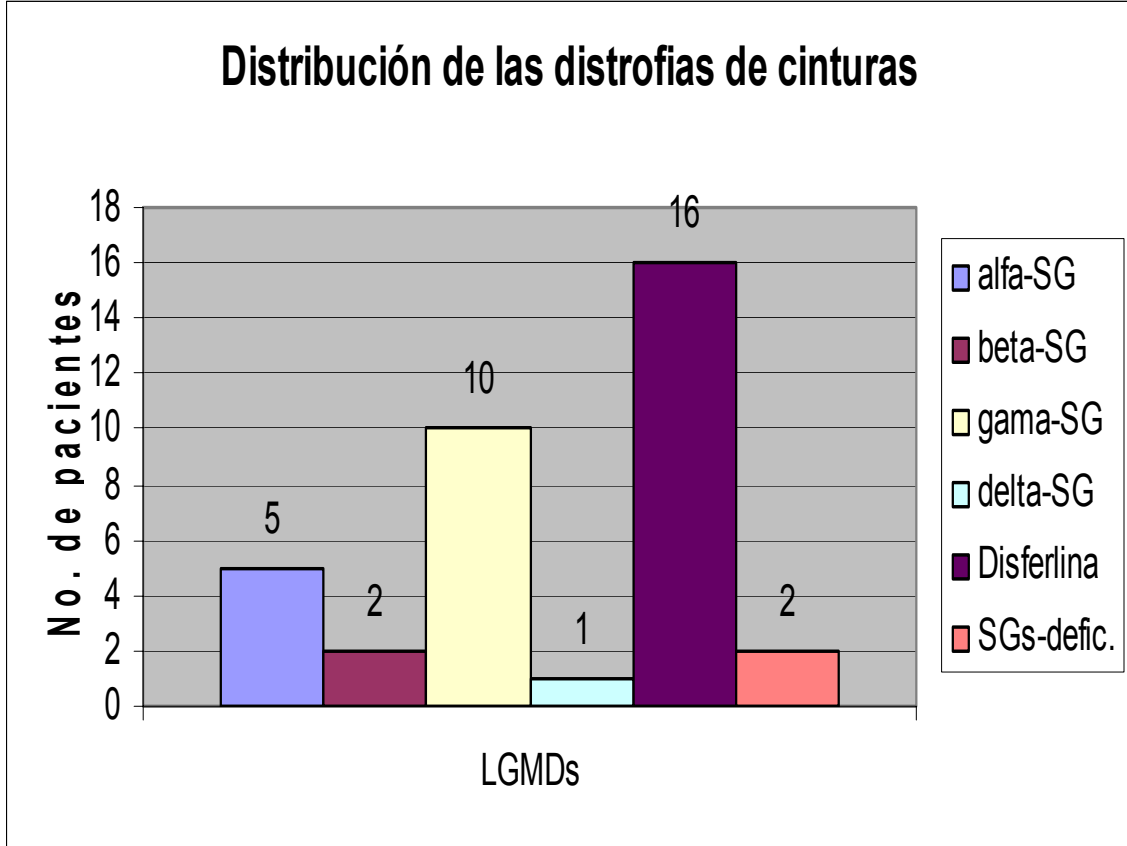
Gráfica 2. Expresión de la proteína disferlina en los 12 pacientes analizados. Pacientes 125, 126, 152 y 195 (100%). 191 (90%). 206 (65%). 211 (51%). 205 (29.5 %). 202 (4.78%). 165, 200 y 204 (0 %).

La Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Hospital de Pediatría de Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS, ha brindado sus servicios a todos los derechohabientes que han solicitado el diagnóstico molecular de las distrofias musculares. Este diagnóstico se ha venido haciendo desde hace varios años siendo este trabajo la continuación del mismo. En la gráfica 3 se muestran los resultados obtenidos del año 2000 a 2005 de 172 pacientes analizados por inmunofluorescencia indirecta en donde se observa una reclasificación de los mismos de acuerdo al diagnóstico clínico inicial.



Gráfica 3. Resultados de 172 pacientes en donde se observa una clasificación más certera de los pacientes en base al tipo clínico de distrofia que genera la proteína afectada.

Así mismo de 172 pacientes analizados por inmunofluorescencia, en 36 de ellos se confirmó una distrofia muscular de cintura la cual se presentó por la ausencia o deficiencia de algún SG y en particular de disferlina. En la gráfica 4 se muestra la distribución de las proteínas responsable de las LGMDs en el total de pacientes analizados durante 6 años.



Gráfica 4. Principales proteínas responsables de las distrofias musculares de cinturas (LGMDs) en 172 pacientes analizados. La proteína mas afectada fue disferlina (44.44%), seguida por γ -SG (27.77%), α -SG (13.88%), β -SG (5.55%), δ -SG (2.77%) y SG deficientes (5.55%).

Una vez más, en un grupo mayor de estudio, se confirmó la gran variabilidad clínica que presentan los pacientes y por ende se hace necesario el uso de técnicas moleculares para lograr un mejor diagnóstico.

Finalmente, en la gráfica 5 se muestra el número de pacientes que han acudido a estos servicios desde el año 2000 al 2005 sumando un total de 214 pacientes.

DISCUSIÓN

Las distrofias musculares son un grupo muy heterogéneo de enfermedades hereditarias que se caracterizan principalmente por la debilidad progresiva de los músculos y por un patrón de necrosis-regeneración de las fibras musculares (Dubowitz et al, 1985). La edad de inicio es variable al igual que el grado de la enfermedad, actualmente se relacionan con mutaciones en genes que codifican para proteínas asociadas y no asociadas al DGC que dan estabilidad y mantienen la integridad de la membrana celular (Ervasti et el, 1993). Sin embargo, actualmente se les han conferido funciones de señalización (Betto et al, 1999.; Dorianna et. al, 2004; Ort et al, 2000 and Yang et al, 1995)

El número de proteínas involucradas y la gran variabilidad clínica que presentan los pacientes con distrofia muscular hacen muy difícil el diagnóstico clínico correcto, puesto que la misma mutación puede presentar dos cuadros clínicos diferentes, así como también, un mismo cuadro clínico puede estar dado por dos mutaciones diferentes en diferentes proteínas. Las nuevas técnicas de biología molecular permiten hacer una caracterización más certera de estas enfermedades, así pues la inmunofluorescencia indirecta y el Western blot son técnicas que nos permitieron diagnosticar certeramente a cada uno de los pacientes.

En este trabajo se analizó la expresión de 11 proteínas (asociadas y no asociadas al DGC) de 31 pacientes diagnosticados clínicamente con distrofia muscular. Para ello se utilizaron anticuerpos dirigidos contra las proteínas distrofina, disferlina, sarcoglicanos: α , β , γ y δ , caveolina-3, merosina, teletonina, emerina NH3 y lámina

A/C. En algunos casos se analizó tanto la parte carboxilo como la parte amino de la proteína.

INMUNOFLUORESCENCIA

De los 31 pacientes analizados se encontraron 5 pacientes varones (175, 183, 184, 190 y 210) negativos para Distrofina tanto en el lado carboxilo como en el lado amino de la proteína característico en la DMD. De estos 5 pacientes, 3 fueron diagnosticados clínicamente como DMD, su edad oscila entre los 6 y 10 años con una edad de inicio de los síntomas entre 2 y 5 años lo que concuerda por lo descrito en la literatura (Moser et al., 1984), los músculos afectados principalmente son los de las extremidades inferiores y superiores. Los 5 pacientes presentaron niveles elevados de CPK y signo de Gowers positivo.

En todos los casos se encontró deficiencia secundaria en alguno de los SGs principalmente de γ y δ (Tablas 4 y 5). Este resultado concuerda por lo ya descrito en la bibliografía y sugiere que este efecto, principalmente con γ SG se debe a que existe una interacción directa entre la distrofina y demás proteínas del DGC (Campbell, 1995). Por lo tanto, la ausencia de distrofina y la disminución de los SGs conllevan a una desestabilización de la membrana celular, por ende a la pérdida de la integridad de la misma lo que promueve la muerte de la fibra celular y un panorama de necrosis-regeneración observado en la biopsia muscular de estos pacientes. Así también, en estos pacientes se observaron cambios en el tamaño de las fibras musculares, núcleos centralizados y un incremento del tejido conectivo procesos característicos en las distrofias musculares (Figura 7).

La DMD tiene una incidencia similar en todo el mundo independientemente de la raza, se estima que 1 de cada 3 500 varones nacidos vivos presentan esta enfermedad y que un tercio de los casos se deben a mutaciones de *novo* (nuevas mutaciones), un tercio a mutaciones heredadas por mujeres portadoras sin antecedentes familiares que son mutantes nuevas y un tercio más por mutaciones heredadas desde las primeras generaciones de la línea familiar (Worton y Thompson, 1988).

Se ha observado que de un 60 a 65% de las mutaciones que se presentan en el gen de distrofina son deleciones (Forest et al., 1987; Darras et al., 1988) y que del 5 al 10% son duplicaciones parciales (Hu et al., 1990). Por lo que se sugiere que en pacientes Duchenne se presentan deleciones que originan mutaciones sin sentido rompiendo el marco de lectura lo que genera una proteína truncada que no es funcional (Koening et al, 1989; Monaco et al, 1988). Esto explica el por que de la ausencia de distrofina en la inmunofluorescencia (Figura 7).

En 5 pacientes más (varones) se encontró una deficiencia en la expresión de distrofina (174, 189, 203, 218 y 223) ya sea en el lado carboxilo, en el lado amino o por ambos lados de la proteína. Este patrón de fluorescencia es característico de los pacientes que presentan DMB. Sólo en 2 de los casos se encontró deficiencia secundaria de los sarcoglicanos α , β y γ en el paciente 174 y γ y δ en el paciente 218 (Figura 9). Nuevamente se observó como γ SG disminuye su expresión en estos pacientes lo que confirma una relación directa entre la distrofina y este SG.

Los pacientes antes mencionados, presentan una edad de entre los 7 y 21 años con una edad de inicio de los síntomas entre 1 año y medio y 10 años, la musculatura afectada al igual que en la DMD son los músculos de las 4 extremidades. Todos ellos presentan niveles de CPK elevados y signo de Gowers (+). Sin embargo, los datos la edad de inicio de los síntomas no concuerdan con los descritos en la literatura ya que en la mayoría de nuestros pacientes inician antes/durante los 2 años de vida (174, 189 y 218), se tiene reportado que en la DMB los síntomas empiezan entre los 5 y 15 años de edad, sin embargo cabe recordar que la sintomatología en las distrofias musculares es muy variable y esto es muestra de ello. De estos 5 pacientes, 2 fueron diagnosticados clínicamente como DMD y los otros 3 solo como distrofia sin embargo todos ellos presentan disminución en la expresión de distrofina lo que los clasifica como pacientes con DMB. La fluorescencia observada en estos pacientes se debe a la expresión de una proteína más pequeña que conserva el lado amino y carboxilo terminal y que es parcialmente funcional. Se ha observado que hay mutaciones que generan un corrimiento en el marco de lectura del gen que permiten la expresión de esta proteína. Por ejemplo, se ha visto que pacientes que presentan deleciones del exón 3 al exón 7 presentan un fenotipo de DMB, se propone que en este caso ocurre un splicing alternativo por lo cual se produce la proteína que es más pequeña que la normal (Malhotra et al., 1988). Esto puede explicar por que en pacientes con DMB se observa de un 10 al 40% la fluorescencia de la proteína (Hoffman et al., 1988).

Fué posible observar también una sobreexpresión de caveolina-3 en los pacientes diagnosticados con DMD/B (Figura 7). Esta sobre expresión ya ha sido reportada en

la literatura y se sugiere que caveolina -3 juega un papel importante en la patogénesis de las DMD/B (Silvia-Repetto et al., 1999; Ferruccio et al., 2000).

Se ha observado también que la frecuencia de las DMD/B tiende a disminuir en países industrializados debido al acceso que tienen las familias al asesoramiento genético (Ozawa et al., 1988).

Se diagnosticó 1 paciente con distrofia muscular de cinturas tipo 2D (LGMD 2D) negativo en α sarcoglicano , con una expresión muy deficiente en sarcoglicanos β , γ , δ y parte COOH de disferlina y con deficiencia parcial en ambos lados de Distrofina y lado NH₃ de disferlina (Figura 11). La edad de inicio de los síntomas coincide con lo reportado en la bibliografía para las LGMDs, en este caso es una paciente femenina de 11 años de edad (194) quien inició los síntomas a los 5 años y medio. Actualmente no puede incorporarse sola, presenta atrofia muscular en forma progresiva en brazos, cintura escapular, cintura pélvica, muslos y piernas en forma bilateral. Tiene también secuelas de rubéola congénita consistente en catarata de ojo izquierdo, sordera en oído derecho e hipoacusia del izquierdo. Presenta soplo cardíaco y retraso psicomotor. La biopsia muscular presenta incremento del tejido conectivo y adiposo muy similar a la biopsia de pacientes con DMD/B. Dado a lo anterior la paciente cursa con un cuadro clínico severo con afecciones cardíacas lo cual es raro en pacientes con LGMD 2D.

Se ha observado que las mutaciones de α SG son las más frecuentes y las que originan fenotipos menos graves en los que se observan residuos de la proteína

(Eymard et al., 1997), en este caso la deficiencia es total lo que conlleva a una marcada disminución de los otros tres SG pero también de distrofina lo cual ya está reportado en la bibliografía (Romero et al., 1994; Piccolo et al., 1995; David et al., 1996). Mas aún, nosotros encontramos pérdida secundaria tanto de distrofina como de disferlina lo cual no está reportado en la literatura.

Por otro lado, nuestro resultado contradice estudios hechos en células C2C12 que muestran que α SG podría estar separado del resto del complejo de SGs y que por ende su pérdida no genera la deficiencia secundaria de otras proteínas del DGC (Chan et al., 1998) Así también contradice otros experimentos que sugieren que α y γ SG no se asocian en realidad a las otras subunidades de SG. (Sakamoto et al., 1997).

Sin embargo se confirma que la pérdida de uno de los componentes del complejo de SG genera la pérdida secundaria de las demás proteínas asociadas al DGC e incluso de proteínas que estructuralmente no forman parte de este complejo como lo es Disferlina.

Se encontraron 8 pacientes con deficiencia primaria de disferlina, 2 paciente (200 y 204) nulo para la proteína tanto en la parte carboxilo como en la parte amino y 6 pacientes (191, 195, 202, 205, 206 y 211) con deficiencia de la misma por uno o ambos lados de la proteína. El intervalo de edad en estos pacientes va desde 7 hasta 54 años con una edad de inicio de los síntomas de entre 4 y 20 años. La debilidad muscular se observó principalmente en las cinturas de las 4 extremidades

proximales característico de la LGMD 2B, así como también debilidad distal de los miembros superiores característico en la MM. Los niveles de CPK se muestran elevados y en algunos casos el signo de Gowers es positivo (191, 205 y 206).

Las mutaciones en el gen de disferlina presentan una gran variabilidad clínica tanto intrafamiliar como interfamiliar ya que se ha reportado que una misma mutación genera fenotipos diferentes e incluso entre individuos de la misma familia por lo que no se ha encontrado relación entre el genotipo y el fenotipo (Bonnemann et al., 2002; Weiler et al., 1999 and Bushby et al., 2000). Cerca de 45 mutaciones están descritas para el gen DYSF, incluidas mutaciones sin sentido, inserciones y deleciones. (Campanaro et al., 2002 and Saito et al., 2002) sin embargo el tipo de mutación no correlaciona con la severidad del fenotipo (Caglianina et al., 2003).

En los pacientes que se encontraron nulos para disferlina es posible que la mutación que originó esta deficiencia haya afectado el marco de lectura generando así una proteína truncada que no es funcional por lo que no se observa en la inmunohistoquímica. Se sabe que disferlina participa en los procesos de reparación de la membrana celular por lo que si se encuentra ausente, este proceso que es vital para mantener la integridad de la membrana no se llevará a cabo, lo cual conlleva a que la membrana celular y por ende la fibra muscular pierdan integridad generando la muerte de la célula.

En los pacientes que muestran disminución de la proteína en la inmunofluorescencia, se propone que existan splicing alternativos debido a una mutación que genera una proteína más corta parcialmente funcional generando un

efecto similar a lo sucedido en la DMB. Cabe recordar la gran variabilidad clínica que presentan estos pacientes con disferlinopatías por lo que se sugiere que en estos casos se busque la mutación a nivel de DNA para comprender mejor la patogénesis de esta enfermedad. Se ha sugerido también que la disminución de esta proteína es un efecto secundario debido a la deficiencia primaria de otra proteína relacionada con distrofias musculares (Kazuhiko et al., 2003) que no fueron estudiadas en este trabajo tales como Calpaina-3.

Debemos tomar en cuenta que disminución de la expresión de una proteína no necesariamente debe estar ligada a una mutación sobre la región codificante de la misma (gen), estas mutaciones pueden presentarse dentro de la región reguladora del gen (promotor) lo cual puede mermar la expresión de una proteína integra, o por otro lado, si la mutación dentro de esa región reguladora se da sobre una secuencia de regulación negativa, la proteína podría aumentar su expresión.

Así mismo es de suma importancia mencionar que mutaciones en los genes que codifican para proteínas (enzimas principalmente) que llevan a cabo modificaciones postraduccionales sobre proteínas relacionadas con distrofia muscular también generan el fenotipo distrófico ya que su proteína blanco no será funcional.

De los 10 pacientes clasificados con DMD/B, en tres de los casos (30%)(183, 190 y 203) se encontró deficiencia secundaria de disferlina, esta observación ya ha sido reportada por Piccolo en el 2000, a comparación con nuestros resultados, él observó este efecto en 2 de 10 pacientes con DMD/B. Cabe señalar que disferlina no es un

componente integral del DGC, sin embargo se ha observado que se altera su distribución en las distrofias musculares y que muchas veces cuando su localización disminuye en membrana plasmática, aumenta en las vesículas citoplásmicas (Piccolo et. al, 2000) lo que sugiere una asociación funcional entre disferlina y el DGC.

Así también, algunos reportes sugieren que la anomalía en la localización de disferlina está asociada a otras moléculas que promueven su localización de la membrana celular y que quizá tiene alguna función especial en la región citoplásmica (Kazuhiko et al., 2003).

En relación a lo anterior, se ha observado una baja expresión de disferlina en deficiencia primaria de caveolina-3, así como también se ha observado que se ve afectada la expresión de disferlina en las LGMDs (Piccolo et. al, 2000 and Kazuhiko et al., 2003).

De acuerdo a las observaciones en estos pacientes podemos asegurar que la disminución de distrofina no es un efecto secundario por deficiencia de disferlina ya que en pacientes nulos para disferlina, distrofina se encuentra normal.

Dx clínico vs Dx por inmunofluorescencia

La variabilidad clínica que se presenta en las distrofias musculares hace muy difícil el diagnóstico clínico correcto, el análisis por inmunofluorescencia permitió clasificar de una forma más certera a cada uno de los pacientes analizados. De esta forma,

de los 31 pacientes analizados, clínicamente fueron canalizados 22 pacientes como distrofia muscular en general; 5 como DMD/B y 3 como distrofias musculares de cinturas. Sin embargo la clasificación dada por el análisis de inmunofluorescencia ubicó a 10 pacientes como DMD/B, a 1 como LGMD, 8 con disferlinapatías y en 12 de los casos no se encontró deficiencia en ninguna de las proteínas analizadas (Grafica1).

Cabe mencionar que los 12 pacientes que no presentaron alteraciones no se excluyen de un padecimiento distrófico, se propone a futuro, analizar la expresión de otras proteínas relacionadas con otras distrofias musculares que no fueron analizadas en este trabajo.

Por otro lado, llama la atención el alto porcentaje de pacientes con disferlinapatías en nuestro grupo de estudio (25.8%) por lo que se sugirió corroborar el diagnóstico a través de un método cuantitativo como lo es el western blot.

WESTERN BLOT

El Western blot es una técnica empleada para la detección de antígenos proteicos, dicha técnica es más sensible que la inmunofluorescencia ya que es posible hacer una cuantificación de la proteína en estudio. A los 8 pacientes diagnosticados en este trabajo con disferlinapatías, se sumaron 8 pacientes más que en años atrás ya habían sido diagnosticados (57, 75, 77, 125, 126, 128, 152 y 165). La extracción de proteína se hizo a partir de músculo esquelético y se empleo el anticuerpo dirigido contra el lado carboxilo de la proteína.

Los resultados confirman el diagnóstico de la inmunohistoquímica en 8 de los pacientes analizados por esta técnica (165, 191, 200, 2002, 204, 205, 206 y 211), en 4 más se mostró una expresión normal de la proteína (125, 126, 152 y 195) lo que puede atribuir a una redistribución de la misma en el citoplasma de la célula, lo que no permitió su detección en la membrana celular a través de la inmunofluorescencia. Cabe señalar que dicha distribución se ha observado en diversos procesos distróficos principalmente en LGMDs (Kazuhiko et al., 2003).

Por último, en 4 de los casos diagnosticados como disferlinopatías ya no se contaba con muestra de biopsia muscular por lo que no fue posible realizar la técnica en estos pacientes (Tabla 9).

El western blot nos brinda el porcentaje de expresión de disferlina en cada uno de los pacientes analizados comparados con un individuo sano (control). En el 165 y 204 no presenta expresión de la proteína (0 %), el 200 (0.22%), el 202 (4.8%), el 205 (29.5%), el 211 (51%), el 206 (65%), el 191 (90%) y el 125, 126, 152, y el 195 muestran una expresión normal de la proteína (100%). (Gráfica 2).

Se sugiere buscar la mutación en el gen de la proteína deficiente de cada uno de los pacientes analizados así como también, en los pacientes normales para estas proteínas analizadas, analizar la expresión de otras proteínas relacionadas con distrofia muscular no analizadas en este trabajo.

9.- CONCLUSIONES

- La causa principal de distrofia muscular en 31 pacientes analizados fué la deficiencia de distrofina (31.25%), seguida por disferlina (25.8%) y α -SG (3.22%).
- La deficiencia primaria de distrofina afecta la expresión del complejo de sarcoglicano (α , β , γ y δ SG) así como también en algunas ocasiones afecta la expresión de disferlina.
- La ausencia de un sarcoglicano (α -SG) afecta la expresión de otros componentes del DGC (SGs β , γ , δ y distrofina) así como también de proteínas no relacionadas con este complejo como lo es disferlina.
- La principal causa de LGMD fue la deficiencia de disferlina (25.8%).
- El Western blot permitió cuantificar a la proteína disferlina en pacientes diagnosticados con disferlinopatías por inmunofluorescencia indirecta.
- En 12 pacientes (38.7%) no se encontró deficiencia en ninguna de las proteínas analizadas.
- Los resultados obtenidos muestran una estrecha relación entre las proteínas asociadas y no asociadas al DGC ya que la deficiencia de alguna de estas proteínas influye en la expresión del mismo.

10.- BIBLIOGRAFIA

Alexander Zimprich, Monika Grabowski, Friedrich Asmus, Markus Naumann, Daniela Berg, Markus Bertram, Karl Scheidtmann, Peter Kern, Juliane Winkelmann, Bertram Müller-Myhsok, Leonhard Riede. (2001). Mutations in the gene encoding ϵ -sarcoglycan cause myoclonus–dystonia syndrome. *Nature* :29 :66-69

Matthias Bauer, Tanja Müller, Mirna Castro, Thomas Meitinger, Tim M. Strom & Thomas Gasser

Anderson L, Davison K, Moss J. (1999). Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Hum Mol Genet*;8:855–61.

Angelini C, Fanin M, Freda MP, Duggan DJ, Siciliano G, Hoffman EP. (1999). The clinical spectrum of sarcoglycanopathies. *Neurology*. 52: 176-9.

Aruto Y, Kobayashi K, Manya H, et al. (2001). Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell*. 1: 717– 24.

Audrey J. Ettinger, Guoping Feng, and Joshua R. Sanes. (1997). Epsilon Sarcoglycan, a Broadly Expressed Homologue of the Gene Mutated in Limb-Girdle Muscular Dystrophy 2D. *Biol Chem J*.272: 32534–32538.

Bashir R, Britton S, Strachan T, et al. (1998). A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor fer-1 is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet*. 20:37 – 42.

Betto R, Senter L, Ceoldo S, Tarricone E, Biral D, Salviati G. (1999). Ecto-ATPase activity of alpha-sarcoglycan (adhalin). *J. Biol. Chem.*, 274:7907-7912.

Beskrovnaya I, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sennett SW, Campbell KP. (1992). Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature*. 355(6362):696– 702.

Bieber FR, Hoffman EP. (1990). Duchenne and Becker muscular dystrophies: genetics, prenatal diagnosis, and future prospects. *Clin Perinatol*. 17: 856-7.

Bione, K. Small, V.M.A. Aksmanovic, M. D'Urso, A. Ciccodicola, L. Merlini, L. Morandi, W. Kress, O.J.R.W. Yates, S.T. Warren, D. Toniolo, (1995). Identification of new mutations in the Emery±Dreifuss muscular dystrophy gene and evidence for genetic heterogeneity of the disease, *Hum. Mol. Genet*. 4 :1859-1863.

Bione, E. Maestrini, S. Rivella, M. Mancini, S. Regis, G. Romeo, D. Toniolo, (1994). Identification of a novel X- linked gene responsible for Emery±Dreifuss muscular dystrophy, *Nat. Genet*. 8 :323±327.

Bonnemann CG, Finkel RS. (2002). Sarcolemmal proteins and the spectrum of limb-girdle muscular dystrophies. *Semin Pediatr Neurol*. 9: 81-99.

Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S. (1999). Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery–Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet*. 21:285– 8.

Bushby KM, Thambyayah M, Gardner-Medwin D. (1991). Prevalence and incidence of Becker muscular dystrophy. *Lancet* 337:1022–1024.

Bushby KM. (2000). Dysferlin and muscular dystrophy. *Acta Neurol Belg*. 100: 142-5.

Campanaro S, Romualdi C, Fanin M, et al. (2002). Gene expression profiling in dysferlinopathies using a dedicated muscle microarray. *Hum Mol Genet.* 11:3283–98.

Campbell KP, Kahl SD. (1989). Association of dystrophin and integral membrane glycoprotein. *Nature.* 338:259-62.

Campbell, K.P. (1995). Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix in kage. *Cell* 80, 675–679.

Carbone I, Bruno C, Sotgia F, et al. (2000) Mutation in the CAV3 gene causes partial caveolin-3 deficiency and hyperCKemia. *Neurology.* 54:1373–6.

Chan YM, Bonnemann CG, Lidov HGW, Kunkel LM. (1998). Molecular organization of sarcoglycan complex in mouse myotubes in culture. *J Cell Biol* 143:2033–2044.

Chen J., Weixing Shi, Yuguang Zhang, Randi Sokol, Hong Cai, Mingyue Lun, Brian F. Moore, Matthew J. Farber, Joel S. Stepanchick, Carsten G. Bönnemann, Yiu-mo Michael Chan, (2006). Identification of functional domains in sarcoglycans essential for their interaction and plasma membrane targeting.

Cohn R, MD and Campbell K. (2000) Molecular basis of muscular dystrophies, *Muscle Nerve* 23: 1456-1471

Colomer J. (1999). Sarcoglycanopatías. *Rev Neurol.* 28: 150-3.

Coral-Vazquez Ramón, et al. (1999). Disruption of the Sarcoglycan–Sarcospan Complex in Vascular Smooth Muscle: A Novel Mechanism for Cardiomyopathy and Muscular Dystrophy. *Cell* 98, 465–474.

Costanza Lamperti, Rachele Cagliani, Patrizia Ciscato, et al. (2005). Congenital muscular dystrophy with muscle inflammation alpha dystroglycan glycosylation defect and no mutation in FKRP gene. *Journal of the Neurological Sciences.*

Darras BT, Blattner P, Harper JF, Spiro AJ, Alter S, Franke U: (1988). Intragenic deletions in 21 Duchenne muscular dystrophy (DMD)/ Becker muscular dystrophy (BMD) families studied with the dystrophin cDNA: location of breakpoints on HindIII and BglII exon-containing fragment maps, meiotic and mitotic origin of mutations. *Am J Hum Genet.* 43:620–629

David J. Duggan a, Marina Fanin b, Elena Pegoraro a, Corrado Angelini b, Eric P. Hoffman a' (1996). cx-Sarcoglycan (adhalin) deficiency: complete deficiency patients are 5 9% of childhood-onset dystrophin-normal muscular dystrophy and most partial deficiency patients do not have gene mutations. *Journal of the Neurological Sciences* 140:30-39

den Dunnen JT, Grootsholten PM, Bakker E, Blonden LA, Ginjaar HB, Wapenaar MC, van Paassen HM, van Broeckhoven C, Pearson PL, van Ommen GJ. (1989). Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *Am J Hum Genet* 45:835–847.

den Dunnen JT, Grootsholten PM, Dauwerse JG, Walker AP, Monaco AP, Butler R, Anand R, Coffey AJ, Bentley DR, Steensma HY, van Ommen GJ. (1992). Reconstruction of the 2.4 Mb human DMD-gene by homologous YAC recombination. *Hum Mol Genet* 1:19–28.

Dimple Bansal and Kevin P. Campbell. (2004). Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. *Cell*. 206-213.

Dorianna SANDONÀ, Stefano Gastaldello, Tiziana Martinello, and Romeo Betto. (2004). Characterization of the ATP-hydrolysing activity of α -sarcoglycan. *Biochem J.* 1; 381(Pt 1): 105–112.

Dubowitz V. Histological and histochemical stains and reactions. In

Dubowitz V, ed. *Muscle biopsy: a practical approach.* 2 ed. London: Bailliere Tindall; 1985. p. 19-40.

- Dubowitz V, Fardeau M. Proceedings of the 27th ENMC sponsored workshop on congenital muscular dystrophy. 22– 24 April 1994, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 1995; 5:253– 8.
- Duclos F, Broux O, Bourg N, Straub V, Felman GL, Sunada Y, Lim LE, Piccolo F, Cutshall S, Gary F, Quetier F, Kaplan JC, Jackson CE, Beckman JS, Campbell KP. (1998a). Beta sarcoglycan: genomic analysis and identification of a novel missense mutation in the LGMD2E Amish isolate. *Neuromusc Disord* 830-38
- Durbeej M, Cohn RD, Moore SA, HrstkRF, Allanmand V, Davison BL, Willianson R and Campbbell KP. (2000). Disruption of the β -SG gene reveals a complex pathogenic mechanism for LGMD2E. *Mol Cell*; 5:141-151.
- Emery AEH, Dreifuss FE. (1966). Unusual type of benign X-linked muscular dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 29:338±342.
- Emery AEH. (1991). Population frequencies of inherited neuromuscular diseases-a world survey. *Nneuromusc Dis*.1:19-29.
- Emery AEH. (2000). The muscular dystrophies. *Lancet* . 2:687-95.
- Emery AEH. (2002). Muscular dystrophy into the new millennium. *Neuro Muscular Disorders*. 12;4: 343-349.
- Engel AG, Yamamoto M, Fischbeck K. 1994. Dystrophinopathies.
Engel AG, Franzini- Armstrong C, editors. *Myology: basis and clinical*. Vol 2. New York: Mcgraw-Hill.P 1133-1191.
- Engelman, J. A., Zhang, X. L., Galbiati, F., Volonte, D., Sotgia, F., Pestell, R. G., Minetti, C., Scherer, P. E., Okamoto, T., and Lisanti, M. P. (1998) *Am. J. Hum. Genetics*. 63, 1578–1587.
- Ervasti JM, Campbell KP. (1991). Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 66:1121–1131.
- Ervasti, J.M., Campbell, K.P. (1993). *Mol. Cell Biol. Hum. Dis. Ser.* 3, 139–166.
- Ettinger AJ, Feng G, Sanes JR. (1997). Epsilon-sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutate in limb-girdle muscular dystrophy 2D. *J Biol Chem.*, 272:32534-32538.
- Eymard B, Romero NB, Leturcq F, Piccolo F, Carrie A, Jeanpierre M, Collin H, Deburgrave N, Azibi K, Chaouch M, Merlini L, Themar- Noel C, Penisson I, Mayer M, Tanguy O, Campbell KP, Kaplan JC, Tome FM, Fardeau M. (1997). Primary adhalinopathy (alphasarcoglycanopathy): clinical, pathologic, and genetic correlation in 20 patients with autosomal recessive muscular dystrophy. *Neurology* 48:1227–1234.
- Ferruccio Galbiati, Daniela Volonte, Jeffrey B. Chu, Maomi Li, Samson W. Fine, Maofu Fu, Jorge Bermudez, Marina Pedemonte, Karen M. Weidenheim, Richard G. Pestell, Carlo Minettii, and Michael P. Lisanti (2000). Transgenic overexpression of caveolin-3 in skeletal muscle fibers induces a Duchenne-like muscular dystrophy phenotype. *Neurology*. 97:9689 9694.
- Fougerousse F, Durand M, Suel L, Pourquie O, Delezoide AL, Romero NB, Abitbol M, Beckmann JS. (1998). Expression of genes (CAPN3, SGCA, SGCB, and TTN) involved in progressive muscular dystrophies during early human development. *Genomics* 48:145–156.
- Forest S, Cross GS, Speer A, Gardner-Medwin D, Burner J, Davies K: (1987). Preferential deletion of exons in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Nature*, 329:638–640
- Fukuyama Y, Osawa M, Suzuki H. (1981). Congenital progressive muscular dystrophy of the Fukuyama type—clinical, genetic and pathological considerations. *Brain Dev.* 3:1– 29.

- Hack AA, Ly CT, Jiang F, Clendenin CJ, Sigrist KS, Wollmann RL, McNally EM. (1998). Gamma-sarcoglycan deficiency leads to muscle membrane defects and apoptosis independent of dystrophin. *J. Cell. Biol.* 142:1279-1287.
- Hayashi YK, Ogawa M, Tagawa K, et al. (2001). Selective deficiency of alpha-dystroglycan in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Neurology.* 57:115– 21.
- Helbling-Leclerc A, Zhang X, Topaloglu H, et al. (1995). Mutations in the laminin alpha 2-chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Nat Genet.* 11:216– 8.
- Hynes RO. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69:1125.
- Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51:919–928.
- Hoffman EP, Fischbeck KH, Brown RH, Johnson M, Medori R, Loike JD, Harris JB, Waterston R, Brooke M, Specht L, Kupsky W, Chamberlain J, Caskey CT, Shapiro F, Kunkel LM. (1988). Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 318:1363–1368.
- Hu X, Ray PN, Murphy E, Thompson MW, Worton RG (1990). Duplicational mutation at the Duchenne muscular dystrophy locus: its frequency, distribution, origin and phenotype/genotype correlation. *Am J Hum Genet.* 46:682–695
- Illa I, Serrano Munuera C, Gallardo E, et al. (2001). Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype. *Ann Neurol.* 49:130–4.
- Jung D, Duclos F, Apostol B, Straub V, Lee JC, Allamand V, Venzke DP, Sunada Y, Moomaw CR, Leveille CJ, Slaughter CA, Crawford TO, McPherson JD, Campbell KP. (1996). Characterization of deltasarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy. *J Biol Chem* 271:32321–32329.
- Kazuhiko Tagawaa,b, Megumu Ogawaa, Kiyokazu Kawabea, Gaku Yamanakaa, Tsuyoshi Matsumuraa, Kanako Gotoa, Ikuya Nonakac, Ichizo Nishinoa, Yukiko K. Hayashia,* (2003). Protein and gene analyses of dysferlinopathy in a large group of Japanese muscular dystrophy patients. 211: 23–28
- Kawabe K, Goto K, Nishino I, Angelini C, Hayashi YK. (2004). Dysferlin mutation analysis in a group of Italian patients with limb-girdle muscular dystrophy and Miyoshi myopathy. *Eur J Neurol.* 11:657– 61.
- Koenig M, Hoffman E, Bertelson C, Monaco A, Feener C, Kunkel L. (1987), Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50:509-517.
- Koenig M, Bggs A and Moyer M. H. (1989) The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J. hum Genet.* 45:498-506.
- Lisanti, M. P., Scherer, P., Tang, Z.-L. & Sargiacomo, M. (1994) *Trends Cell Biol.* 4, 231–235.
- Malhotra SB, Hart KA, Klamut HJ, Thomas NST, Bodrug SE, Burghes AHM, Bobrow M, Harper PS, Thompson MW, Ray PN, Worton RG: (1988). Frame-shift deletions in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Science,* 242:755–759
- Mariz Vainzof, Eloisa S. Moreira, Oscar T. Suzuki, Georgine Faulkner, Georgio Valle, Alan H. Beggs, Olli Carpen, Alberto F. Ribeiro, Edmar Zanoteli, Juliana Gurgel-Gianneti. (2002). Telethonin protein expression in neuromuscular disorders. *Biochimica et Biophysica,* 33– 40
- Maria A. Tsanaclis h, Helga C.A. Silva h, Maria Rita Passos-Bueno a, Mayana Zatz a

- Matsamura K, Saito F, Yamada H, Hase A, Sunada Y, Shimizu, T. (1999). Sarcoglycan complex: a muscular supporter of dystroglycan-dystrophin interplay? *Cellular and Mol. Biol.*, 45:751-762
- Matsumura K, Ohlendieck K, Ionasescu VV, et al. (1993). The role of the dystrophin glycoprotein complex in the molecular pathogenesis of muscular dystrophies. *Neuromuscul Disor.* 3:533–5.
- Matsuda, C., Hayashi, Y.K., Ogawa, M., Aoki, M., Murayama, K., Nishino, I., Nonaka, I., Arahata, K. and Brown, R.H. Jr (2001) The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. *Hum. Mol. Genet.*, 10, 1761–1766.
- Matthew T. Wheeler, Sara Zarnegar and Elizabeth M. McNally. (2002). z-Sarcoglycan, a novel component of the sarcoglycan complex, is reduced in muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 11:2147–2154
- McNally EM, Duggan D, Gorospe JR, Bonnemann CG, Fanin M, Pegoraro E, Lidov HG, Noguchi S, Ozawa E, Finkel RS, Cruse RP, Angelini C, Kunkel LM, Hoffman EP. (1996b). Mutations that disrupt the carboxyl-terminus of gamma-sarcoglycan cause muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 5:1841–1847.
- McNally EM, Ly CT, Kunkel LM. (1998). Human epsilon-sarcoglycan is highly related to alpha-sarcoglycan (adhelin), the limb girdle muscular dystrophy 2D gene. *FEBS Lett* 422:27–32.
- Mizuno Y, Noguchi S, Yamamoto H, Yoshida M, Nonaka I, Hirai S, Ozawa E. (1995). Sarcoglycan complex is selectively loss in dystrophic hamster muscle. *Am J Phat.* 146: 530-536.
- Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM: (1988). An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics*, 2:90–95
- Moreira ES, Wiltshire TJ, Faulkner G, et al. (2000). Limb-girdle muscular dystrophy type 2G is caused by mutations in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin. *Nat Genet.* 24:163– 6.
- Moser H: (1984). Duchenne muscular dystrophy: pathogenetic aspects and genetic prevention. *Hum Genet.* 66:17–40
- Nicholson LV, Johnson MA, Gardner-Medwin D, Bhattacharya S, Harris JB. (1990) Heterogeneity of dystrophin expression in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Acta Neuropathol (Berl)* 80:239–250.
- Nobile C, Marchi J. (1994). A refined restriction map of YAC clones spanning the entire human dystrophin gene. *Mamm Genome* 5:566–571.
- Noguchi S, McNally EM, Ben Othmane K, Hagiwara Y, Mizuno Y, Yoshida M, Yamamoto H, Bonnemann CG, Gussoni E, Denton PH, et al. (1995). Mutations in the dystrophin-associated protein gammasarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. *Science* 270:819– 822.
- Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP. (1998). Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing “preassembled signaling complexes” at the plasma membrane. *J Biol Chem.* 273:5419–5422.
- Ort T, Maksimova E, Dirx R, Kachinsky AM, Berghs S, Froehner SC, Solimena M. (2000) The receptor tyrosine phosphatase-like protein ICA512 binds the PDZ domains of b2-syntrophin and nNOS in pancreatic beta-cells. *Eur J Cell Biol.* 79:621–630.
- Ozawa E, Noguchi S, Mizuno Y, Hagiwara Y, Yoshida M. (1998). From dystrophinopathy to sarcoglycanopathy: Evolution of a comsep of muscular dystrophies. *Muscle Nerve.* 21:421-438.
- Patrice Fort a, Francisco-Javier Estrada, Agnès Bordais, Dominique Mornet, Jose´-Alain Sahel, Serge Picaud, Haydee´ Rosas Vargas, Ramo´n M. Coral-Va´zquez, Alvaro Rendon, (2005). The

sarcoglycan–sarcospan complex localization in Mouse retina is independent from dystrophins. *Neuroscience Research* 53 (2005) 25–33.

Piccolo F., Roberds, S.L., Jeanpierre, M., Leturcq, F., Azibi, K., Beldjord, C., Carrie, A., Recan. D., Chaouch, M., Reghis, A., El Kerch, F., Sefiani, A., Voit, T., Merlini, L., Collin. H., Eymard, B., Beckmann, J.S., Romero, N.B., Tome, F.M.S., Fardeau, M., Campbell. K.P. and Kaplan, J.-C. (1995). Primary adhalinopathy: a common cause of autosomal recessive muscular dystrophy of variable severity. *Nature Genet.* 19: 243-245.

Piccolo F, Jeanpierre M, Leturcq F, Dode C, Azibi K, Toutain A, Merlini L, Jarre L, Navarro C, Krishnamoorthy R, Tome FM, Urtizbera JA, Beckmann JS, Campbell KP, Kaplan JC. (1996). A founder mutation in the gamma-sarcoglycan gene of gypsies possibly predating their migration out of India. *Hum Mol Genet* 5:2019–2022.

Piccolo F, Moore SA, Ford GC, Campbell KP. (2000). Intracellular accumulation and reduced sarcolemmal expression of dysferlin in limb-girdle muscular dystrophies. *Ann Neurol.* 48:902–12.

Politano L, Nigro V, Pasamano L, Petretta V, Comi LI, Papparella S, et al. (2001). Evaluation of cardiac and respiratory involvement in sarcoglycanopathies. *Neuromuscul Disord.* 11: 178-85.

R. Caglianina, F. Fortunato, R. Giordano, C. Rodolico, M.C. Bonaglia, M. Sironia, M.G. D'Angelo, A. Prellb, F. Locatelli, A. Toscani, N. Bresolina, G.P. Comi. (2003). Molecular analysis of LGMD-2B and MM patients: identification of novel DYSF mutations and possible founder effect in the Italian population. *Neuromuscul Disord.* 13:788–795

Romero, N.B., Tome, F.M.S., Leturcq, F., Kerch, F.E., Aaibi, K., Bachner, L., Anderson, R.D., Roberds, S.L., Campbell, K.P., Fardeau, M. and Kaplan, J.-C. (1994) Genetic heterogeneity of severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy with adhalin (50 kDa dystrophin-associated glycoprotein) deficiency. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 317: 70-76.

Sakaki M, Koike H, Takahashi N, et al. (2001). Interaction between emerin and nuclear lamins. *J Biochem.* 129: 321– 7.

Sakamoto A, Ono K, Abe M, Jasmin G, Eki T, Murakami Y, Masaki T, Toyooka T, Hanaoka F. (1997). Both hypertrophic and dilated cardiomyopathies are caused by mutation of the same gene, *deltasarcoglycan*, in hamster: an animal model of disrupted dystrophin-associated glycoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 13873–13878.

Saito A, Higuchi I, Nakagawa M, et al. (2002). Miyoshi myopathy patients with novel 50 splicing donor site mutations showed different dysferlin immunostaining at the sarcolemma. *Acta Neuropathol.* 104: 615–20.

Scherer PE, Lewis RY, Volonte D. (1997). Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 colocalize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J Biol Chem.* 272:29337-46.

Shorer Z, Philpot J, Muntoni F, Sewry C, Dubowitz V. (1995). Demyelinating peripheral neuropathy in merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *J Child Neurol.* 10: 472–5.

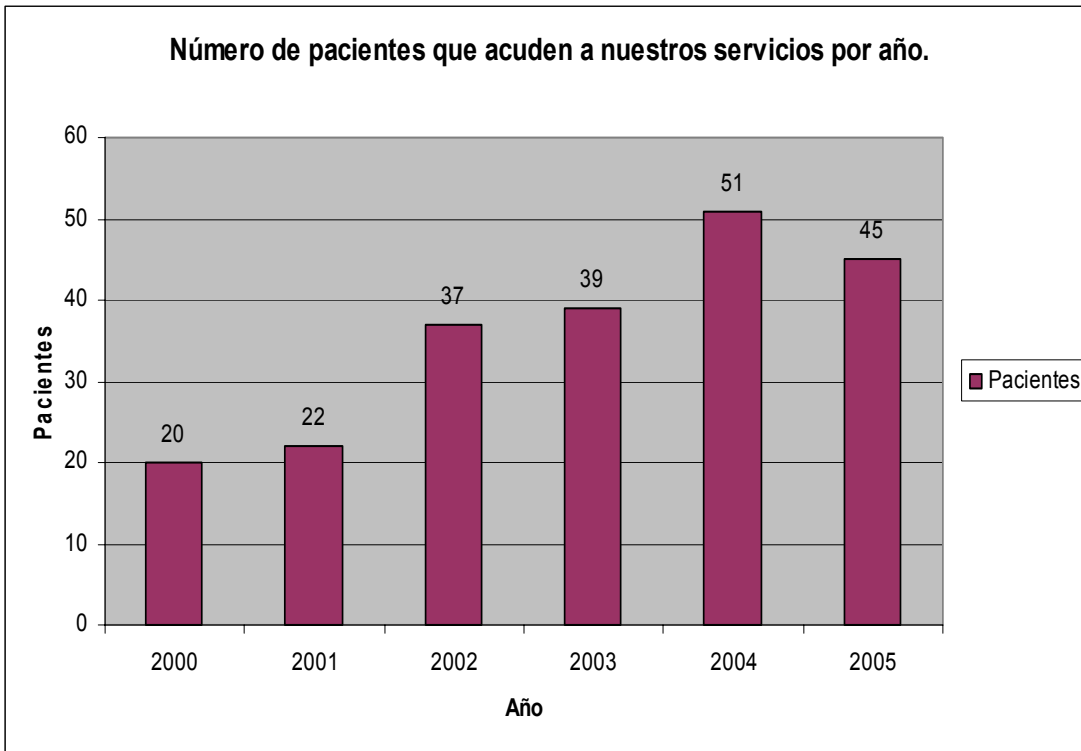
Silvia Repetto, Massimo Bado, Paolo Broda, Giuseppe Lucania, Emiliana Masetti, Federica Sotgia, Ilaria Carbone, Antonio Pavan, Eduardo Bonilla, Giuseppe Cordone, Michael P. Lisanti, and Carlo Minetti. (199). Increased Number of Caveolae and Caveolin-3 Overexpression in Duchenne Muscular Dystrophy *Biochemical and Biophysical Research Communications* **261**, 547–550

Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP. (1999). Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol.* 19:7289–7304.

Straub, V., Ettinger, A.J., Durbeej, M., Venzke, D.P., Cutshall, S., Sanes, J.R., Campbell, K.P., (1999). *J. Biol. Chem.* 274, 27989–27996.

- Straub V, Ettinger AJ, Durbeej M, Venzke DP, Cutshall S, Sanes J, Campbell, KP. (1999). Epsilon-sarcoglycan replaces alfa-sarcoglycan in smooth muscle to form a unique dystrophin-glycoprotein complex. *J. Biol. Chem.*, 274: 27989-27996
- Stuurmann N, Heins S, Aebi U. Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J Struct Biol* (1998) 122:42– 66.
- Urtasun M, Poza JJ, Gallano P, Lasa A, Sáez A, Cobo AM, et al. (1998). Distrofia muscular por déficit de la sub unidad α -sarcoglicano del complejo de proteínas relacionadas con la distrofina. *Med Clin*.110: 538-42.
- Tang, Z.-L., Scherer, P. E., Okamoto, T., Song, K., Chu, C., Kohtz, D. S., Nishimoto, I., Lodish, H. F. & Lisanti, M. P. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 2255–2261.
- Tennyson CN, Klamut HJ, Worton RG. (1995). The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced. *Nat Genet* 9:184-190.
- van Essen AJ, Busch HF, te Meerman GJ, ten Kate LP. (1992). Birth and population prevalence of Duchenne muscular dystrophy in The Netherlands. *Hum Genet* 88:258–266.
- Werneck LC, Bonilla E. (1990). Distrofina na diferenciacao das distrofias de Duchenne e Becker: Estudo Imuno-histoquímico comparado com o estadio clínico, enzimas séricas e biopsia muscular. *Arq neuropsiquiat* 48:454-464.
- Weiler T, Bashir R, Anderson LV, Davison K, Moss JA, Britton S, et al. (1999). Identical mutation in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B or Miyoshi myopathy suggests a role for modifier gene (s). *Hum Mol Genet.* 8: 871-7.
- Worton RG and Thompson MW. (1988). Genetics of the Duchenne Muscular Dystrophy. *Annu. Rev. Genet.*, 22: 601-629.
- Yang B, Jung D, Motto D, Meyer J, Koretzky G, Campbell KP. (1995). SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2. *J Biol Chem.* 270:11711–11714.
- Yoshida M, Ozawa E. (1990). Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma. *J Biochem (Tokyo)* 108:748–752.

11.- PERSPECTIVAS



Gráfica 5. Número de pacientes que acuden a nuestros servicios por año. Se canalizaron 214 pacientes en los últimos seis años siendo el 2004 el año que más número de pacientes recibimos (51).

En el laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Hospital de Pediatría de Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS, se pretende hacer un banco de biopsias musculares para que a futuro, en el caso de los pacientes que salieron normales en la expresión de las proteínas hasta ahora analizadas, se pueda buscar la deficiencias de otras proteínas relacionadas con distrofia muscular, y, en el caso de los pacientes que si se determinó la deficiencia, poder buscar la mutación o causa a nivel de DNA.

En la gráfica 5 se observa una tendencia de aumento en cada año lo que permitirá a futuro tener un mayor conocimiento sobre la incidencia de estas enfermedades en nuestro país.