



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA.

**“ANÁLISIS POR INMUNODETECCIÓN DE 8 PROTEÍNAS ASOCIADAS  
ASOCIADAS A DISTROFIA MUSCULAR EN PACIENTES  
DIAGNOSTICADOS CON ESTA ENFERMEDAD”.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGO**

P R E S E N T A :

**LLASNELY DEYANIRA  
ESCALANTE BAUTISTA.**

La presente Investigación se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular, de la Unidad de Investigación Médica de Genética Humana del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional S. XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.  
Bajo la tutoría del Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez.



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.

## *Dedicatoria:*

*A Mi familia:*

*Integrada por mi Mamá Irma Bautista Ramirez  
Mi papa Gerardo Escalante Vazquez y mí  
Hermanita Llaney Verenice Escalante Bautista.*

*Por el impulso que me dieron, para poder obtener el día de hoy este título que no fue fácil pero con ustedes, aligeraron más el esfuerzo, por tener una familia tan integrada y siempre tan alegre, por que solo hay una vida y con ustedes es maravillosa, por su apoyo tanto moral como económico, y por esto paro por millones de cosas mas lo quiero mucho.*

## *Agradecimientos.*

*En mi vida hay tantas personas a quien agradecer ya que me apoyaron, acompañaron o nos divertimos juntos gracias; A mi mamá por todo su apoyo, paciencia constancia en mi formación por reprenderme cuando lo considero necesario por quererme tanto y estar siempre cuando lo he necesitado gracias mil gracias mamá por que sin ti, sería muy difícil, por desvelarte conmigo y no dormiste hasta que acabara de estudiar si es que acababa, por ir por mí, por todos tus consejos, por levantarme el ánimo cuando sentía rendirme, por levantarte y sin excepción alguna darme el desayuno, por enseñarme a leer o las tablas que tanto te costaron te adoro mamá y esta es una de tantas metas que cumpliremos juntas por ti gracias.*

*A mi papá, por que tú me enseñaste la disciplina, paciencia, a tener unos zapatos impecables, a ser puntual, presentable, a no dejarme vencer y ser muy constante, no importando lo demás, a poner empeño a lo que realices, gracias papá por cargarme en tus hombros, para que yo llegara con los zapatitos limpios al kínder y peinarme con las trenzas chuecas para ir a la escuela, te quiero mucho mucho papá, por que tu trabajo no es fácil pero no importa, todo todo para tu familia, y este esfuerzo es parte de ti.*

*A mi hermana que es súper genial y con tu ángel impresionante, con su carácter, pero siempre para mí serás mi hermanita, por que tenía que ser el ejemplo, por que siempre que no le entiendas ahí estaré y cuando necesites, por jugar y jugar hasta ahora, por compartir tanto conmigo y cuando te he necesitado ahí haz estado te quiero mucho mucho hermanita.*

*A usted Dr. Coral por dejarme entrar a su equipo de trabajo por su paciencia y todas y cada una de sus enseñanzas, por que no importa la situación, siempre me comprendió y me considero, la admiración que le tengo por que aparte de realmente ocupar el nombre de investigador es una gran persona y ser humano, gracias por que aprendí mucho de usted.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México por que llegar a ti fue todo un logro y por que tú me enseñaste todo lo que soy en este momento, mi vida cambió radicalmente desde que llegue a ti gracias y a todos lo que han intervenido a mi formación especialmente a la Maestra. Macarita Calcaneo Garcés, que fue un punto clave para mi elección de carrera, a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, a todos mis profesores, sin excepción alguna, gracias por su paciencia, y aunque sea su trabajo lo hicieron con gusto esfuerzo, a la mejor universidad gracias.*

*A todos y cada uno de los miembros de el jurado: M en C. Eugenia Heres, M en C. Irma Dueñas, M. en C. Laura Castañeda, Dr. Diego Arenas Aranda Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez. Gracias por su tiempo dedicado en la revisión y contribución a este trabajo.*

*Al laboratorio de Genética Humana y a todos de cada uno de mis compañeros:*

*Alho maravillosa tan linda y calida conmigo por quererme tanto por resolverme mis dudas, ser una súper y mejor amiga sincera. Por ser mi staff de IEP Sofí tan cariñosa amiga te quiero por enseñarme y ser tú. Adrián que te puedo decir si eres súper y un regalo gracias por estar conmigo comer juntos, enojarnos, soportarme, enseñarme pero gracias sobre todo por quererme tanto.*

*A Benjas por que me brindaste tu amistad gracias, A la Biól. Francisca por apoyarme tanto, Jessi eres súper me brindaste tu amistad, Manolo y Chio por que los admiro son grandes compañeros, sinceros amigos, a vicky, Gabo, Bladi, Vero, Ruth, Dr. Rosa, Dr. Fernando, Charly, Israel, David Rojas, Saúl Neri, Ernesto, Alma, Felipe, Israel, Alicia, Luigui, Carmen Palacios por nuestro equipo de trabajo amistad y compañerismo.*

*A mis súper amigos de CCH; al Lic. Humberto mi gran amigo, Lic. Luís mi otro mejor amigo, mis grandes amigas la Enfermera Elsa, Edith Odontóloga, Edith Administradora, Fabi Bióloga por que eres alguien maravilloso que quiero mucho, Luís Ángel Odontólogo, Enrique el Prof. de Ingles, la Psicóloga Sara, la Veterinaria Etdna, Hugo el Economista y a toñito, la amistad tan firme por tantos años de amistad, su apoyo gracias amigos.*

*A mis amigos de la Facultad por años tan maravillosos que cursamos todos por nuestro grupo de amigos, que sigue igual desde que entramos a la carrera a Dennis por todo todo amiga, Claudia mi súper amiga por todas las travesuras por no juzgarme y brindarme tan linda amistad, Jessi mi vieja gracias, Kike por ser un buen amigo y compañero, Luigüi por ser tan compañero y muy buen amigo, Ricardo por que estuviste cuando mas te necesite, Jorge por enseñarme a bailar, Viris por ser tan divertida, Lulú por ser una buena amiga, Conny por ser tan linda y un ejemplo, Abraham por ser un ser maravilloso, y alguien tan lindo se merecía lo mismo gracias Paulina por tan amistad tan sólida, Cesar por ser un lindo, Laura por jugar fútbol, Argelia por ser un gran ser humano que me brindo una verdadera amistad, Aldo y Emmanuel por el equipo que formamos, a todos nuevamente gracias por la amistad, su apoyo fue esencial los quiero y admiro.*

*Sin olvidar a alas personas que me acompañaron en los diferentes trabajos donde pertencí: Mireya, Lesly, Marco Antonio Muños Muratalla por que fuiste parte importante y serás siempre en mi vida, Miguel Ángel Pineda Navarro por creer en mí, por brindarme tanta confianza y darme tantas y tantas enseñanzas, Héctor Flores, Ana Tagle, por todo su apoyo y su gran amistad cuando realmente lo necesite.*

*Gracias Federico Sánchez Vargas por que desde que te conocí el mundo de color cambio ¿Agradecerte? No acabaría pero gracias, por soportar mis berrinches, por quererme, por tu confianza, respeto, admiración, por todos los momentos tan maravillosos que compartimos juntos, sin exceptuar alguno, todo un caballero en toda la extensión de la palabra, te quiero mucho y espero siempre contar con tan maravillosa amistad gracias y a la vida por coincidir en un mismo tiempo y espacio.*

*Y al último pero no menos importante, al último lo mejor, Armando Alpizar por quererme, cuidarme y brindarme tanto apoyo, por que sin ti esto último hubiera*

*sido más complicado por que eres un gran ser humano que me lo haz demostrado continuamente, por que contigo los peores momentos de mi vida no supieron tan mal, por soportarme ¡claro! aunque digas lo que digas, por compartir momentos tan maravillosos, y esforzarte por mi, te quiero enormemente. Y seguramente la vida nos dejara coexistir por mucho más tiempo.*

*En mi actual trabajo por impulsarme por enseñarme Arturo mi jefe mi IMO gracias por creer en mi y la confianza que me tienes, Carlitos por que fuiste mi staff silencioso por que siempre estuviste ahí para cualquier cosa, tus consejos tu optimismo, Ing. Alvaro por apresurarme por quererme por impulsarme, Juan Carlos, Conta Ricardo, Ing. Velázquez por considerarme como una hija por confiar a Rosi tan linda a todos gracias por impulsarme y quererme los quiero enormemente.*

*Y a la ultima parte Mi hermoso Gap 142: primero al staff maravilloso que me Genere a Rubi la coordinación y de ahí a Martita Avilés, Mari Carmen, Liza, Juan Borrayo, Mar, Gina, Carlos y la capitana Soco por su paciencia por sus enseñanzas por lo que generamos muchas gracias por tanto amor.*

*Hijoles Bueno por gracias Betty, mi Lalo Hermoso, Jafred, Elsa, Ricardo, Laura, Omar, Héctor, Maria, Chaly, Puk, Rosa, Olimpia, Lety, Rulo, Paco, Mi súper Beto, Ale, Mi primer Buddy y amado Sergio que me conciente y ama, Marilú, Vanesa, Rocio, Rafa, Augusto, Citlalli, Magda, Luis (Doc.), Memo e Irasema por el equipo formado por lo que logramos y lo que lograremos los amo con todo mi ser se que siempre voy a contar con ustedes y ustedes conmigo, mi amada buddy mi alma gemela y complemento te amo gracias por todo mi gran amiga Sandy Portugues, AMEM siempre estaré con ustedes por Lulú eres todo un ejemplo y estoy súper orgullosa de ser voluntaria gracias por el amor, y por todo lo maravilloso que pasamos los amo con todo mi ser mis queridos hermanos gracias por todo. POR QUE NUNCA NOS TEDENEMOS POR QUE SOMOS DADORES DE AMOR Y ESTAMOS TRANSFORMANDO EL UNIVERSO, UNO CUATRO DOS, UNO CUATRO DOS GAP 142 GRACIAS LOS AMOOOO.....*

*Y por último gracias a un ser maravilloso que me encontré en mi camino mi Ángel que me ha impulsado que me ha enseñado que no hay barreras, por todo lo que fomentas en mi, por soportar mi alegría, mis berrinches, mi tristeza, melancolía, por impulsarme aventar la piedra más lejos, por consentirme tanto pero sobre todo gracias muchas gracias por quererme como lo haces, por que hoy los conocimientos que tengo en lo que trabajo, que me encanta, es gracias a ti, por tus consejos, eres para mi un pilar sin ti no seria Gap tu me impulsaste a pesar de los rechazos y desplantes que te realice tantas veces, ahí estuviste y sabes no te equivocaste, te debo tanto eres un ser extraordinario simplemente te amo Ignacio Reyes, mi mejor amigo y gran compañero, seguramente siempre lo serás no tengo como agradecer, siempre que me necesites ahí estaré.*

**“ANALISIS POR INMUNODETENCION DE 8 PROTEINAS  
ASOCIADAS A DISTROFIA MUSCULAR EN PACIENTES  
DIAGNOSTICADOS CON ESTA ENFERMEDAD”.**

**La presente Investigación se realizó en el Laboratorio de Genética  
Molecular, de la Unidad de Investigación Médica de Genética Humana  
del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional  
S. XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.  
Bajo la tutoría del Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez.**

## ÍNDICE.

ÍNDICE DE FIGURAS	08
ÍNDICE DE TABLAS	09
ÍNDICE DE GRAFICAS	10
ABREVIATURAS	11
1. INTRODUCCIÓN	14
1.1. Distrofias musculares	14
2. COMPLEJO DE GLICOPROTEÍNAS ASOCIADAS A DISTROFINA (DGC)	17
3. DISTROFINA Y DISTROFINOPATÍAS.	20
4. DISTROFIAS MUSCULARES DE CINTURAS (LGMS)	23
4.1. Sarcoglicano (SGS)	24
4.1.2. $\alpha$ - Sarcoglicano (LGMD 2D)	25
4.1.3. $\beta$ - Sarcoglicano (LGMD 2E)	26
4.1.4. $\gamma$ - Sarcoglicano (LGMD 2C) y $\delta$ - Sarcoglicano (LGMD 2F)	27
4.2. Disferlina	27
4.2.1. Disfelonopatías.	29
4.3. Calpaína-3.	30
4.3.1. Calpanopatías.	30
4.4. $\alpha$ -2 Laminina (Mereosina).	31
4.4.1. Merosinopatías	32
5. JUSTIFICACIÓN	33
6. HIPÓTESIS	34
7. OBJETIVO GENERAL	34
7.1. Objetivos Generales.	34
7.1. Objetivos particulares.	34
8. MATERIALES Y METODOS.	35
8.1. Pacientes.	35
8.2. Biopsias musculares.	35
8.3. Inmunofluorescencia indirecta.	37
8.4. Western blot.	39
8.4.1. Extracción de proteínas. (Método de Sonicación).	39
8.4.2. Cuantificación de proteínas por espectrofometría..	40
8.4.3. Separación electroforética de las proteínas.	40
8.4.4. Tinción con Azul de Coomassie.	41
8.4.5. Transferencia de las proteínas.	41
8.4.6. Identificación de la proteína calpaína-3.	41
8.4.7. Cuantificación de proteínas con el analizador de imágenes.	42
9. RESULTADOS	42
9.1. Resultados de la Inmufluorescencia indirecta	42
9.2. Western blot. Estandarización de inmunotransferencia para Calpaína -3 y la cadena pesada de Miosina (MHC).	52
9.3. Estudio de la integridad de las proteínas por Western blot	55
9.4. Resultado de la inmunotransferencia de los pacientes.	56
9.5. Estimación de la expresión de calpaína-3	57
10. DISCUSIÓN	60
11. CONCLUSIÓN	68

**ÍNDICE DE FIGURAS.**

Figura 1. Distribución de la debilidad muscular predominante En los diferentes tipos de distrofia muscular	16
Figura 2 Organización molecular integrales y periféricos de las Proteínas del DGC implicadas en distrofia muscular De músculo esquelético	18
Figura 3. Imagen del estudio de Inmunofluorescencia Indirecta del paciente 17.	46
Figura 4. Imagen del estudio de Inmunofluorescencia Indirecta del paciente 61.	47
Figura 5 Imagen del estudio de Inmunofluorescencia Indirecta del paciente 66.	48
Figura 6 Imagen del estudio de Inmunofluorescencia Indirecta del paciente 30.	49
Figura 7 Imagen del estudio de Inmunofluorescencia Indirecta del paciente 52.	50
Figura 8 Imagen del estudio de Inmunofluorescencia Indirecta del paciente 09.	51
Figura 9. Imagen del estudio de Inmunofluorescencia Indirecta del paciente 23.	52
Figura 10 Imagen del estudio de Inmunofluorescencia Indirecta del paciente 46.	53
Figura 11. Resultado de Inmunoelectrotransferencia de la estandarización para Calpaína 3 y MHC.	55
Figura 12. Tinción con Azul de Coomassie para las proteínas.	55
Figura 13. Resultados de la Inmunoelectrotransferencia.	56

## ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla. 1. Proteínas relacionadas con distrofias musculares	19
Tabla 2. Datos de los 66 pacientes analizados por Inmunofluorescencia Indirecta	35
Tabla 3. Preparación de diluciones de anticuerpos específicos	38
Tabla 4. Datos de los 16 pacientes analizados para la determinación de Calpaína 3 por medio de Inmunoelectrotransferencia	39
Tabla. 5. Anticuerpos empleados en la Inmunoelectrotransferencia	42
Tabla 6. Resultados del análisis por Inmunofluorescencia Indirecta	43
Tabla 7. Resumen de datos (inmunofluorescencia Indirecta).	53
Tabla 8. Resultado de los resultados obtenidos en el Analizador y a su vez los cálculos realizados.	57
Tabla 9. Resultados del análisis por Inmunoelectrotransferencia.	58
Tabla 10. Resultados del análisis por Inmunodetención y resultados de deficiencias de todas las proteínas analizadas.	61

## **ÍNDICE DE GRÁFICAS**

Grafica 1. Resultados de Inmunofluorescencia Indirecta.	34
Gráfica 2. Expresión de Calpaína 3 en pacientes analizados por Inmunoelectrotransferencia	59
Grafica 3. Resumen de resultados de la expresión de Calpaína 3 en pacientes analizados.	59
Gráfica 4. Representación de resultados de la expresión de todas las proteínas analizadas e incluidos los 66 pacientes.	62
Gráfica 5. Representación de resultados de la expresión de todas las proteínas analizadas en porcentajes observando el patrón de deficiencias de los 66 pacientes.	67

## ABREVIATURAS.

Abreviatura	Significado
ABC	Área bajo la curva
ABC C3	Área bajo la curva de Calpaína 3
ABC MHC	Área bajo la curva de la cadena pesada de Miosina
AD	Autosómica dominante
AD EDMD	Distrofia muscular de Emery-Dreifuss Autosómica Dominante
AR	Autosómica recesiva
BSA	Albumina Sérica Bovina
C3	Calpaína 3
C3/MHC C	Relación entre Calpaína 3 y Miosina del Control
C3/MHC P	Relación entre Calpaína 3 y Miosina del Paciente
CaM II	Cinasa dependiente de calcio-calmodulina tipo II
CAPN3	Gen que codifica para la proteína Calpaína-3
CAPV3	Gen que codifica para la proteína Caveolina 3
Cav 3	Caveolina 3
CMN	Centro Médico Nacional
COOH	Carboxilo
CPK	Fosfocreatincinasa
D.O. <sub>260</sub>	Densidad óptica a una longitud de onda de 260 nm
DAGI	Gen que codifica para las proteínas $\alpha$ -dístroglicano y $\beta$ -dístroglicano
DAPI	4',6'-diamino-2-fenilindol dihidrocloruro
DFEH	Distrofia fascioescapulohumeral
DG	Dístroglicano
DGC	Complejo de glicoproteínas asociadas a dístrofina
Dil	Dilución
Dis H1	Disferlina extremo carboxilo terminal
Dis H2	Disferlina extremo amino terminal
DM	Miopatía distal
DMAT	Miopatía distal com afección del compartimiento distal anterior
DMB	Distrofia muscular de Becker
DMC	Distrofia muscular congénita
DMD	Distrofia muscular de Duchenne
DMED	Distrofia muscular de Emery y Dreifuss
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dx	Diagnóstico
Dys 2	Dístrofina extremo carboxilo terminal
Dys 3	Dístrofina extremo amino terminal
DYSF	Gen que codifica para la proteína díserlina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMD	Gen que codifica para la proteína Emerina
EMG	Electromiografía
F	Femenino
Fig.	Figura

FKRP	Gen que codifica para la proteína relacionada con fukutina
FMDC	Distrofia muscular congénita Fukuyama
FSHD1	Distrofia muscular fascioescapulohumeral
FUKUTINA	Gen que codifica para la proteína fukutina
HCK	Hipercikemia
HCl	Ácido clorhídrico
HE	Hematoxilina-Eosina
HIM	Hospital Infantil de México
IDV	Integrated Density Value
IET	Inmunoelectrotransferencia
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INN y N	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
INP	Instituto Nacional de Pediatría
INR	Instituto Nacional de Rehabilitación
IQ	Coficiente intelectual
Kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
LAMA2	Gen que codifica para la proteína $\alpha$ 2-laminina
LGMD	Distrofia muscular de cintura
LMNA	Gen que codifica para las proteínas lámina A y lámina C
M	Masculino
mA	Mili Ampere
mdx	Ratón deficiente de distrofina
MHC	Cadena pesada de Miosina
MHC	Cadena pesada de Miosina
min	minutos
mL	mililitros
mM	micromolar
MM	Miopatía de Miyoshi
mRNA	Ácido ribonucléico mensajero
NH <sub>3</sub>	Amino
nNOS	Sintasa neural de óxido nítrico
OPMD	Distrofia muscular oculofaríngea
PBS	Amortiguador Salino de Fosfato
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RMD	Rippling Muscle Disease
rpm	Revoluciones por minuto
RS	Retículo sarcoplásmico
S. XXI	Siglo 21
SDS	Detergente de acción desnaturizante
seg	Segundos
SG	Sarcoglicano
SGCA	Gen que codifica para la proteína $\alpha$ -sarcoglicano
SGCB	Gen que codifica para la proteína $\beta$ -sarcoglicano
SGCD	Gen que codifica para la proteína $\delta$ -sarcoglicano
SGCG	Gen que codifica para la proteína $\gamma$ -sarcoglicano
SG-SSPN	Complejo sarcoglicano-sarcospan
SNC	Sistema nervioso central
SSPN	Proteína sarcospan
TBS	Amortiguador Salino Tris

TCAP	Gen que codifica para la proteína Teletonina
TEMED	N,N,N'N'-tetrametiletilendiamina
UR P	Unidades Relativas del paciente
WB	Western blot
X-EDMD	Distrofia muscular de Emery y Dreifuss ligada al cromosoma X
Xp21	Brazo corto del cromosoma X region 2 banda 1
$\alpha$ -DG	Proteína $\alpha$ -dístroglicano
$\alpha$ -SG	Proteína $\alpha$ -sarcoglicano
$\beta$ -DG	Proteína $\beta$ -dístroglicano
$\beta$ -SG	Proteína $\beta$ -sarcoglicano
$\gamma$ -SG	Proteína $\gamma$ -sarcoglicano
$\delta$ -SG	Proteína $\delta$ -sarcoglicano

## **1. INTRODUCCIÓN.**

### **1.1. Distrofias musculares.**

Las distrofias musculares están definidas como un grupo heterogéneo de desordenes miopáticos determinados genéticamente, caracterizados principalmente por la pérdida progresiva de músculo esquelético (Maidment y Ellis, 2002). Algunas de las características que se observan son: núcleos centrales, necrosis-regeneración de fibras, defectos en la permeabilidad de la membrana, y eventual infiltración de tejido conectivo y adiposo que al reemplazar a las miofibras, ocasiona debilidad muscular (Vainzof y Zatz, 2003).

Este grupo de enfermedades se conocen como miopatías primarias, en las que la afección se presenta en el músculo y se mantiene intacta la inervación, con un incremento en la gravedad de la enfermedad conforme aumenta el tejido conectivo y se pierde la capacidad intrínseca de regeneración de fibra muscular (Cohn y Campbell, 2000; Emery, 2002).

En la última década se han identificado un gran número de proteínas del sarcolema, de la matriz extracelular, de la sarcomera, del citosol, del núcleo y de la vía de glicosilación (Vainzof y Zatz 2003), cuya deficiencia se asocia al desarrollo de distrofias musculares que a la fecha ascienden a más de treinta. Esto ha conducido a un profundo cambio en la clasificación de las distrofias musculares, que toma en cuenta las características clínicas de la enfermedad y los hallazgos de la genética molecular. Con base en los grupos específicos de músculos que generalmente se ven afectados, se han delimitado 6 tipos de distrofias musculares (Figura 1):

A) Distrofia muscular de Duchenne/Becker (DMD/BMD) (distrofinopatías), la debilidad se manifiesta generalmente en los músculos proximales, las rodillas, las cinturas escapular y pélvica en la cual la debilidad en el extensor de la cadera es evidente (Prior y Bridgeman, 2005). Muchos pacientes con esta enfermedad tienen pantorrillas hipertrofiadas, sin embargo la hipertrofia de las pantorrillas también se observa en otros tipos de distrofias musculares (Zatz *et al*, 2003).

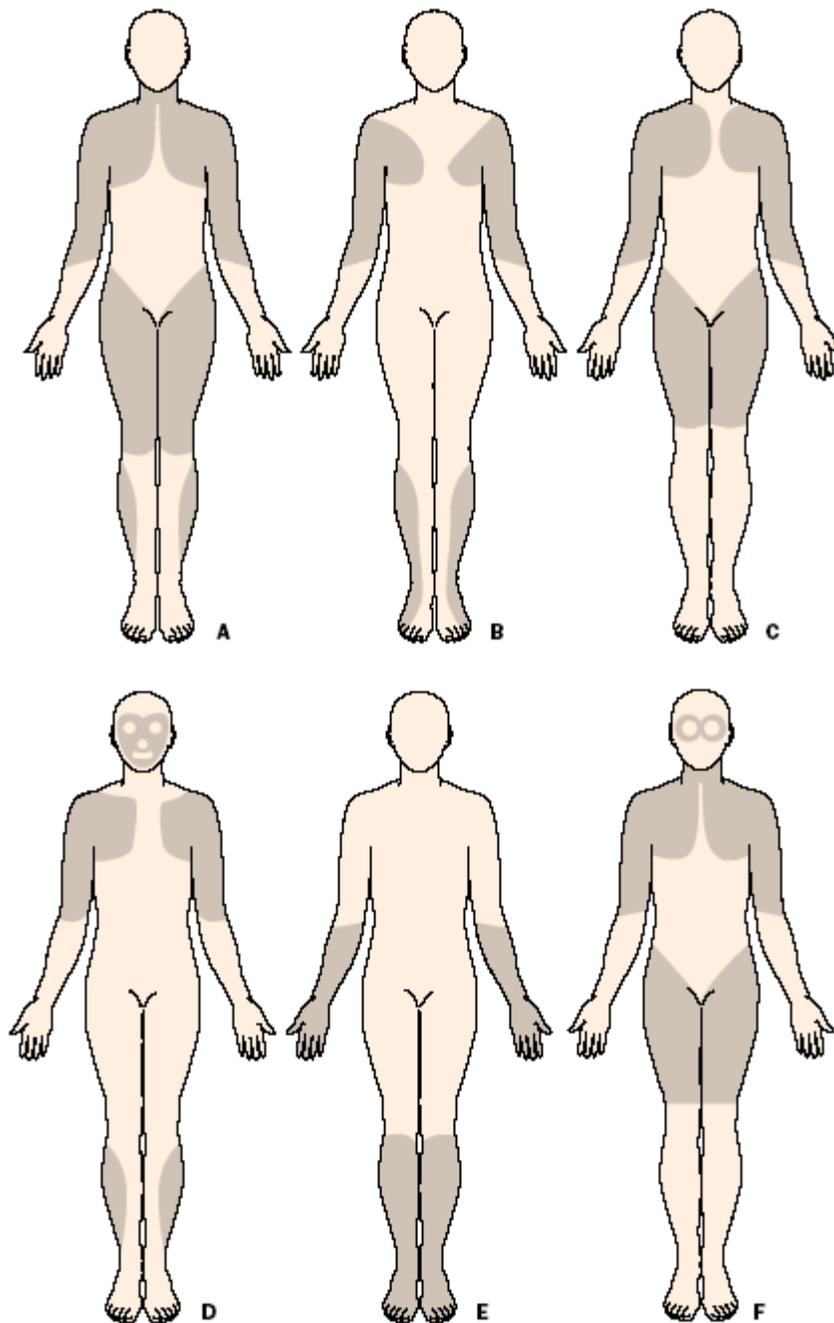
B) Distrofia muscular de Emery-Dreifuss. En este desorden se afectan el tendón de Aquiles, codos, los músculos con distribución humeroperoneal, proximal en los miembros superiores y distal en los inferiores (Bonne, 2003). En algunos casos hay una afectación final de la cintura pélvica (Manilal *et al*, 1998).

C) Distrofias musculares de cinturas. En estas enfermedades la debilidad se sitúa principalmente en los músculos proximales de las extremidades y en las cinturas pélvica y escapular (Zatz *et al*, 2003).

D) Distrofia muscular facioescapulohumeral. El nombre de este tipo de distrofia muscular deriva de los músculos que se ven inicialmente afectados, que son los de la cara y de la cintura escapular; posteriormente se afectan los músculos extensores de los pies y frecuentemente de la cintura pélvica (Zatz, 2002).

E) Distrofias musculares distales. La debilidad muscular es principalmente distal y en algunas ocasiones la cintura pélvica (Emery, 2002).

F) Distrofia oculofaríngea. Los músculos afectados son los extraoculares y los faciales superiores, y se presenta con debilidad en el cuello, en la musculatura proximal superior (y aún distal) de las extremidades, y de la cintura pélvica. La presencia de Ptosis (caída de los párpados) y disfagia (dificultad para tragar) son características frecuentes de esta enfermedad (Brais *et al*, 1998; Emery, 2002). A estos seis tipos de distrofia muscular se suma la distrofia muscular congénita, en la cual se detecta una afección generalizada (Jones *et al*, 2001).



**Figura 1.** Distribución de la debilidad muscular predominante en los diferentes tipos de distrofia muscular. a) Tipo Duchenne y Becker, b) Emery-Dreifuss, c) Cintura, d) Facioescapulohumeral, e) Distal, f) Oculofaringea. Reproducida de Emery Alan E H, 2002.

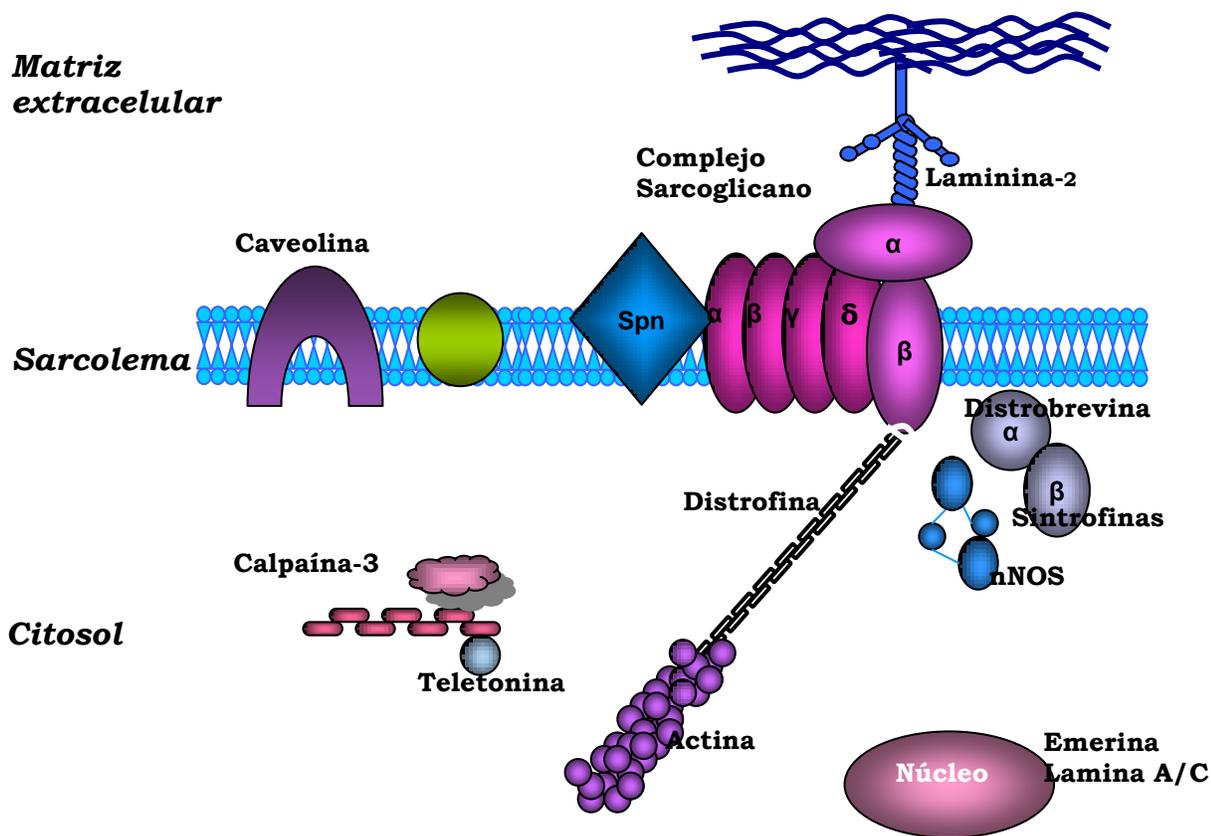
## **2. COMPLEJO DE GLICOPROTEÍNAS ASOCIADAS A DISTROFINA (DGC).**

El complejo distrofina-glicoproteínas (DGC, por sus siglas en inglés dystrophin glycoprotein complex) está constituido por proteínas integrales de membrana y periféricas, que establecen una unión entre el citoesqueleto y la matriz extracelular (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992; Crosbie et al., 1999). Por su ubicación, el DGC puede dividirse en tres conjuntos (Fig):

I.-El primer subcomplejo se ubica por debajo del sarcolema (subsarcolemal), estos componentes citoplasmáticos consisten proteínas periféricas intracelulares de la membrana como son distrofina, las sintrofinas  $\alpha$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ , la  $\alpha$ - distrobrevina y la sintasa 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.

II.-El segundo subcomplejo en el DGC esta compuesto por  $\alpha$ -dístroglicano ( $\alpha$ -DG) y  $\beta$ -dístroglicano ( $\beta$ -DG).  $\alpha$ -dístroglicano se une a  $\alpha$ -2-laminina (merosina) en la matriz extracelular mientras que  $\beta$ -dístroglicano, que es una proteína transmembranal, se une a la distrofina/utrofina a nivel intracelular. Recientemente se han encontrado diversos trastornos con un fenotipo de Distrofia Muscular Congenita. (DMC) relacionados con una deficiencia en la glicosilación de  $\alpha$ -DG (Costanza, 2005), esto se debe a una deficiencia en la actividad de la enzima que glicosila a  $\alpha$ -DG (Aruto, 2001). Esta enzima es codificada por el gen FKRP que codifica para la proteína Fukutina.

III.- El tercer subcomplejo del DGC denominado sarcoglicano-sarcospan (SG-SSPN) esta formado por un grupo de proteínas transmembranales llamadas sarcoglicanos (SG) ( $\alpha$  /  $\epsilon$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ) y la proteína sarcospan, el complejo SG-SSPN se encuentran unido a  $\beta$ -DG por su interacción con  $\delta$ -SG (Campbell, 1995; Blake *et al.*, 2002).



**Figura 2.** Organización molecular de los componentes integrales y periféricos del DGC y otras proteínas asociadas a distrofia muscular. Reproducido de Davies *et al.*, 2006 con modificaciones.

Se ha propuesto que el DGC mantiene la estabilidad y soporte mecánico al sarcolema durante la contracción y relajación de la fibra muscular, mediante el arreglo de las proteínas asociadas a dicho complejo, uniendo al citoesqueleto con la matriz extracelular. La ruptura de este complejo trae como consecuencia la degeneración de las miofibrillas, característico de las distrofias musculares asociadas al DGC.

Además se sugiere que el DGC puede también asumir funciones de señalización celular debido a su asociación con moléculas como la sintasa neuronal de óxido nítrico (nNOs) (Brenman *et al.*, 1995 y 1996), la proteína adaptadora de transducción de señales Grb2, (Yang *et al.*, 1995) y el regulador de la proteína cinasa dependiente de calcio-calmodulina (CaM II) (Anderson *et al.*, 1996) entre otras. El curso clínico de las distrofias musculares es altamente variable, oscilando de grave en algunas formas congénitas con rápida progresión, a formas leves con inicio tardío y curso lento.

Además existe una variabilidad clínica dentro de cada grupo, por lo que se han descrito nuevas entidades y diversos fenotipos para cada una de ellas. En la última década se han identificado un gran número de proteínas del sarcolema, matriz extracelular, sarcómera, citosol y núcleo (Vainzof y

Zatz, 2003) cuya deficiencia se asocia al desarrollo de distrofias musculares, que a la fecha ascienden a más de treinta. Es por ello que la clasificación de estas enfermedades se ha modificado y si bien se toma en cuenta su modo de herencia, edad de inicio y músculos involucrados (Cohn y Campbell, 2000) tiene mayor relevancia la identificación del gen y la proteína afectados de forma primaria (Tabla 1) (Guglieri *et al.*, 2005).

**Tabla 1. Proteínas relacionadas con distrofias musculares.** Localización subcelular y función. Reproducido de Guglieri *et al.* (2005) con modificaciones. LS = Localización subcelular; DGC = complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina; DG = distroglicano; DMD = distrofia muscular de Duchenne; BMD = distrofia muscular de Becker; AR = autosómica recesiva; AD = autosómica dominante; MDC = distrofia muscular congénita; LGMD = distrofia muscular de cintura.

Proteína	PM (kDa)	Localización subcelular	Gen	Locus	Función propuesta	Fenotipo clínico
<b>Distrofina</b>	247	Subsarcolema	DMD	Xp21	Mecánica (ayuda a la estabilización de la membrana) y señalización.	DMD/DMB
<b>Calpaína 3</b>	94	Citosol	CAPN3	15q15.1-q21.1	Actividad enzimática y remodelación del citoesqueleto.	LGMD2A
<b>Disferlina</b>	230	Sarcolema	DYSF	2p13.3-p13.1	Mecanismos de reparación de membrana.	LGMD 2B, MM, DMAT
<b><math>\alpha</math> SG</b>	50	Sarcolema	SGCA	17q12-q21.33	Estabilización del DGC.	LGMD 2D
<b><math>\beta</math> SG</b>	43	Sarcolema	SGCB	4q12	Estabilización del DGC.	LGMD 2E
<b><math>\gamma</math> SG</b>	35	Sarcolema	SGCG	13q12	Estabilización del DGC.	LGMD 2F
<b><math>\delta</math> SG</b>	35	Sarcolema	SGCD	5q33	Estabilización del DGC.	LGMD 2C
<b><math>\alpha</math>2-Laminina</b>	385	Matriz extracelular	LAMA2	6q2	Unión de $\alpha$ -DG con lámina basal.	MDC1A y una forma similar a LGMD

### **3. DISTROFINA Y DISTROFINOPATÍAS.**

En 1987 se consiguió localizar el gen de la DMD/B en el brazo corto del cromosoma X mediante una estrategia innovadora denominada clonación posicional (*positional cloning*) o genética inversa. Fue el descubrimiento del trabajo simultáneo de dos equipos con dos líneas de investigación diferente, una basada en anomalías detectables citogenéticamente y otra en análisis de ligamiento utilizando marcadores polimórficos (*restriction fragment length polymorphisms*). Para este estudio fue crucial el estudio de un niño que padecía de varias enfermedades (DMD, enfermedad granulomatosa crónica, rinitis pigmentaria y síndrome de McLeod) y una gran deleción en el cromosoma X, en el locus Xp21. Se logró estudiar el DNA de 1,346 varones con DMD o con DMB, llegándose a la detección de eliminaciones en un elevado porcentaje de casos, sugiriéndose que el gen tenía probablemente puntos calientes o *hots spots*.

Pocos meses después de la clonación del gen de DMD, se identificó la proteína responsable, a la que se le denominó distrofina y que está ausente en pacientes con DMD (Navarro y Teijeira, 2004).

A la clonación del gen de la DMD y la identificación de distrofina sucedió una cascada de acontecimientos que permitieron identificar nuevos genes y proteínas responsables de otras distrofias musculares menos frecuentes.

En 1989, Campbell y Kahl descubrieron que la distrofina se encontraba unida a un complejo oligomérico compuesto por varias glicoproteínas que se denominaron complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina (DGC), alteradas secundariamente en DMD. Según el modelo de organización propuesto por Ervasti y Campbell (1990), el DGC ligaba la actina del citoesqueleto con la matriz extracelular. Estudios posteriores mostraron que el DGC estaba compuesto por tres subcomplejos, como se mencionó anteriormente (Navarro y Teijeira, 2004) (Figura 2).

El gen de distrofina se localiza en Xp21 y posee 2,5 millones de pares de bases y 79 exones (0,6 % del gen). El RNAm de la distrofina codifica para una proteína de 427 kDa y 3.685 aminoácidos (Erazo-Torricelli, 2004). En la estructura de la distrofina se distinguen cuatro dominios: el NH<sub>3</sub> terminal, de estructura globular, el dominio central, llamado *rod domain* por su forma alargada, comprende 2,840 a.a. dispuestos en 24 repeticiones de aproximadamente 109 a.a. cada una. El dominio rico en cisteína está constituido por 280 a.a., de los cuales 15 son cisteínas; el último dominio de la distrofina es el COOH terminal y su secuencia es sólo comparable al de la utrofina y de la distrobrevina (Navarro y Teijeira, 2004).

La distrofina es una proteína de gran tamaño (427 kDa) que se expresa en el músculo liso y estriado, el corazón y el cerebro. Esta se localiza en la cara citoplasmática de la membrana, en posición subsarcolémica, anclada al extremo amino-terminal de la proteína del citoesqueleto f-actina, mientras que  $\beta$ -dístroglicano ( $\beta$ -DG) une a distrofina con  $\alpha$ -dístroglicano ( $\alpha$ -DG).

En la DMD/B se presentan eliminaciones, duplicaciones y mutaciones. Hay *hots spots* o puntos calientes mutacionales, que son los sitios más frecuentemente afectados, principalmente en dos ubicaciones: en la parte central (exones 45-55) y en la terminación 5' (exones 2-19), los fenotipos graves se relacionan con eliminaciones de los dominios cisteína y C-terminal (Erazo-Torricelli, 2004).

La existencia de estos *hots spots* permite detectar el 98-100 % de las eliminaciones mediante la amplificación de sólo 18 exones de los 79 que constituyen el gen de la distrofina en dos sets de PCR multiplex. Las diferentes mutaciones originan fenotipos de gravedad variable. Según la denominada “hipótesis de Mónaco” estas diferencias de expresión clínica, grave en la DMD y más leve en la DMB, estarían determinadas por la conservación o no de la pauta de lectura tras la mutación, y como consecuencia, la producción o no de distrofina (Monaco *et al.*, 1988).

En la DMB se mantiene la pauta de lectura (mutación *in-frame*) y se produce por una proteína semifuncional de diferente peso molecular, mientras que en la DMD, la mutación altera la pauta de lectura (mutación *frame-shift*), origina un *codon stop* y no se produce distrofina (Navarro y Teijeira, 2004).

Como las distrofinopatías son enfermedades ligadas al cromosoma X, se expresan en varones, siendo las mujeres portadoras (Engel *et al.*, 1994; Bushby *et al.*, 1991). Aproximadamente un 10% de las mujeres portadoras expresan la enfermedad en diferente medida, cuando se cumplen determinados supuestos. Los primeros supuestos se basan en la “Hipótesis de Lyon”.

Las funciones de la distrofina son fundamentalmente mecánicas, al ser parte de la unión del citoesqueleto y la matriz extracelular, y probablemente ayuda a la estabilización de la membrana durante la contracción-relajación muscular. Existe una proteína similar a la distrofina, la utrofina, que se ubica preferentemente en la unión neuromuscular y la mielina, pero se distribuye ampliamente en todos los tejidos (Erazo-Torricelli, 2004).

En la DMD, se reduce la expresión de los componentes del DGC incluidos los distroglicanos, las sintrofinas y los sarcoglicanos, como resultado de una deficiencia primaria de distrofina (Ervasti *et al.*, 1990; Ohlendieck y Campbell, 1991; Ohlendieck *et al.*, 1993).

La DMD presenta una frecuencia elevada de 1:3500 varones nacidos vivos, comienza entre los 2 y los 4 años con un retraso motor, marcha anormal, trastorno del lenguaje y del habla (Erazo-Torricelli, 2004), debilidad progresiva con dificultad para subir escaleras, frecuentes caídas además de una marcada hipertrofia en las pantorrillas (Vainzof y Zatz, 2003). La debilidad muscular en los pacientes se manifiesta generalmente en los músculos proximales, las rodillas, las cinturas escapular y pélvica en la cual es evidente la debilidad del músculo extensor de la cadera (Prior y Bridgeman, 2005). La degeneración progresiva del músculo causa la pérdida de ambulación alrededor de los 10 años y la muerte generalmente antes del final de la segunda década de vida debido a una falla cardíaca o respiratoria (Vainzof y Zatz, 2003). Estos pacientes tienen cierto grado de retraso mental, el 20% de ellos con un coeficiente intelectual (IQ) menor a 70.

La hipertrofia de las pantorrillas no es exclusiva de la DMD ya que también se ha observado en otros tipos de distrofias musculares. La neumonía complicada con problemas cardíacos es la principal causa de muerte, lo que sucede en la segunda década de vida (Emery, 2002).

Los niveles séricos de creatinina (CK) están muy elevados, en alrededor 30 veces los valores normales, aunque pueden alcanzar cifras mucho mayores, especialmente en las primeras etapas de la enfermedad. Otras enzimas que suelen mostrar niveles elevados son la piruvatocinasa, alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), lactato deshidrogenada (LDH), enolasa y otros.

En la DMB la distribución de la debilidad y pérdida muscular es similar a la DMD pero el curso de la enfermedad es menos grave que la DMD. En la DMB la frecuencia es de 1:20,000 varones. Su comienzo es variable, entre los 5 y 13 años de edad, el curso de la enfermedad es variable, incluye debilidad de cinturas, mialgias inducidas por el ejercicio. La pérdida de la ambulación se produce después de los 16 años, y la expectativa de vida supera los 40 años. La muerte se debe a miocardiopatía (Erazo-Torricelli, 2004). El signo de Gowers (Levantarse en cunclillas) es positivo en la DMD/B y la LGMD.

En ambas distrofias musculares Duchenne y Becker aproximadamente el 5-10% de las mujeres portadoras muestran cierto grado de debilidad muscular con pantorrillas hipertróficas. La debilidad muscular es frecuentemente asimétrica, se inicia en la niñez pero se hace evidente en la

edad adulta y puede progresar o permanecer estática. Sabiendo que la debilidad es esencialmente proximal, su diferenciación con respecto a la distrofia muscular de cinturas es importante para el asesoramiento genético. Algo muy relevante, es que las mujeres portadoras pueden desarrollar miocardiopatía dilatada sin debilidad muscular aparente (Emery, 2002).

#### **4. DISTROFIAS MUSCULARES DE CINTURAS (LGMD).**

En las distrofias musculares de cintura (LGMD por sus siglas en inglés, Limb-Girdle Muscular Dystrophy). La debilidad se sitúa principalmente en los músculos proximales de las extremidades. Es el grupo en donde existe una mayor heterogeneidad clínica y genética. A la fecha se han descrito genéticamente al menos 15 tipos diferentes. Las formas autosómicas dominantes son raras y menos graves que las autosómicas recesivas (Bushby, 2001). En la LGMD, la membrana muscular puede presentar también "fugas", dejando salir o entrar sustancias que deben permanecer en un lado u otro de la membrana.

Cuando las proteínas de la membrana se producen adecuadamente y se encuentran en sus posiciones normales, éstas pueden realizar también otras funciones esenciales en la célula; pero estas funciones pueden faltar cuando se encuentra ausente una o más proteínas. Sin embargo, no todas las proteínas musculares asociadas a la LGMD se encuentran en la membrana. Calpaína-3 se ubica en el citosol y la teletonina se encuentra en la sarcómera, que permite a la célula contraerse y relajarse. Varios de estos desordenes musculares se asocian con problemas cardíacos en los diferentes fenotipos clínicos (1B, 1D, 2C, 2E y 2F).

Esto se da por mutaciones en los genes que codifican para los sarcoglicanos (SG), disferlina y caveolina-3, teletonina, lamina A/C, emerina y calpaína-3. 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).

Se denominan distrofias musculares de cinturas o LGMD tipo 1 a las de herencia autosómica dominante y tipo 2 a las de herencia autosómica recesiva y se les designó una letra mayúscula en orden alfabético según la cronología de su descripción. Las formas dominantes son mucho menos frecuentes. Hasta el momento se han identificado 10 formas recesivas y 6 dominantes.

Clínicamente los niveles de CPK\* en las distrofias autosómicas recesivas, al igual que en la DMD están elevados y tienden a disminuir conforme progresa la enfermedad, mientras que en distrofias autosómicas dominantes los niveles pueden ser normales.

Las mutaciones en uno de los cuatro sarcoglicanos ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -SG) conduce a la pérdida de los otros sarcoglicanos y son responsables de 4 formas autosómicas recesivas de distrofia muscular: LGMD 2D, LGMD 2E, LGMD 2C y LGMD 2F respectivamente. Incluso en la distrofia muscular de Duchenne y Becker, en la cual el defecto primario está en el gen que codifica para distrofina, los sarcoglicanos están a menudo ausentes o reducidos significativamente, en la membrana con base a lo demostrado por estudios de inmunofluorescencia.

#### **4.1. Sarcoglicanos (SG).**

Los sarcoglicanos (SGs) son proteínas glicosiladas cuya estructura primaria consiste en un dominio corto intracelular, una región transmembranal única, y un dominio extracelular grande (Chan Yiu-mo *et al.*, 1998). La participación del subcomplejo sarcoglicano en pacientes con distrofia muscular caracterizada clínicamente como distrofia muscular autosómica recesiva de cintura (LGMD2, por las siglas en inglés autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy) ha sido establecida de forma incuestionable.

Entre las LGMD2 se han identificado cuatro subtipos ocasionados por mutaciones en las glicoproteínas sarcoglicanos: LGMD2D ( $\alpha$ -sarcoglicano) (Roberds *et al.*, 1994; McNally *et al.*, 1994); LGMD2E ( $\beta$ -sarcoglicano) (Lim *et al.*, 1995; Bonnemann *et al.*, 1995); LGMD2C ( $\gamma$ -sarcoglicano) (Noguchi *et al.*, 1995); LGMD2F ( $\delta$ -sarcoglicano) (Nigro *et al.*, 1996a; 1996b)].

Por lo anterior, estos subtipos de distrofias musculares se han llamado sarcoglicanopatías. Se sabe que en pacientes con alguna sarcoglicanopatía la ausencia de uno de los sarcoglicanos, lleva a la concomitante reducción o pérdida de los otros sarcoglicanos. Las causas descritas por las que un sarcoglicano puede estar ausente son las mutaciones en los genes que codifican específicamente a las proteínas:  $\alpha$ -SG,  $\beta$ -SG,  $\gamma$ -SG y  $\delta$ -SG

La función de los SG's no se conoce totalmente recientemente se ha acumulado evidencia que apunta a que son un mediador importante e independiente en la patología distrófica del músculo esquelético y en el corazón ya que podrían acoplar las señales mecánicas y químicas en el músculo liso (Estrada, 2005).

Se ha sugerido que los SGs refuerzan la estabilidad del DGC y que la deficiencia de éstos hace que la interacción de los componentes del complejo sea frágil (Matsumura *et al.*, 1999).

La consecuente fragilidad del puente entre la lámina basal y citoesqueleto causa defectos en la integridad del sarcolema que induce degeneración de la fibra muscular (Matsumura *et al.*, 1999). Bajo

la misma premisa, se ha propuesto que los SGs también podrían participar en la transducción de señales y/o como receptores de ligandos de la matriz extracelular (Matsumura *et al.*, 1999).

Con respecto a los SGs, se han publicado algunos casos de pacientes distróficos con mutaciones en  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ - SGs y cardiomiopatía (Moreira *et al.*, 1997; 1998; Melacini *et al.*, 1999; Barresi *et al.*, 2000). En este contexto, es importante mencionar que la expresión de  $\alpha$ - SG está restringida al músculo esquelético y cardíaco (Roberds *et al.*, 1994; Noguchi *et al.*, 1995); en contraste  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ - sarcoglicanos se expresan en otros tejidos incluyendo células del músculo liso (Lim *et al.*, 1995; Nigro *et al.*, 1996b; Barresi *et al.*, 2000).

El uso de modelos animales para estudiar a las distrofias musculares causadas por mutaciones en  $\delta$  y  $\beta$ -sarcoglicano han puesto de manifiesto la importancia del complejo SG en el músculo liso vascular. La pérdida del complejo en este tejido de los ratones causa alteración en la función vascular de las arterias coronarias, con presencia de constricciones que inducen eventos isquémicos intermitentes (Coral-Vázquez *et al.*, 1999, Durbeej *et al.*, 2000). Esto a su vez inicia el desarrollo de miocardiopatía, que se ve favorecida por la inestabilidad de la membrana del miocardiocito debido a la deficiencia del complejo SG-SSPN (Coral-Vázquez *et al.*, 1999; Cohn *et al.*, 2001).

#### **4.1.2. $\alpha$ - Sarcoglicano (LGMD 2D)**

El  $\alpha$ -SG, también llamado aldhalina, es una glicoproteína transmembranal de 50 kDa. El RNAm de  $\alpha$ -SG es abundante en músculo esquelético, también se encuentra en músculo cardíaco y pulmón aunque en niveles bajos. Está codificado por un gen de 18 kb y 8 exones situado en el cromosoma 17, locus 17q12-q21.33. La secuencia primaria de esta glicoproteína revela que al igual que  $\epsilon$ -SG es una proteína de tipo I, ya que su región  $\text{NH}_3$  terminal es extracelular. Posee una secuencia señal  $\text{NH}_3$  terminal, un dominio señal transmembranal, dos sitios predictivos de glicosilación en el lado  $\text{NH}_3$  y un sitio  $\text{COOH}$  terminal citoplasmático (Hack *et al.*, 2000) cabe mencionar que entre  $\alpha$ - y  $\epsilon$ -SG (sarcoglinano que se encuentra en membrana y no se ha encontrado relación con algún tipo de Distrofia Muscular) presentan una homología del 62 %.

El déficit primario de  $\alpha$ -SG origina la distrofia muscular  $\alpha$ -Sarcoglicanopatía o LGMD 2D. Las mutaciones en  $\alpha$ -SG son las más frecuentes y originan fenotipos menos graves, se observan menor expresión de la proteína (Eymard *et al.*, 1997). Existe un punto caliente en el exón 3, aunque la mayoría de las mutaciones ocurre en la secuencia codificadora del dominio extracelular de la

proteína. La mutación R77C es la más frecuente. El RNAm de  $\alpha$ -SG es abundante en músculo esquelético, también se encuentra en músculo cardíaco y pulmón aunque en niveles bajos.

Por lo general no hay afección cardíaca en la LGMD 2D, sin embargo se han reportado algunos casos, lo que sugiere que su función en músculo esquelético y cardíaco es diferente (Eymard *et al.*, 1997). El RNAm presente en músculo cardíaco es más corto que el de músculo esquelético y carece de la secuencia base que codifica para el dominio transmembranal, y por lo tanto su baja expresión en el músculo cardíaco podría explicar la baja disfunción cardíaca en los pacientes.

En la biopsia muscular se observa un patrón distrófico variable, en la Inmunohistoquímica es negativo para  $\alpha$ -SG, disminuido para los demás sarcoglicanos y prácticamente normal para distrofina, resultados que se corroboran con la Inmunolectrotransferencia (Navarro y Teijeira, 2004).

#### **4.1.3. $\beta$ - Sarcoglicano (LGMD 2E).**

El  $\beta$ -SG se expresa en músculo esquelético, cardíaco y liso, aunque su RNAm se puede encontrar en otros tejidos como el cerebro (Fougerousse *et al.*, 1998). El déficit de  $\beta$ -SG produce la LGMD 2E, descrita por primera vez en familias *amish* del sur de la India, con fenotipo heterogéneo, variabilidad intrafamiliar y mutación fundacional T151R en el cromosoma 4, locus 4q12. Se han descrito casos con sintomatología similar a la DMD y otros de comienzo en la edad adulta y deambulación independiente hasta la sexta década de la vida (Navarro y Teijeira, 2004). La afección cardíaca se presenta, especialmente en relación a las  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -sarcoglicanopatías (Bonnemann *et al.*, 2002; Emery, 2002). Particularmente las mutaciones *missense* (sin sentido) en  $\beta$ -SG pueden encontrarse en pacientes con un fenotipo severo y una ausencia casi completa de todos los sarcoglicanos de la membrana (Bonnemann *et al.*, 1996 y 1998).

#### **4.3.4. $\gamma$ - Sarcoglicano (LGMD 2C) y $\delta$ - Sarcoglicano (LGMD 2F)**

Los sarcoglicanos  $\gamma$  y  $\delta$  son glicoproteínas transmembranales que presentan una homología del 69% a nivel de aminoácidos y una homología del 58% a nivel de nucleótidos. Ambos tienen un peso molecular de 35 kDa. Ambos genes están compuestos de ocho exones separados extensamente y cruzan en menos de 100 Kb en el genoma. La frontera intrón-exon es conservada entre  $\delta$ -SG y  $\gamma$ -

SG. Por lo tanto estos dos genes podrían aparecer del evento de duplicación de un gen (McNally *et al.*, 1996; Nigro *et al.*, 1996). El  $\delta$ -SG es solamente un homólogo débil de  $\beta$ -SG, con más homología en el dominio extracelular (Hack *et al.*, 2000).

Los saroglicanos  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  tienen residuos de cisteína conservados en su parte COOH terminal que es extracelular (Hack *et al.*, 2000). Los dominios extracelulares de  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -SG son casi idénticos en longitud (225 a.a., 224 a.a. y 224 a.a., respectivamente).

El déficit de  $\delta$ -SG origina  $\delta$ -Sarcoglicanopatía o LGMD 2F, de la que se han descrito muy pocos casos debidos a mutaciones puntuales o a deleciones en el locus 5q33, todos ellos de fenotipo grave (Navarro y Teijeira, 2004). Puede observarse miocardiomiopatía dilatada exclusiva por mutaciones de  $\delta$ -Sarcoglicano (Moreira *et al.*, 1998; Bonnemann *et al.*, 2002). En LGMD 2F se ha observado una deficiencia secundaria de distrofina, lo cual sugiere que esta subunidad de SGs tiene una interacción más directa con distrofina (Vainzof *et al.*, 1999).

El  $\gamma$ -SG se encuentra exclusivamente en músculo esquelético y cardíaco (Hack *et al.*, 2000). En la  $\gamma$ -sarcoglicanopatía o LGMD 2C se han detectado mutaciones en los residuos de cisteína que se asocian a fenotipos severos (Moreira *et al.*, 1998). El gen que codifica a  $\gamma$ -SG se encuentra en el cromosoma 13, en el locus 13q12, se halló en el norte de África y en poblaciones de gitanos, todas ellas con un fenotipo clínico grave (Merlini *et al.*, 2000).

#### **4.2. Disferlina.**

La disferlina está codificada por el gen DYSF posee 55 exónes, que abarcan aproximadamente 150 kb de DNA genómico, se encuentra codificado en el cromosoma 2, en el locus 2p13.3-p13.1 (Vainzof y Zatz, 2003; Navarro y Teijeira, 2004). En el músculo esquelético se localiza en sarcolema y en vesículas citoplasmáticas. Atraviesa el sarcolema, interactúa con Caveolina 3, y está unida a la membrana plasmática por su dominio COOH terminal, pertenece a una familia (FER-1) caracterizadas por tener múltiples dominios hidrofílicos C2 como es la mioferlina, que también se expresa en músculo. La mioferlina se expresa en los mioblastos en una etapa anterior a la disferlina, que se expresa después de la fusión de los miotubos (Anderson *et al.*, 1999).

Las mutaciones de FER-1 tienen alteraciones en la fusión de organelos membranosos durante la organogénesis, se considera que la disferlina tiene un importante papel en la fusión de membrana y como reparadora de lesiones de membrana. Se ha demostrado experimentalmente que la disferlina

se acumula en los lugares de rotura de membrana en el músculo normal y que tiene un papel directo en el proceso fisiológico de su reparación (Bansal *et al.*, 2004; Hayashi, 2004).

También se puede detectar en sangre y piel (Vainzof y Zatz, 2003). Se trata de una proteína con distribución ubicua, cuya principal expresión se detecta en corazón, músculo esquelético y riñón. En músculo esquelético se localiza en el sarcolema y en las vesículas citoplásmicas. Participa en la reparación de daño en la membrana citoplasmática, en el tráfico de vesículas y en la fusión de membrana en células musculares, por lo que su deficiencia altera estas funciones (Bansal y Campbell, 2004). A pesar de que disferlina no es un componente integral del DGC, su distribución es alterada en distrofias musculares asociadas al DGC, en las cuales su expresión se encuentra disminuída en la membrana plasmática e incrementada en vesículas citoplásmicas (Piccolo *et al.*, 2000).

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

Se ha determinado un número elevado de mutaciones localizadas a lo largo de todo el gen sin puntos calientes definidos y sin poderse relacionar el tipo de mutación con un fenotipo clínico determinado. A pesar de esta heterogeneidad determinadas mutaciones se han asociado en la población japonesa a fenotipos graves de MM y otras a fenotipos más leves (Takahashi *et al.*, 2003).

La LGMD2B se hereda en forma autosómica recesiva. Originalmente estas miopatías se relacionaron como dos desórdenes distintos, debido a que se asignaron independientemente a la misma región del cromosoma 2p13 (Navarro y Teijeira, 2004).

#### **4.2.2. Disferlinopatías (LGMD 2B).**

Las disferlinopatías se expresan clínicamente en diversas formas, pero fundamentalmente en dos: una expresión proximal en la LGMD 2B y distal posterior en la miopatía de Miyoshi. La edad de inicio de la LGMD 2B es en la segunda o tercer década de vida. En las formas de predominio proximal, la musculatura periescapular se afecta muy poco, por lo cual las escápulas aladas no se observan en los estadios iniciales de la LGMD 2B (Illarioshkin *et al.*, 2000; Bushby, 2000), tiene

una progresión lenta de la debilidad proximal de la cintura pélvica y de hombros (Kawabe *et al.*, 2004).

En la Miopatía de Miyoshi (MM) destaca la atrofia precoz de los pantorrilas, que se presenta también, aunque en menor grado, en la LGMD 2B (Illarioshkin *et al.*, 2000; Bushby, 2000; Anderson *et al.*, 1999).

Se han identificado mutaciones fundadoras de disferlinopatías en judíos de Libia, Rusia y menonitas en Canadá. Sin embargo, no se encontró relación entre el genotipo y el fenotipo, y se observaron diversos cuadros clínicos producidos por la misma mutación (Bonnemann *et al.*, 2000; Weiler *et al.*, 1999; Bushby, 2000).

### 4.3. Calpaina-3.

La proteína Calpaina-3 (también conocida como p94) es una proteasa dependiente de calcio, específica de músculo esquelético, con un peso molecular de 94 kDa, y una función enzimática más que estructural. Calpaina-3 es un miembro de la familia de las calpaínas, que constituyen un grupo (14 miembros) de cisteína-proteasas no lisosomales, activadas por calcio intracelular, se expresan de manera ubicua o tejido-específico (Bartoli y Richard, 2004). Están implicadas en procesos de señalización, factores de transcripción, proteínas citoesqueléticas y apoptosis (Mohammad *et al.*, 2004). En tejido muscular se expresan principalmente tres diferentes calpaínas: las calpaínas ubicuas 1 y 2 (también llamadas ( $\mu$ ) mu- y m-, respectivamente) y Calpaina 3 que es altamente expresada en este tejido (Figura 2) (Bartoli y Richard, 2004).

Esta proteína presenta cuatro dominios; dominio I o NH<sub>3</sub> terminal, tiene un papel regulador, y no presenta ninguna homología a los dominios identificados en otras proteínas, el dominio II es el módulo proteolítico y es homólogo a la papaína, el dominio III, es un dominio de unión, cuya función se desconoce, pero probablemente podría estar implicada en el desplazamiento de Calpaina dependiente de Ca<sup>2+</sup> a la membrana y el dominio IV que une los iones Ca<sup>2+</sup>, es un dominio similar a calmodulina (Guglieri *et al.*, 2005; Bartoli y Richard, 2005).

Se ha demostrado que Calpaina 3 experimenta autólisis y genera un fragmento pequeño NH<sub>3</sub> terminal de 30kDa y un fragmento grande de COOH terminal cuyo tamaño va de 55 a 60 kDa. Las secuencias IS1 e IS2 son esenciales para la autólisis de Calpaina 3 (Sorimachi *et al.*, 1995); IS2 es también responsable de la interacción con titina, (también conocida como conectina, se encuentra localizada en el sarcómero (Chrobakova *et al.*, 2004; Bartoli y Richard, 2005).

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

#### 4.3.1. Calpainopatías (LGMD 2A).

La distrofia muscular de cinturas de tipo 2A (LGMD 2A), se identificó y se estudió clínica e histopatológicamente en una pequeña comunidad de la Isla de la Reunión, aislada geográfica y socialmente durante más de 100 años. Estudios genéticos posteriores identificaron el gen CAPN3,

localizado en el cromosoma 15, en el locus 15q15.1-q21.1, que codifica la proteína Calpaína 3, confirmando nuevos casos en la mayoría de los continentes.

LGMD 2A es la forma más frecuente de las Distrofias Musculares de Cinturas y es el primer ejemplo de distrofia muscular progresiva causada por un defecto enzimático y no por una proteína estructural (Taveau *et al.*, 2003).

El cuadro clínico de la LGMD 2A es relativamente homogéneo, debilidad muscular predominante en glúteos y aductores, contracturas tempranas del tendón de Aquiles (TA), escasas y tardías en otras articulaciones, afección tardía de la cintura escapular y de los músculos del tronco con escápula alada. En las Calpainopatías no se afecta la musculatura facial ni ocular, es rara la hipertrofia de pantorrillas.

Aunque el cuadro clínico es bastante homogéneo, la evolución y la gravedad del mismo son variables, perdiéndose la capacidad de la marcha independiente unos 10 ó 25 años después de los inicios de los síntomas. No existe cardiomiopatía, pero sí se ha llegado a observar una afectación de la musculatura respiratoria. En un inicio de la LGMD 2A se detectan niveles elevados de CPK, que se van normalizando con el transcurso de la enfermedad.

El diagnóstico por biopsia muscular es difícil, pues los anticuerpos ensayados hasta el momento no funcionan en inmunofluorescencia, debiéndose recurrir al Western blot, el en se distinguen tres bandas de 94, 60, y 30 kDa. En algunos casos la disminución de proteína es poco evidente, por lo que el estudio mutacional es obligado. También se ha descrito una reducción secundaria de calpaína-3 en otras distrofias musculares concretamente en disferlinopatías y en las LGMD2I y LDMD2J (Navarro y Teijeira, 2004).

#### **4.4. $\alpha$ 2-Laminina (Merosina).**

El gen de la merosina (localizado en el locus 6q22-23) es muy largo, y no contiene puntos calientes de mutaciones, por lo cual el estudio de ADN es difícil (Emery, 2002). Esta forma de distrofia muscular ligada al cromosoma 6 es la más frecuente de las Distrofias musculares congénitas (DMC).

Laminina  $\alpha$ 2 se ubica en la matriz extracelular, la cual proporciona reforzamiento a la membrana plasmática, contribuye a las propiedades elásticas de las fibras musculares, define el proceso de regeneración y regula eventos de señalización celular (Caldwell *et al.*, 1990). La unión entre  $\alpha$ -

distroglicano ( $\alpha$ -DG) y la lámina basal es mediada por lamininas. Estas son proteínas de matriz extracelular compuestas de tres diferentes cadenas homólogas de lamininas, una cadena pesada  $\alpha$  y dos cadenas ligeras,  $\beta$  y  $\gamma$ . En músculo esquelético la forma predominante es laminina 2 (también presente en sistema nervioso).

La deficiencia parcial o total de laminina  $\alpha$ 2 debida a mutaciones en el gen que la codifica (LAMA2), es responsable de la distrofia muscular congénita MDC1A (MDC por sus siglas en inglés Muscular Dystrophy Congenital). Cerca del 50% de los pacientes con distrofia muscular congénita muestran ausencia total o parcial de merosina lo que genera una dramática alteración e la arquitectura molecular de la membrana celular (Helbling *et al.*, 1995).

#### **4.4.1 Merosinopatías.**

Los niños con una deficiencia total de Merosina tienen debilidad muscular grave no progresiva, presentan hipotonía, debilidad, problemas respiratorios y trastornos alimentarios desde los primeros meses de vida. La mayoría no logra la marcha independiente. La enfermedad no avanza con el tiempo, por lo cual no se observa fallecimiento precoz. Aún cuando se han descrito casos con deficiencia parcial de laminina  $\alpha$ -2, asociados con fenotipos severos, estudios recientes muestran que, en particular, la ausencia parcial del dominio amino terminal de la cadena laminina  $\alpha$ -2 se puede asociar a formas menos severas de distrofia muscular comparadas con la forma clásica de MDC (Cohn y Campbell, 2000).

## 5. JUSTIFICACIÓN.

En México se han realizado estudios puntuales de las diferentes distrofias musculares mediante análisis de características clínicas, fisiológicas y moleculares. Están enfocados principalmente a la exploración y perfeccionamiento de las técnicas para detectar mutaciones en el gen de distrofina en pacientes mexicanos con DMD/BMD, así como en las portadoras de mutaciones del gen (Álvarez *et al.*, 1990; Álvarez *et al.*, 1994; Salamanca *et al.*, 1995; Arenas *et al.*, 1996; Coral *et al.*, 1997; Camelo *et al.*, 1997; Alcántara *et al.*, 1999).

Sin embargo, en el transcurso de este tiempo, se han ido identificando nuevos genes asociados a distrofias musculares que además de tener un patrón de herencia particular, difieren en cuanto a sus características moleculares, aunque también mutaciones en el mismo gen pueden dar lugar a fenotipos clínicos diferentes; esta variabilidad y similitud fenotípica entre las distrofias musculares dificulta el diagnóstico clínico preciso, por lo tanto, resulta urgente la implementación de una estrategia de diagnóstico preciso que permita el establecimiento de una correlación entre los aspectos clínicos y moleculares de la enfermedad.

Lo anterior ha propiciado que se busquen alternativas para mejorar el diagnóstico y la detección de las proteínas asociadas a la distrofia muscular mediante diversas técnicas como lo es la inmunohistoquímica indirecta y Western blot, mediante el empleo de anticuerpos específicos, dirigidos contra las principales proteínas involucradas (Distrofina,  $\alpha$ -SG,  $\beta$ -SG,  $\gamma$ -SG,  $\delta$ -SG, Disferlina y Merosina) en las distrofias musculares. Estas técnicas nos permiten detectar la(s) proteína(s) que se encuentra disminuida(s) o ausente(s), accediendo así a un diagnóstico más certero y confiable de la patología del paciente, de esta manera se ayuda a elegir un tratamiento adecuado para mejorar la calidad de vida además de auxiliar al asesoramiento genético correcto. Sin embargo, existe un gran número de pacientes sin diagnóstico preciso por la carencia de anticuerpos para todas las proteínas.

Por ello, es importante el estudio de calpaína-3, ya que esta proteína no hay anticuerpo que se pueda usar en ensayos inmunohistoquímicos, ya que esta se localiza en el citosol, la identificación debe realizarse mediante Western blot para ayudar a determinar la disminución o ausencia y así mismo ayudar a caracterizar la expresión de la proteína, ya que se considera que participa en la remodelación del citoesqueleto, y se sugiere que las mutaciones en el gen que la codifica (CAPN3), afectan la interacción proteína-interdominio o reducen su actividad catalítica al disminuir su sensibilidad a calcio.

## **6. HIPOTESIS.**

Los pacientes con cuadro clínico de distrofia muscular, tendrán ausencia o deficiencia en una o más de las proteínas analizadas.

## **7. OBJETIVOS.**

### **7.1 Objetivo General:**

- ❖ Analizar la expresión de las de 8 proteínas principales asociadas a distrofias musculares mediante las técnicas de Inmunofluorescencia Indirecta e Western blot en biopsias de músculo esquelético de pacientes que presentan un cuadro clínico de distrofia muscular.

### **7.2 Objetivos Particulares:**

- ❖ Identificar mediante Inmunofluorescencia Indirecta y anticuerpos monoclonales la expresión de las proteínas: Distrofina,  $\alpha$ -SG,  $\beta$ -SG,  $\gamma$ -SG,  $\delta$ -SG, Disferlina y  $\alpha$ 2-Laminina (Merosina), en biopsias de músculo esquelético, de pacientes con un cuadro clínico de distrofia muscular.
- ❖ Estandarizar la técnica de Western blot para calpaína-3.
- ❖ Cuantificar los niveles expresión de la proteína muscular Calpaína involucrada en la distrofia muscular de cinturas tipo 2A, mediante la técnica de Western blot, en pacientes con distrofia muscular, que en estudios previos de Inmunofluorescencia Indirecta no mostraron alteraciones en las proteínas analizadas.
- ❖ Contribuir con resultados para incorporarlos para una estadística relacionada con este tipo de desordenes para la población mexicana.

## 8.0 MATERIAL Y MÉTODOS.

### 8.1 Pacientes

Se analizaron 65 pacientes y se tomó como criterio de inclusión a personas que manifestaran un cuadro clínico relacionado con distrofia muscular, provenientes de las siguientes instituciones: Hospital de Pediatría del Centro Médico Siglo XXI-IMSS; del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS; Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Dr. Manuel Velasco Suárez; Instituto Nacional de Rehabilitación; Hospital Infantil de México; Centro Médico Nacional 20 de noviembre del ISSSTE; Centro Médico Nacional La Raza y Hospital General de México. En cada caso se recabaron antecedentes familiares y datos clínicos del paciente (Tabla 2).

### 8.2 Biopsias musculares

Con el previo consentimiento informado, se tomó una biopsia de músculo de cuádriceps o deltoides, de aproximadamente 1 cm ancho por 1cm de largo, las biopsias fueron montadas, en forma perpendicular, sobre un trozo de corcho (de esta forma se obtendrán criosecciones transversales de las fibras musculares) utilizando goma de tragacanto y fijadas en isopentano (2-Metilbutano, SIGMA) enseguida se congeló la biopsia en Nitrógeno líquido a  $-160\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se guardan a  $-85^{\circ}\text{C}$  para realizar posteriormente las criosecciones.

**Tabla 2.** Datos de los 66 pacientes analizados por Inmunofluorescencia Indirecta, M: Masculino; F: Femenino; Dx: Diagnóstico; D/N: Datos no proporcionados.

No.	EDAD	SEXO	DIAGNOSTICO	PROCEDENCIA
1	11a 5m	M	Posible DM	CMN La raza
2	52 años	F	Posible LGMD	INNyN
3	D/N	F	Posible LGMD	CMN siglo XXI
4	D/N	F	Posible LGMD	CMN siglo XXI
5	D/N	D/N	Posible DM	CMN siglo XXI
6	11 años	M	Posible DM	CMN siglo XXI
7	4 años	M	Posible LGMD	CMN siglo XXI
8	2a 9m	F	Posible LGMD	CMN siglo XXI
9	2m	F	Posible DM Congenita	CMN siglo XXI
10	D/N	M	Posible DM	CMN siglo XXI
11	4 años	M	Posible DM	CMN siglo XXI
12	8 años	M	Posible DM	CMN siglo XXI
13	3 años	M	Posible DMD/B	CMN siglo XXI
14	12 años	M	Posible DM	CMN siglo XXI

15	6 años	M	Posible DM	CMN siglo XXI
16	16 años	M	Posible DM	CMN siglo XXI
17	28 años	M	Posible DM	CMN La raza
18	9 años	M	Posible DM	CMN La raza
19	28 años	F	Posible LGMD	INNyN
20	D/N	F	Posible LGMD	INNyN
21	38 años	M	Posible DM	INNyN
22	7 años	M	Posible DM	INNyN
23	17 años	F	Posible LGMD	INNyN
24	17 años	M	Posible DM	INNyN
25	D/N	F	Posible LGMD	INNyN
26	19 años	F	Posible LGMD	INNyN
27	D/N	F	Posible LGMD	INNyN
28	7 años	M	Posible DM	CMN siglo XXI
29	2 años	M	DM Congenita	CMN La raza
30	14 años	M	Posible LGMD	CMN La raza
31	5a 3m	F	Posible LGMD	CMN siglo XXI
32	43 años	F	Posible LGMD	INNyN
33	D/N	F	Posible DMD/B	INNYN
34	41 años	F	Posible LGMD	INNYN
35	8 años	F	Posible LGMD	INNYN
36	D/N	M	Posible DM	INNYN
37	7 años	M	Posible DM	INNYN
38	15 años	M	Posible DM	INNYN
39	2 años	F	Posible LGMD	CMN La raza
40	2a 6m	F	Posible LGMD	HG Toluca
41	32 años	F	Posible LGMD	INR
42	53 años	M	Posible DMD/B	CMN siglo XXI
43	5 años	M	Posible DMD/B	IMMS Mexicalli
44	5 años	M	Posible DMD/B	CMN siglo XXI
45	4 años	M	Posible DM	INR
46	13 días	M	DM Congenita	INNYN
47	33 años	M	Posible DM	El Salvador
48	7 años	F	Posible LGMD	CMN La raza
49	7 años	M	Posible DM	HIN
50	7años	M	Posible DM	CMN La raza
51	8 años	F	Posible LGMD	CMN siglo XXI
52	4 años	M	Posible DM	CMN La raza

53	7a 3m	M	Posible DM	CMN siglo XXI
54	8 años	M	Posible DMD/B	CMN siglo XXI
55	D/N	D/N	Posible DM	IMMS Durango
56	D/N	F	Posible LGMD	INNYN
57	D/N	F	Posible LGMD	INNYN
58	9 años	M	Posible DMD/B	CMN siglo XXI
59	24 años	F	Posible LGMD	INR
60	15 años	M	Posible DM	CMN siglo XXI
61	33años	M	Posible LGMD	Hopital Juarez
62	4 años	M	Posible LGMD	CMN La raza
63	11 años	M	Posible LGMD	CMN La raza
64	8 años	M	Posible DMD/B	CMN La raza
65	7 años	M	Posible DMD/B	CMN La raza
66	5 años	M	Posible DMD/B	INR

### **8.3 Inmunofluorescencia indirecta.**

Se realizaron cortes transversales entre 7 y 8  $\mu\text{m}$  de grosor de las biopsias de músculo esquelético con un criostato MICROM HM550. Estos cortes se colocaron en portaobjetos previamente tratados con Poli-L-Lisina (SIGMA-ALDRICH), se colocaron 2 cortes de cada biopsia, incluyendo un control positivo (músculo esquelético sin alteraciones histológicas).

Para verificar que las criosecciones fueran transversales, antes de realizar la Inmunohistoquímica se tiñó una laminilla con Azul de metileno, que además permitió observar alteraciones en las fibras como la variación de tamaño, pérdida de fibras, infiltración de tejido adiposo y conectivo. Para la técnica de Inmunofluorescencia se utilizaron 65 biopsias de pacientes que inicialmente fueron diagnosticados con un cuadro clínico de distrofia muscular.

Simultáneamente se trataron controles de músculo esquelético, sin alteraciones histológicas, que donó el Servicio de Patología Neuromuscular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Las laminillas se colocan en un contenedor con un poco de agua en el fondo, para mantener la humedad y para eliminar la señal de fondo (señal inespecífica); los cortes se incubaron con solución bloqueadora, la cual se compone de albúmina sérica bovina (BSA) al 5% (SIGMA-Fracción V) y amortiguador de sales de fosfato de sodio (PBS 1X) durante una hora a temperatura ambiente.

Pasado este tiempo las muestras se incuban con el anticuerpo primario (Distrofina parte COOH y NH<sub>3</sub>,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -sarcoglicanos, Disferlina parte COOH y NH<sub>3</sub> y  $\alpha$ 2-laminina) (Tabla 3) correspondiente a 4°C toda la noche (12 a 18 hrs).

**Tabla 3.** Preparación de diluciones de anticuerpos específicos primarios y secundarios.

<b>Anticuerpo primario</b>	<b>Dilución</b>	<b>Anticuerpo Secundario</b>	<b>Dilución</b>
<b>Dys 2</b> (distrofina COOH terminal) (Novocastra)	1:200 en PBS 1x	CY-3 (cianina 3) cabra anti-ratón,	1:250 en PBS 1x
<b>Dys 3</b> (distrofina NH <sub>3</sub> terminal) (Novocastra)	1:200 en PBS 1x	CY-3 (cianina 3) cabra anti-ratón,	1:250 en PBS 1x
<b><math>\alpha</math>-SG</b> (Novocastra)	1:200 en PBS 1x	CY-3 (cianina 3) cabra anti-ratón,	1:250 en PBS 1x
<b><math>\beta</math>-SG</b> (Novocastra)	1:200 en PBS 1x	CY-3 (cianina 3) cabra anti-ratón,	1:250 en PBS 1x
<b><math>\gamma</math>-SG</b> (Novocastra)	1:200 en PBS 1x	CY-3 (cianina 3) cabra anti-ratón,	1:250 en PBS 1x
<b><math>\delta</math>-SG</b> (Novocastra)	1:200 en PBS 1x	CY-3 (cianina 3) cabra anti-ratón,	1:250 en PBS 1x
<b>Dis H1</b> (disferlina COOH terminal) (Novocastra)	1:150 en BSA 5%	CY-3 (cianina 3) cabra anti-ratón,	1:250 en PBS 1x
<b>Dis H2</b> (disferlina NH <sub>3</sub> terminal) (Novocastra)	1:150 en BSA 5%	CY-3 (cianina 3) cabra anti-ratón,	1:250 en PBS 1x
<b><math>\alpha</math>2-Laminina</b> (Chemicon)	1:5000 en PBS 1x	CY-3 (cianina 3) cabra anti-ratón,	1:250 en PBS 1x

Se incluye también un control negativo que después de ser bloqueado, en lugar del anticuerpo primario, se adiciona PBS 1x. Al término de este tiempo se realiza 1 lavado rápido y 4 lavados de 5 minutos cada uno, utilizando PBS 1x frío, posteriormente se incuban durante 1 hora con el anticuerpo secundario (CY-3 (cianina 3) cabra anti-ratón), transcurrido ese tiempo las laminillas se vuelven a lavar con PBS 1x frío: 1 lavado rápido y 4 lavados de 5 minutos cada uno. Se elimina el exceso de PBS 1x y se adiciona 10 $\mu$ l de Vecta Shield con DAPI (4',6'-diamino-2-fenilindol dihidroclorhidro), para mantener la fluorescencia y a su vez poder observar los núcleos de las fibras musculares, se colocaron cubreobjetos sobre las preparaciones que se sellaron con esmalte de uñas, protegidas de la luz y en refrigeración hasta ser observadas en el microscopio de fluorescencia (Carl-Zeiss, Axioplan II-Apotome) con un aumento de 40x, para finalmente ser fotografiadas.

#### 8.4 Western blot.

Para la técnica de Western blot se emplearon 16 biopsias de pacientes que en sus estudios previos de Inmunofluorescencia Indirecta no se observó deficiencia de ninguna de las proteínas analizadas (Distrofina,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -SG, Disferlina, Merosina, Caveolina 3, Teletonina, Lamina A/C y Emerina). Por lo que se prosiguió a realizar la Inmunoelectrotransferencia para así analizar la expresión Calpaína 3 (Tabla 4).

**Tabla 4.** Datos de los 12 pacientes analizados para la determinación de Calpaína 3 por medio Western blot, M: Masculino; F: Femenino; Dx: Diagnóstico; D/N: Datos no proporcionados.

<b>No</b>	<b>EDAD</b>	<b>SEXO</b>	<b>DX</b>	<b>PROCEDENCIA</b>
3	D/N	F	Posible LGMD	CMN siglo XXI
4	D/N	F	Posible LGMD	CMN siglo XXI
11	4 años	M	Posible DM	CMN siglo XXI
14	12 años	M	Posible DM	CMN siglo XXI
15	6 años	M	Posible DM	CMN siglo XXI
17	28 años	M	Posible DM	CMN La raza
19	28 años	F	Posible DM	INNfN
20	D/N	F	Posible LGMD	INNfN
22	7 años	M	Posible DM	INNfN
24	17 años	M	Posible LGMD	INNfN
25	D/N	F	Posible DM	INNfN
27	D/N	F	Posible DM	INNfN
28	7 años	M	Posible LGMD	CMN La raza
31	5 años	F	Posible LGMD	INNfN
33	43 años	F	Posible LGMD	INNfN
34	41 años	F	Posible LGMD	INNfN

#### **8.4.1 Extracción de proteínas (Método de Sonicación).**

Se obtuvieron 10 cortes de 6 $\mu$  en el criostato y se depositaron en un tubo Eppendorf de 1.5ml y se les adicionó 30 $\mu$ 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-mercapto/hetanol, 10% de glicerol, 0.0025% de azul de bromofenol e inhibidor de proteasas [Mini Complet, marca]). Posteriormente las muestras se sonicaron e incubaron durante 3 minutos a 100°C; por último, la muestra se centrifugó a 14000 rpm, durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante.

#### **8.4.2 Cuantificación de proteínas por espectrofotometría.**

Se procedió a realizar las lecturas utilizando el espectrofotómetro Ultrospec 2000 UV/Visible Spectrophotometer, en una dilución 1:50.

Adicionar en tubos eppendorf :

Para las muestras: 2 $\mu$ L de la extracción de proteína más 98 $\mu$ L de agua estéril. Para el blanco: 2 $\mu$ L de buffer de extracción de proteínas más 98 $\mu$ L de agua estéril. Leer la absorbancia a 280nm. Después de obtenidos los resultados de absorbancia, cuantificar la cantidad de proteína en cada muestra:

Ejemplo:

500 $\mu$ g \_\_\_\_\_ 1 D.O

X \_\_\_\_\_ 0.163

X = 81.5 $\mu$ g / 2 $\mu$ L = 40.75 $\mu$ g de proteína/  $\mu$ L de muestra

Y hacer los cálculos para cargar en cada pozo del gel, aproximadamente 180  $\mu$ g de proteína. Esto con el objetivo de que en la tinción de Coomassie observemos uniformidad en la cantidad de proteína, de cada una de las muestras, incluyendo el control positivo. En cada pozo se cargó un volumen final de 9  $\mu$ L de cada muestra con colorante.

#### **8.4.3 Separación electroforética de las proteínas.**

Mediante la técnica de inmunoelectrotransferencia (Towbin *et al.*, 1979) se realizó en un gel separador de poliacrilamida al 6% (30% acrilamida-8% bis-acrilamida, regulador de desarrollo 1X, agua desionizada, persulfato y TEMED) unido a un gel concentrador al 4% (30% acrilamida-8% bis-acrilamida, regulador concentrador 1X, agua desionizada, persulfato y TEMED). Se deja polimerizar y se calienta la proteína a 90 °C durante 3 minutos posteriormente se carga en cada pozo del gel un volumen de 9 $\mu$ l de cada muestra con colorante, también se deberá cargar un control positivo (biopsia sin alteraciones histológicas) y el marcador de proteínas, de este último se carga de 2.5 a 3.0 $\mu$ L. Se deja correr el gel a 200 volts durante 45 a 60min, a temperatura ambiente.

#### **8.4.4 Tinción con Azul de Coomassie.**

Una vez separadas las proteínas, el gel se coloca en un recipiente de vidrio con azul de Coomassie, se deja reposar unos 15min, se coloca el gel en otro recipiente y se adiciona agua, después se calienta en el horno de microondas durante 10min aproximadamente, para eliminar el exceso de colorante. Se observa la semejanza con respecto a la cantidad de proteína, en cada

caso, para determinar si se requiere mayor cantidad de muestra. Con base a esto se prepara otro gel en el que la uniformidad entre las muestras sea más óptima.

#### **8.4.5 Transferencia de Proteínas.**

Transcurrido el tiempo de la separación de proteínas en el gel, se lleva a cabo la transferencia de las mismas a una membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Bistec, Germany) a 300 mA durante 3 horas, y 4°C, posteriormente se tiñe la membrana con Rojo Ponceau para confirmar la transferencia de proteínas.

#### **8.4.6 Identificación de la proteína calpaína-3.**

Para normalizar la carga de proteínas se utilizó como marcado la cadena pesada de Miosina (MHC). Por lo tanto se emplean dos fragmentos de la membrana: uno para la identificación de Calpaína 3 y otra para MHC.

Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con leche descremada al 5% (Svelty en polvo, Nestle) en PBS-Tween 20 al 0.3% (NaCl 137mM, KCl 2.7mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 4.3mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.4mM) durante 1 hora, a temperatura ambiente y en agitación. Se incubaron con el anticuerpo primario para calpaína-3 (VP-C304, Vector Laboratories) en una dilución 1:100 en PBS-Tween 20 al 0.3% y para la cadena pesada de miosina, se utilizó el anticuerpo MHC (H-300, Santa Cruz Biotechnology) en una dilución 1:1000 PBS-Tween 20 al 0.3%, a 4°C, durante 16 horas y en agitación.

Se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 al 0.3% de 5, 10 y 15 minutos respectivamente, en agitación y a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón y anti-conejo, para calpaína-3 y MHC respectivamente, acoplado con la enzima peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology) en una dilución 1:5000 en PBS-Tween 20 al 0.3% durante una hora. Se adicionó el reactivo quimiolumincente Luminol-Peroxido (SuperSignal<sup>®</sup>, PIERCE) en relación volumétrica 1:1. Posteriormente, en el cuarto oscuro, se expusieron sobre las membranas tiras de placa para revelado (Kodak, BioMax Light Film) (el tiempo de exposición para Calpaína 3 es de 5 min y para MHC es de 30 seg) se sumergen en la solución del revelador y posteriormente a la solución fijadora y finalmente en agua. Las bandas observadas en las placas son las correspondientes al peso de cada proteína, (Tabla 5).

**Tabla 5.** Anticuerpos empleados en la Western blot.

<b>Anticuerpo Primario</b>	<b>Dilución</b>	<b>Anticuerpo Secundario</b>	<b>Dilución</b>
<b>Calpaína 3</b> (VP-C304, Vector Laboratorios)	1: 100 en PBS-Tween 20 al 0.3%	Anti-ratón acoplado a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology)	1: 5000 en PBS-Tween 20 al 0.3%
<b>Miosina (MHC)</b> (H-300, Santa Cruz Biotechnology)	1: 1000 en PBS-Tween 20 al 0.3%	Anti-conejo acoplado a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology)	1: 5000 en PBS-Tween 20 al 0.3%

#### **8.4.7 Cuantificación de proteínas con el analizador de imágenes (Densitometría).**

La cuantificación se llevó a cabo en el analizador de imágenes (AlphaMAGE Light Cabinet, Alpha Ease<sup>R</sup> FC Software, Versión 4.1) donde se midió el área bajo la curva de las bandas correspondientes a Calpaína 3 que es la proteína de interés y la cadena pesada de Miosina (MHC) que es la proteína utilizada para normalizar los datos. Para cada paciente se obtuvo la relación de Calpaína 3 y MHC, para posteriormente hacer la comparación con la relación que se obtuvo del control y finalmente obtener el porcentaje de disminución.

## **9.0 RESULTADOS.**

### **9.1 Resultados de Inmunofluorescencia Indirecta.**

De las 66 biopsias analizadas por inmunofluorescencia: 30 pacientes mostraron una expresión normal de las proteínas analizadas (Dys 2, Dys 3,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -,  $\gamma$ - SG, Dis H1, Dis H2 y  $\alpha$ 2-Laminina), como se observa en la figura 4 y 3, de los cuales 17 son pacientes femeninas sus edades oscilan de 2 años a 48 y 13 pacientes masculinos, con edades dentro de un rango muy amplio entre 7 a 35 años. En 6 de estas biopsias no se realizó la técnica ya que no presentaban fibras musculares, solo había de tejido adiposo. Cabe mencionar que todos los pacientes tenían datos compatibles con algún tipo de Distrofia Muscular.

Veintiún pacientes mostraron una deficiencia o ausencia total de Distrofina, cuyo diagnóstico para todos ellos era de DMD/B. Ocho pacientes mostraron una deficiencia total de la proteína de la parte COOH o NH<sub>3</sub> concordando con la Distrofia Muscular de Duchenne como se observa en la figura 5, 12 de estos pacientes presentaron una disminución en dicha proteína correspondiendo con la Distrofia Muscular de Becker se representa en la figura 6, en su totalidad de las muestras presentaron una deficiencia secundaria en Disferlina o en alguno de los Sarcoglicanos, cuyos síntomas podemos generalizar; con síntomas muy marcados, presentaban altos niveles de CPK, dificultades para levantarse, una marcha limitada, contrariedad para realizar esfuerzos como abrir algún frasco o cargar objetos pesados, caídas frecuentes, la mayoría son pacientes masculinos, solo una niña presentó una disminución total de Distrofina como se observa en la figura 8, mostraron los síntomas en la primera década de la vida, hay gran presencia de tejido adiposo, histológicamente se observan núcleos centrales o tejido multinucleado con fibras irregulares,

En segundo lugar por esta técnica se observaron 8 pacientes con una deficiencia en la proteína Disferlina con un diagnóstico certero de los cuales 6 son de género femenino y solo 2 de género masculino con un rango de edades de 2 años a 52 años, esta afección fue proporcional con la edad, el síntoma más generalizado fue dificultad para la marcha, presentaron mialgias y también se observaron una muy ligera disminución en los sarcoglicanos se representa este caso en la figura 9.

Cabe mencionar que no se observó ningún paciente con una deficiencia en alguno de los Sarcoglicanos. Y Por último solo un paciente de días de nacido cuyos antecedentes familiares fueron la causa para la petición de dicho estudio, en donde mostró una marcada disminución en la proteína Merosina, se aprecia en la figura 10.

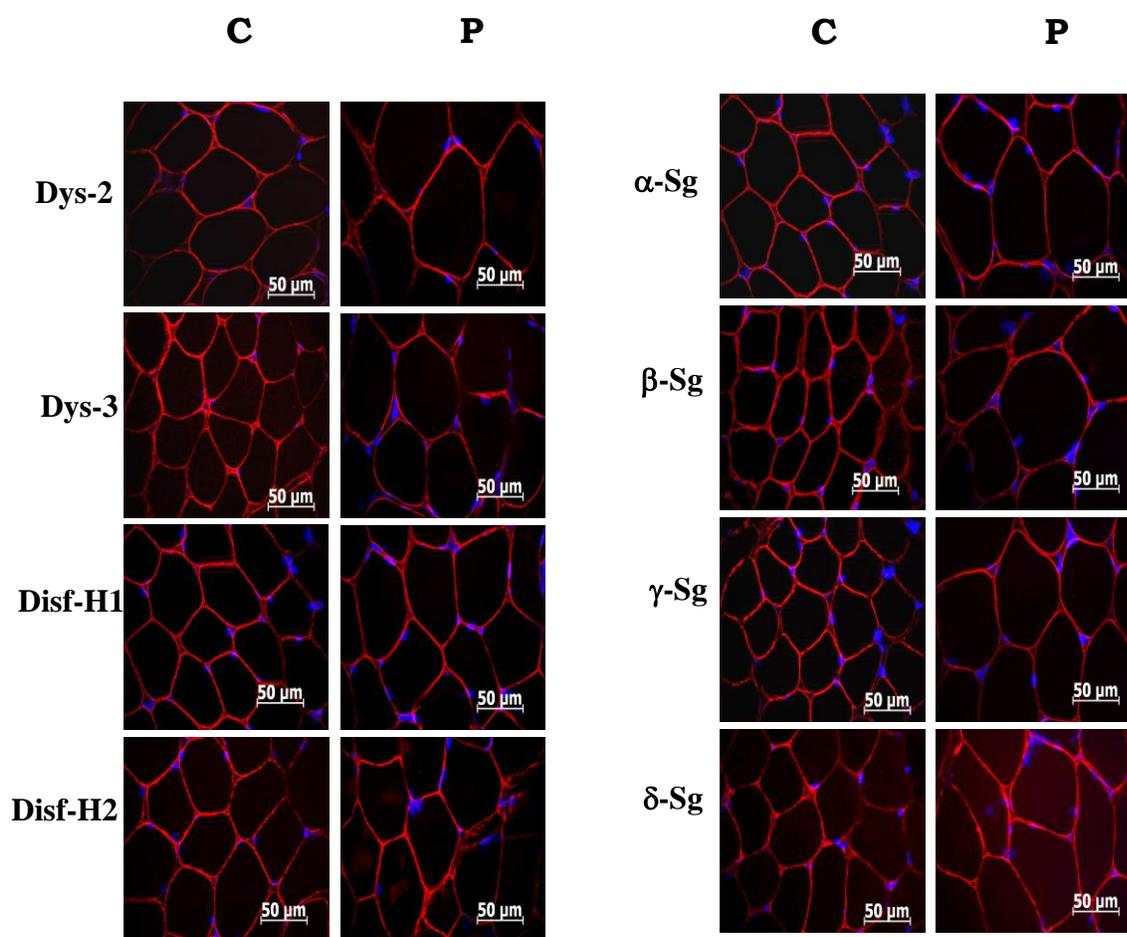
La tabla 6 presenta un resumen de todos los resultados y las imágenes de los pacientes del caso más representativo.

**Tabla 6.** Resultados del análisis por Inmunofluorescencia Indirecta, +++ = normal ++ = deficiente + = muy deficiente --- = negativo, Dys 2 (distrofina parte COOH terminal), Dys 3 (distrofina parte NH<sub>2</sub> terminal), α-SG (alfa sarcoglicano), β-SG (beta sarcoglicano), γ-SG (gama sarcoglicano), δ-SG (delta sarcoglicano), Dis H1 (disferlina parte COOH Terminal), Dis H2 (disferlina parte NH<sub>3</sub> terminal) y α2-laminina (alfa, dos laminina).

<b>Biopsia</b>	<b>Dys 2</b>	<b>Dys 3</b>	<b>α-SG</b>	<b>β-SG</b>	<b>γ-SG</b>	<b>δ-SG</b>	<b>Dis H1</b>	<b>Dis H2</b>	<b>α2-Laminina</b>
1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++
2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+++
3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
5	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T
6	++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
7	++	+	++	+++	+++	++	+++	+++	+++
8	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T
9	---	---	+++	++	+++	++	++	++	+++
10	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
11	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
12	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+++
13	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
14	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
15	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
16	++	+	++	+++	+++	++	+++	+++	+++
17	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
18	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
19	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
20	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
21	++	++	+++	++	+++	++	++	++	+++
22	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
23	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+++
24	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
25	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
26	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++
27	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
28	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
29	---	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
30	---	+	++	+++	+++	+++	++	++	+++

31	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
32	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	+++
33	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
34	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
35	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
36	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
37	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
38	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
39	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
40	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++
41	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
42	N/T								
43	N/T								
44	+	+	+++	+++	+++	+++	++	++	+++
45	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
46	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
47	N/T								
48	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
49	---	++	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
50	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
51	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
52	---	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
53	---	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
54	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
55	N/T								
56	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
57	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
58	+	---	+++	+++	+++	+++	---	+	+++
59	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+++
60	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
61	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
62	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
63	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
64	++	+	++	+++	+++	+++	+	+	+++
65	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++
66	---	---	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

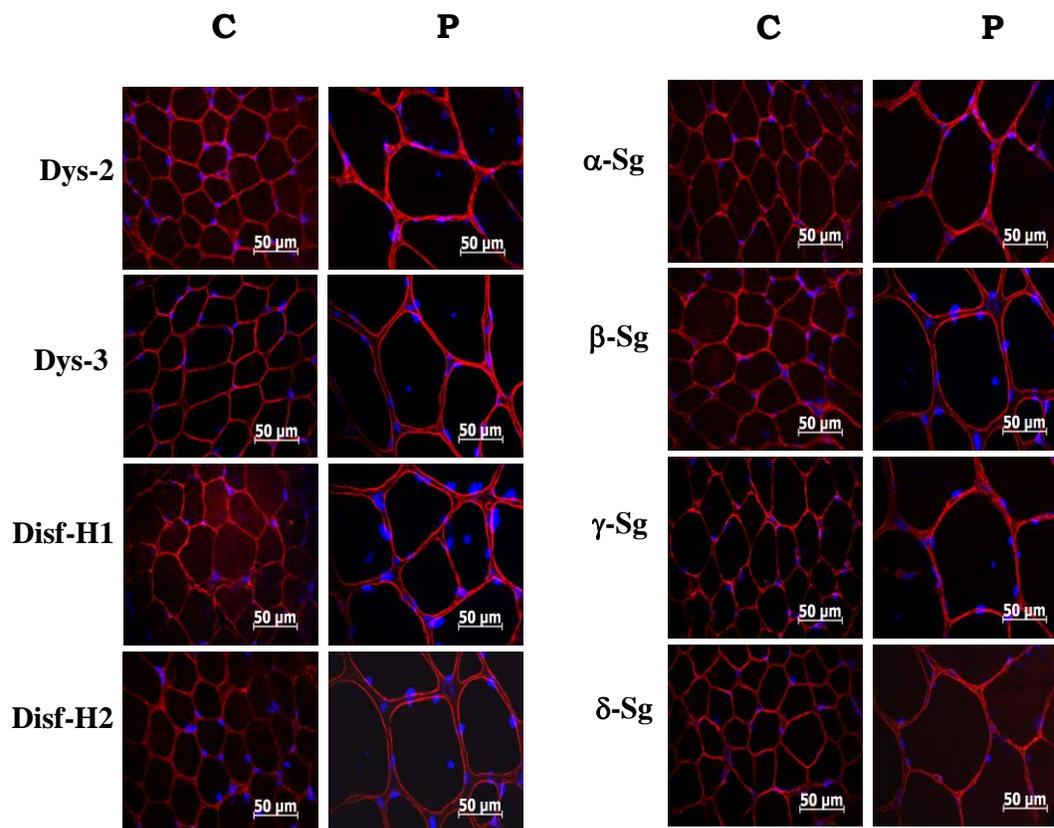
Uno de estos casos se describe a continuación: un paciente masculino de 28 años de edad (paciente 17), sin antecedentes de importancia para su padecimiento actual sus padres no presentan consanguinidad, desarrollo psicomotor normal, el paciente muestra un cuadro clínico de distrofia muscular, curso crónico de 1 año de evolución presentó inicio de síntomas como, lentitud para correr, subir escaleras, levantarse de una silla, levantarse de cuclillas, limitación del perímetro de la marcha, dificultad para cargar peso, abrir frascos. En el estudio de inmunohistoquímica realizado no presentó ninguna deficiencia de las proteínas analizadas.



**Figura 3.** Imagen del estudio de Inmunofluorescencia Indirecta del paciente 17. Criosecciones de músculo esquelético normal y del paciente se tiñeron con anticuerpos dirigidos a Dys 2 (distrofina parte COOH terminal), Dys 3 (distrofina parte NH<sub>3</sub> terminal),  $\alpha$ -SG (alfa sarcoglicano),  $\beta$ -SG (beta sarcoglicano),  $\gamma$ -SG (gama sarcoglicano),  $\delta$ -SG (delta sarcoglicano), Disf H1 (disferlina parte COOH Terminal), Disf H2 (disferlina parte NH<sub>3</sub> terminal), C (control), P (paciente). Se observa una expresión normal (+++) de las proteínas analizadas.

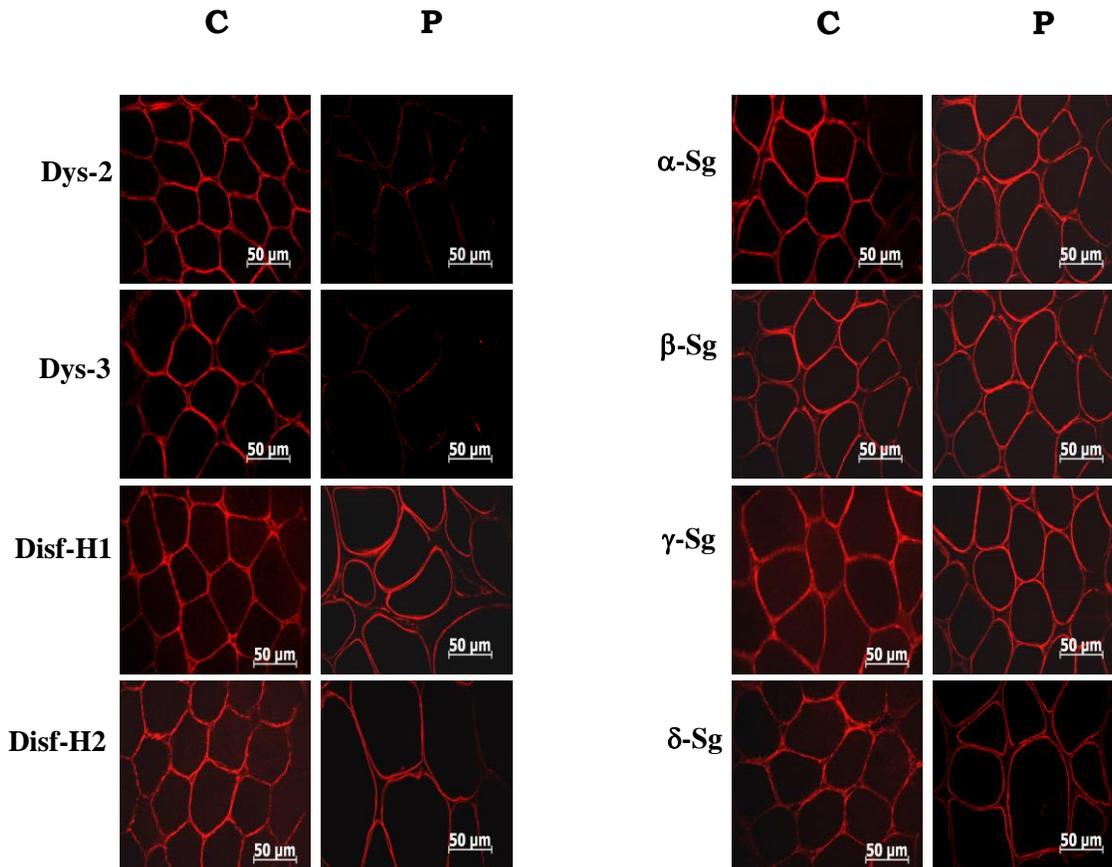
Paciente Femenino de 33 años de edad (61), sin antecedentes de importancia para su padecimiento actual sus padres no presentan consanguinidad, desarrollo psicomotor normal, el paciente muestra un cuadro clínico de distrofia muscular, curso crónico de 1 año de evolución, presentó inicio de síntomas como: presentar disminución de la fuerza muscular, de el miembro

pélvico izquierdo, posteriormente presento dolor que se irradia del cinturón. En el estudio de inmunohistoquímica realizado no presentó ninguna deficiencia de las proteínas analizadas.



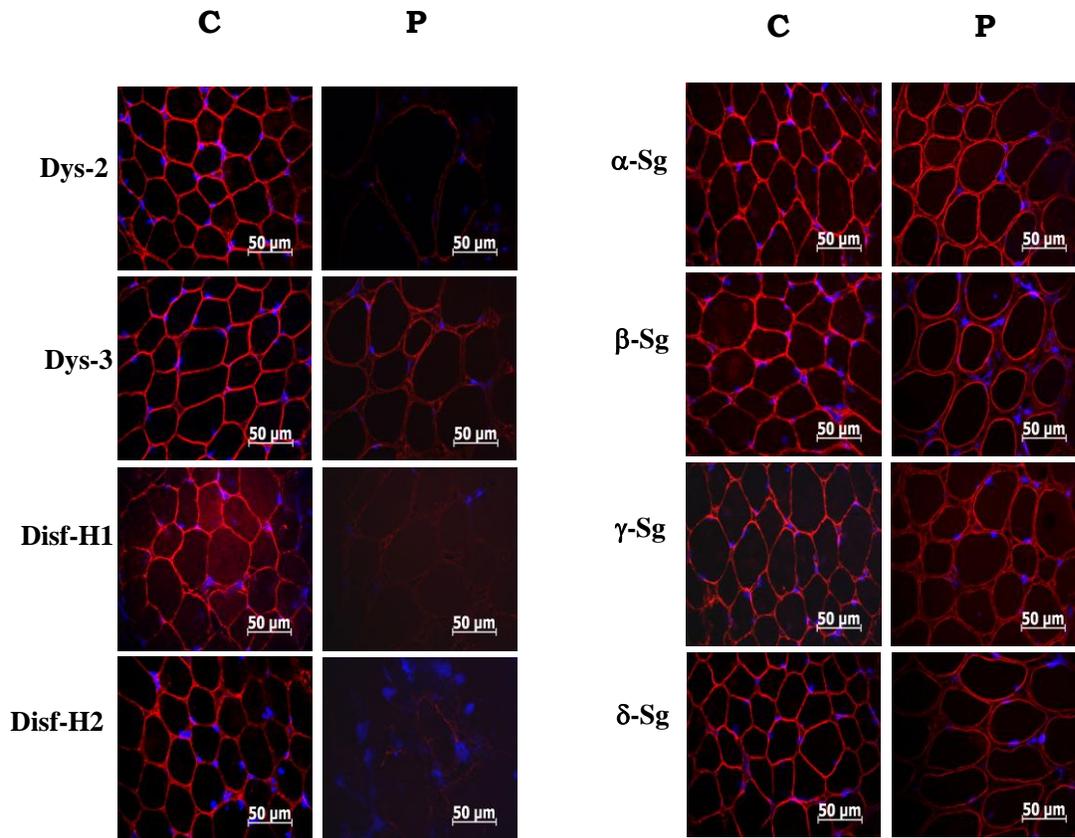
**Figura 4.** Imagen del estudio de Inmunofluorescencia Indirecta del paciente 61. Criosecciones de músculo esquelético normal y del paciente se tiñeron con anticuerpos dirigidos a Dys 2 (distrofina parte COOH terminal), Dys 3 (distrofina parte NH<sub>3</sub> terminal),  $\alpha$ -SG (alfa sarcoglicano),  $\beta$ -SG (beta sarcoglicano),  $\gamma$ -SG (gama sarcoglicano),  $\delta$ -SG (delta sarcoglicano), Dis H1 (disferlina parte COOH Terminal), Dis H2 (disferlina parte NH<sub>3</sub> terminal), C (control), P (paciente). Se observa una expresión normal (+++) de las proteínas analizadas.

En el análisis de inmunohistoquímica se detectaron 17 pacientes con deficiencia de distrofina en la parte NH<sub>3</sub> y COOH. 16 de ellos masculinos entre 3 a 16 años (En promedio, y solo un paciente de 38 años) y una niña de 6 meses (9). Esta deficiencia de Distrofina es característica de la DMD, en todos estos casos se encontró también la deficiencia de por lo menos alguno de los sarcoglicanos estudiados, lo cual estaría implicando una deficiencia secundaria de dichos SG'S. El siguiente paciente, masculino de 11 años de edad con un cuadro clínico de distrofia muscular, edad de inicio a los 3 años, presentó dificultad al empezar a caminar. No puede subir escaleras, no puede levantarse de cuclillas (Gowers), caídas frecuentes, calambres, dificultad para hablar (disartria) se le realizó la determinación de CPK obteniendo un resultado de 16,000.



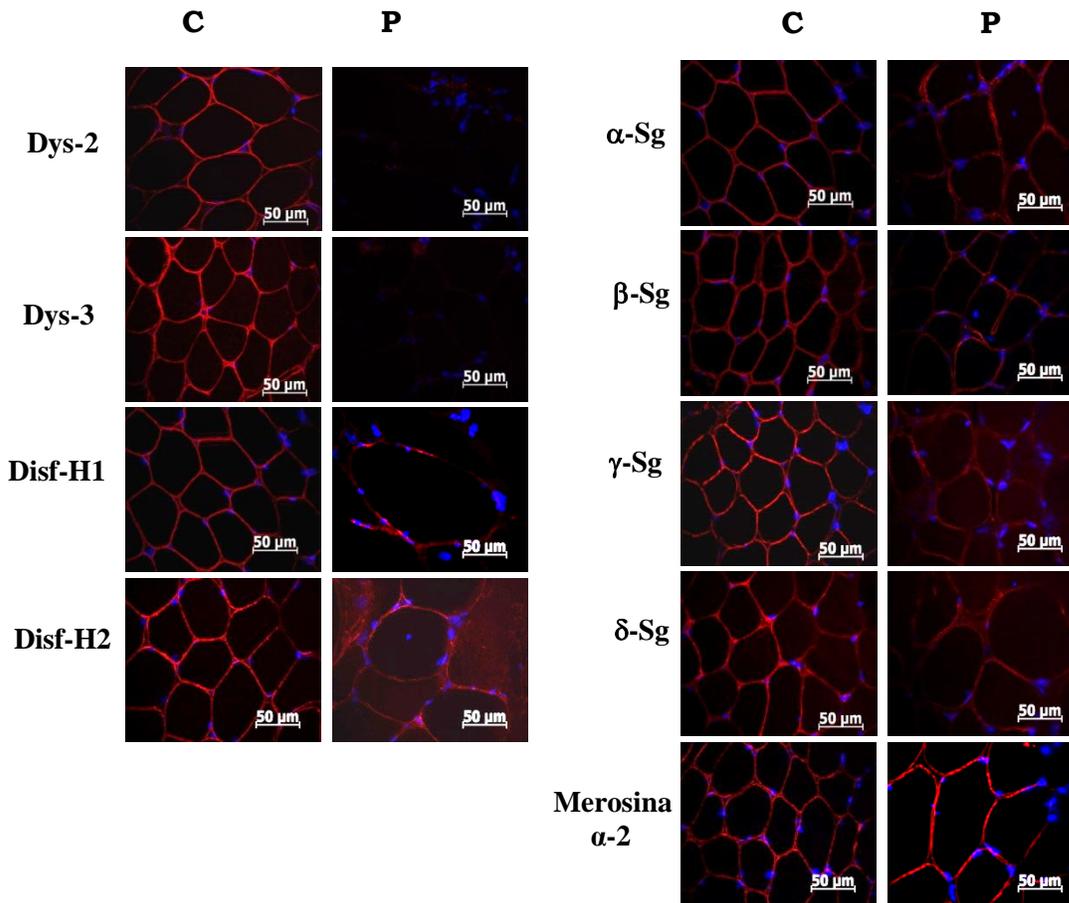
**Figura 5.** Imagen del estudio de Inmunofluorescencia Indirecta del paciente 66. Criosecciones de músculo esquelético normal y del paciente se tiñeron con anticuerpos dirigidos a Dys 2 (distrofina parte COOH terminal), Dys 3 (distrofina parte NH<sub>3</sub> terminal), α-Sg (alfa sarcoglicano), β-Sg (beta sarcoglicano), γ-Sg (gama sarcoglicano), δ-Sg (delta sarcoglicano), Disf H1 (disferlina parte COOH Terminal), Dis H2 (disferlina parte NH<sub>3</sub> terminal), C (control), P (paciente), en donde se muestra negativo para Dys 2 y Dys 3 terminal de distrofina(---).

Paciente masculino de 11 años, con cuadro clínico de DMB; con los síntomas desde los 5 años, presentó dificultad para la marcha, caídas frecuentes; tuvo dificultad para subir escaleras y cargar objetos; a los 8 años mostró dificultad para levantarse al estar sentado. Mediante el análisis de inmunofluorescencia se identificó una marcada disminución en la expresión de la parte carboxilo y amino de distrofina, tincion normal para α-, β-, y γ-Sg; así como una marcada disminución en la parte amino y carboxilo de disferlina.



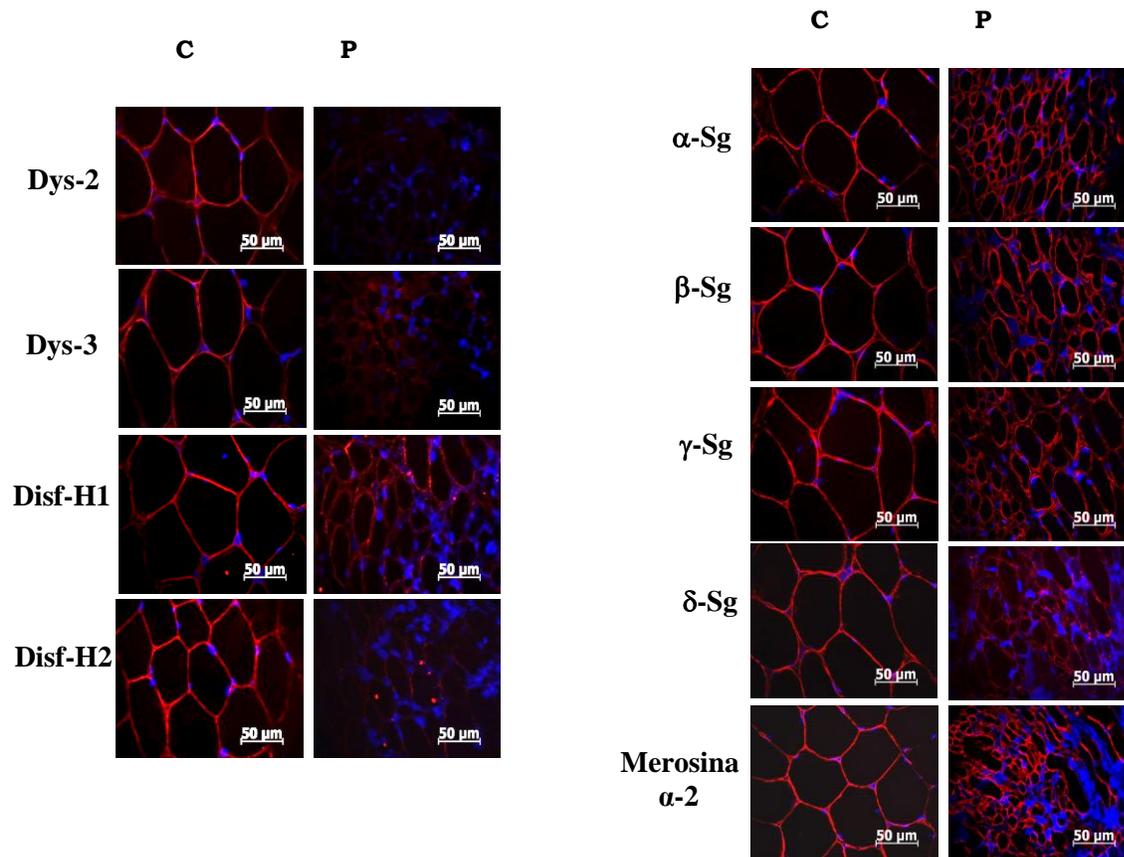
**Figura 6.** Imagen del estudio de Inmunofluorescencia Indirecta del paciente (30). En criosecciones de músculo esquelético normal y del paciente se tiñeron con anticuerpos dirigidos a Dys 2 (distrofina parte COOH terminal), Dys 3 (distrofina parte NH<sub>3</sub> terminal), α-SG (alfa sarcoglicano), β-SG (beta sarcoglicano), γ-SG (gama sarcoglicano), δ-SG (delta sarcoglicano), Dis H1 (disferlina parte COOH Terminal), Dis H2 (disferlina parte NH<sub>3</sub> terminal), C (control), P (paciente), en donde se muestra una marcada disminución para Dys 2 y Dys 3 terminal de distrofina al igual que para Disferlina, amino y carboxilo.

Paciente, masculino de 5 años de edad con un cuadro clínico de distrofia muscular, tío masculino portador de DM2, edad de inicio al los 3 años, sostén cefálico a los 5 meses, marcha al año 3 meses. No corre ni brinca. Inicio a los 3 años presentó dificultad al empezar a caminar. No puede subir escaleras, no puede levantarse de cuclillas (Gowers), caídas frecuentes, calambres, dificultad para hablar, tartamudeo lenguaje limitado asiste a terapia y presenta incremento de pantorrillas, se realizó la determinación de CPK con resultado de 10867.



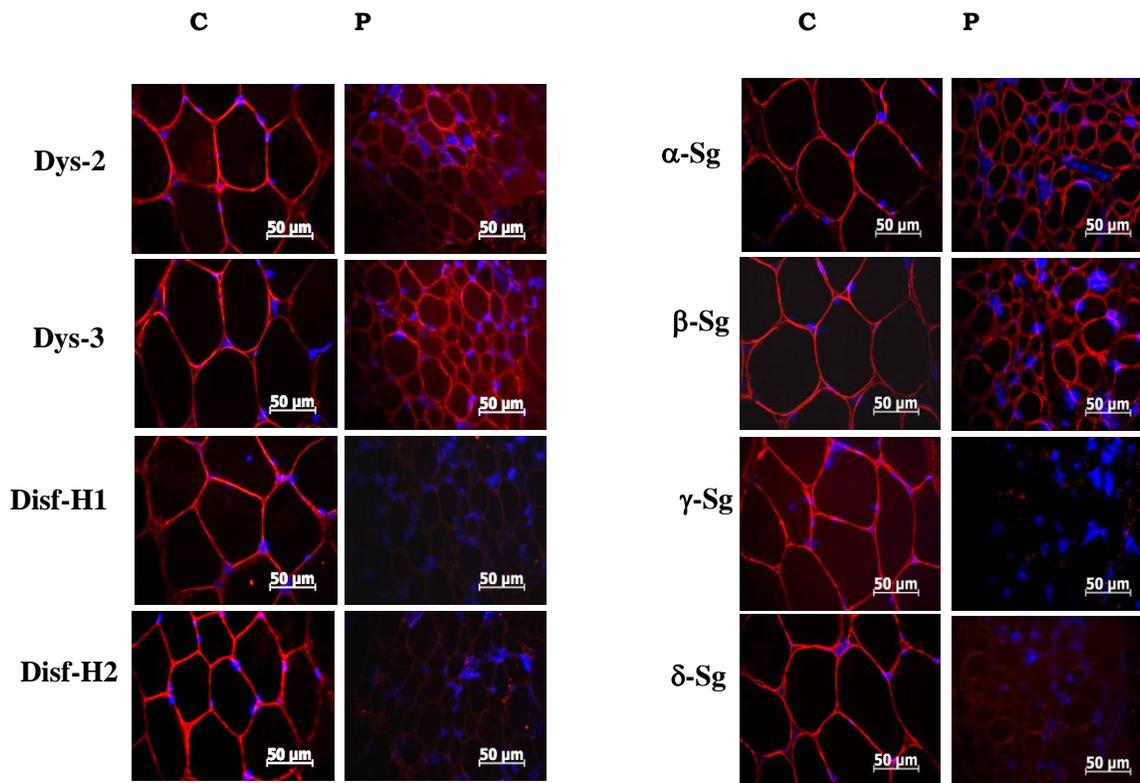
**Figura 7.** Imagen del estudio de Inmunofluorescencia Indirecta del paciente (52). Criosecciones de músculo esquelético normal y del paciente se tiñeron con anticuerpos dirigidos a Dys 2 (distrofina parte COOH terminal), Dys 3 (distrofina parte NH<sub>3</sub> terminal), α-SG (alfa sarcoglicano), β-SG (beta sarcoglicano), γ-SG (gama sarcoglicano), δ-SG (delta sarcoglicano), Disf H1 (disferlina parte COOH Terminal), Dis H2 (disferlina parte NH<sub>3</sub> terminal), C (control), P (paciente), en donde se muestra negativo para Dys 2 (---), y Dys 3 (---), asimismo hay disminución de Dis H1 (+) y Dis H2 (+), α-SG (alfa sarcoglicano), β-SG (beta sarcoglicano), γ-SG (gama sarcoglicano), δ-SG (delta sarcoglicano), y una tinción normal para merosina (también conocida como α2-laminina).

La paciente es una niña 6 meses, cuyo estudio de inmunohistoquímica mostró una inmunotinción negativa para distrofina en la parte NH<sub>3</sub> y COOH terminal, además expresó deficiencia secundaria de δ-SG, la paciente muestra un cuadro clínico de distrofia muscular, debilidad muscular desde que nació ya que no presenta poca movilidad de extremidades, CPK elevado de 11, 0102. Sus padres no presentan consanguinidad.



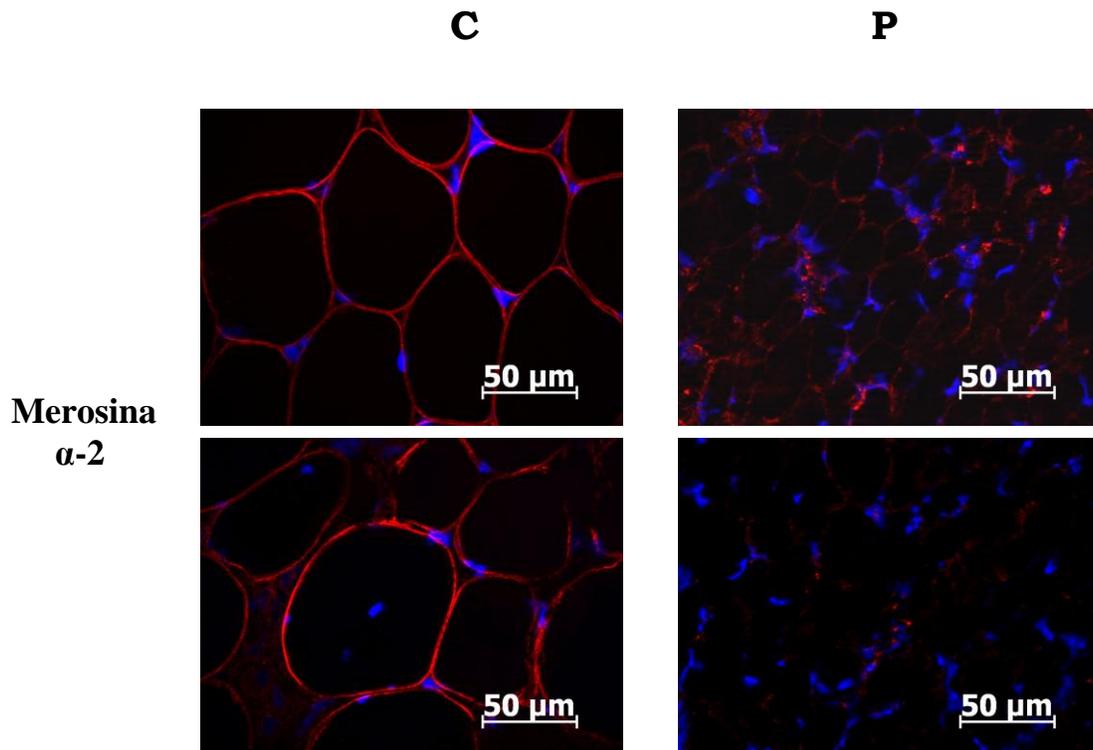
**Figura 8.** Imagen del estudio de Inmunofluorescencia Indirecta del paciente (9). Criosecciones de músculo esquelético normal y del paciente se tiñeron con anticuerpos dirigidos a Dys 2 (distrofina parte COOH terminal), Dys 3 (distrofina parte NH<sub>3</sub> terminal), α-SG (alfa sarcoglicano), β-SG (beta sarcoglicano), γ-SG (gama sarcoglicano), δ-SG (delta sarcoglicano), Disf H1 (disferlina parte COOH Terminal), Dis H2 (disferlina parte NH<sub>3</sub> terminal), C (control), P (paciente), en donde se muestra negativo para Dys 2 (---), y Dys 3 (---), asimismo hay disminución de Dis H1 (++) y Dis H2 (+), γ-SG (gama sarcoglicano), y una tinción normal para merosina (también conocida como α2-laminina).

Hubo casos de pacientes con deficiencia en Disferlina en la parte COOH y NH<sub>3</sub> terminal, como el caso del paciente 23, que presenta un cuadro clínico de distrofia muscular, paciente femenino de 27 años de edad con un cuadro clínico de distrofia muscular, edad de inicio al los 6, años presentó dificultad al empezar a caminar y comenzo al año y un mes. Sí puede subir escaleras, con mucha dificultad y mialgias a la altura de donde coloca el cinturón, no puede levantarse de cuclillas (Gowers) rápidamente. Sin antecedentes familiares significativos.



**Figura 9.** Imagen del estudio de Inmunofluorescencia Indirecta del paciente (23). Criosecciones de músculo esquelético normal y del paciente se tiñeron con anticuerpos dirigidos a Dys 2 (distrofina parte COOH terminal), Dys 3 (distrofina parte NH<sub>3</sub> terminal), α-SG (alfa sarcoglicano), β-SG (beta sarcoglicano), γ-SG (gama sarcoglicano), δ-SG (delta sarcoglicano), Disf H1 (disferlina parte COOH Terminal), Dis H2 (disferlina parte NH<sub>3</sub> terminal), C (control), P (paciente), en donde se muestra negativo para Dis H1 (++) y Dis H2 (+), γ-SG-δ-SG (gama y delta sarcoglicano), y una tinción normal para las restantes proteínas.

El último caso es un paciente masculino de 1 mes de nacido (46), sus padres no presentan consanguinidad, tiene dos hermanos varones y los dos presentaron Distrofia Muscular congénita, con deficiencia en la proteína Merosina o conocida como (α-laminina); el paciente muestra signos anormales durante los primeros días de vida, sus dos hermanos fueron diagnosticados por inmunodetección.

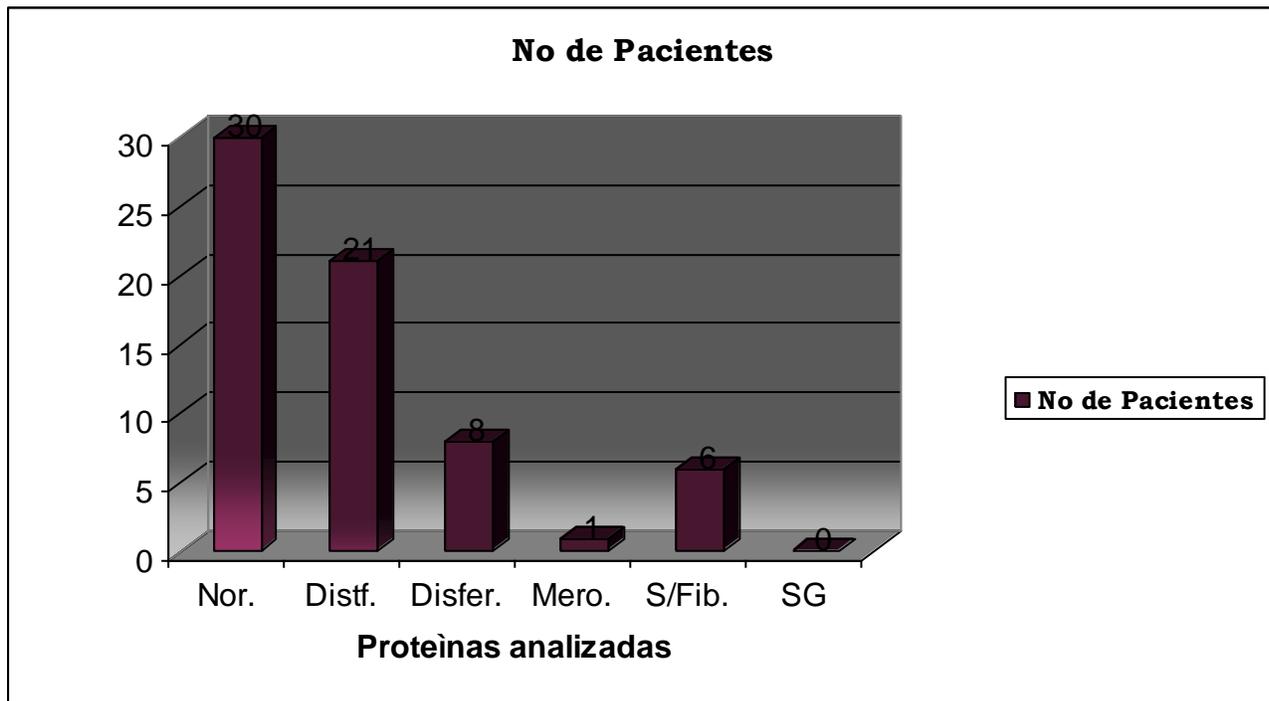


**Figura 10.** Imagen del estudio de Inmunofluorescencia Indirecta del paciente (46). Criosecciones de músculo esquelético normal y del paciente se tiñeron con anticuerpo dirigidos específicamente a merosina (también conocida como  $\alpha$ 2-laminina), por los antecedentes familiares, presentando una severa disminución de esta proteína.

**Tabla 7. Resumen de datos (Inmunofluorecencia Indirecta).**

Proteínas Analizadas	No de Pacientes
Normal	30
Distrofina	21
Disferlina	8
Miosina	1
S/Fibras	6
Sarcoglicanos	0

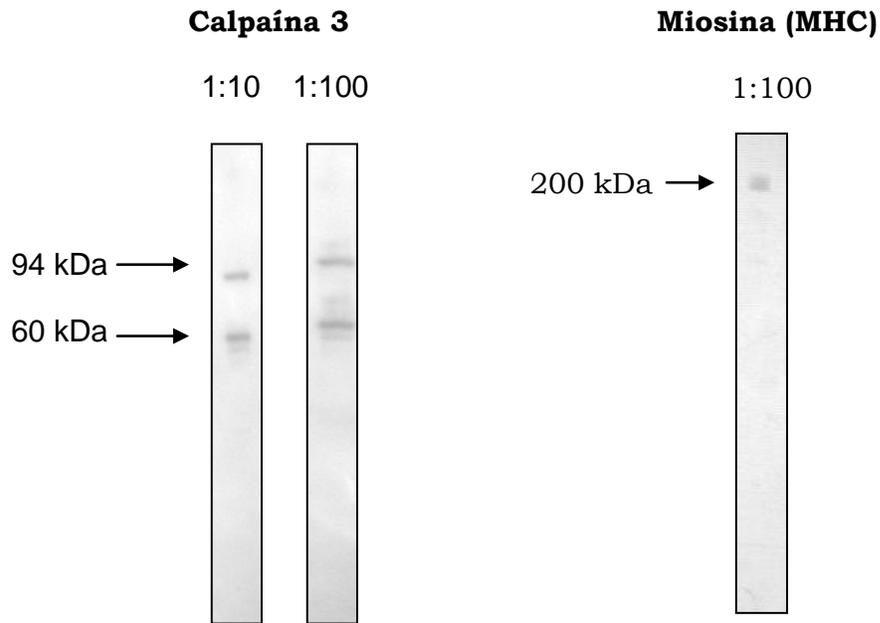
Se muestra una grafica resultado de la inmunofluorecencia obtenida de acuerdo a los resultados observados, la distribución de casos y afecciones en las proteínas.



**Grafica 1.** Resultados de Inmunofluorescencia Indirecta las barras muestran el número: de pacientes deficientes y/o negativos, para cada una de las proteínas analizadas. De los 66 pacientes estudiados, 32 presentaron un patrón de expresión normal para todas las proteínas analizadas, mientras que 19 presentaron reducción de la distrofina y 7 no tuvieron expresión de dicha proteína, en tanto que para disferlina se encontraron 8 pacientes con la expresión disminuida y 3 de ellos no presentó señal en la expresión y un solo caso para Merosina, y ninguno para los sarcoglicanos.

## **9.2 Western blot, Estandarización de Inmunoelctrotransferencia para Calpaína 3 y la Cadena Pesada de Miosina (MHC).**

Con base a la hoja técnica del anticuerpo para Calpaína-3 y al artículo de Anderson *et al.*, (1998), se realizaron ensayos empleando las diluciones 1:10 y 1:100 para hacer la comparación entre estas diluciones y utilizar la que mostrara mejores resultados. Ambas mostraron ser factibles por lo que cualquiera de estas dos podría ser empleada, sin embargo se optó por utilizar la dilución 1:100, con el fin de utilizar menor cantidad de anticuerpo. Se observaron tres bandas: 94 kDa, 60 kDa y 55kDa, aunque esta última se observó muy tenue. Para el caso de MHC se empleó una dilución de 1:100 tal como lo indicaba la hoja técnica del anticuerpo empleado y se observó una banda visible de 200 kDa que corresponde a la cadena pesada de Miosina (MHC).



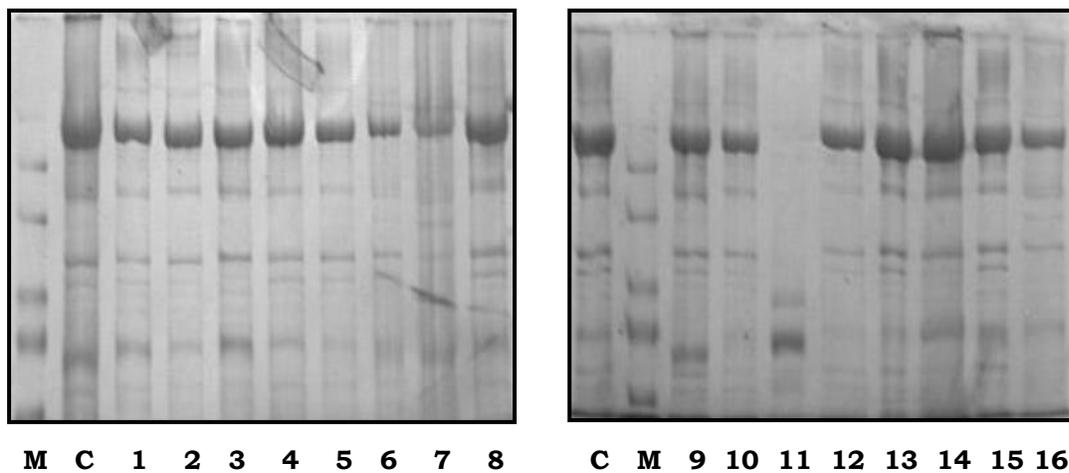
**Figura 11.** Resultado de Inmunolectrotransferencia de la estandarización para Calpaína 3 y MHC para la estandarización. En ambos casos se observó la banda funcional de 94 kDa y una de las bandas producto de degradación de la autólisis de calpaína-3.

### 9.3 Estudio de la integridad de las proteínas por Western blot

El gel teñido con Azul de Coomassie nos sirvió para comparar la cantidad e integridad de proteínas, y con esto ajustar a una cantidad más homogénea las muestras y el control. Se utilizó un control positivo obtenido de músculo esquelético sin alteraciones histológicas para comparar la expresión de la proteína con respecto a los pacientes, (Fig 12).

**M** = Marcador 170 kDa

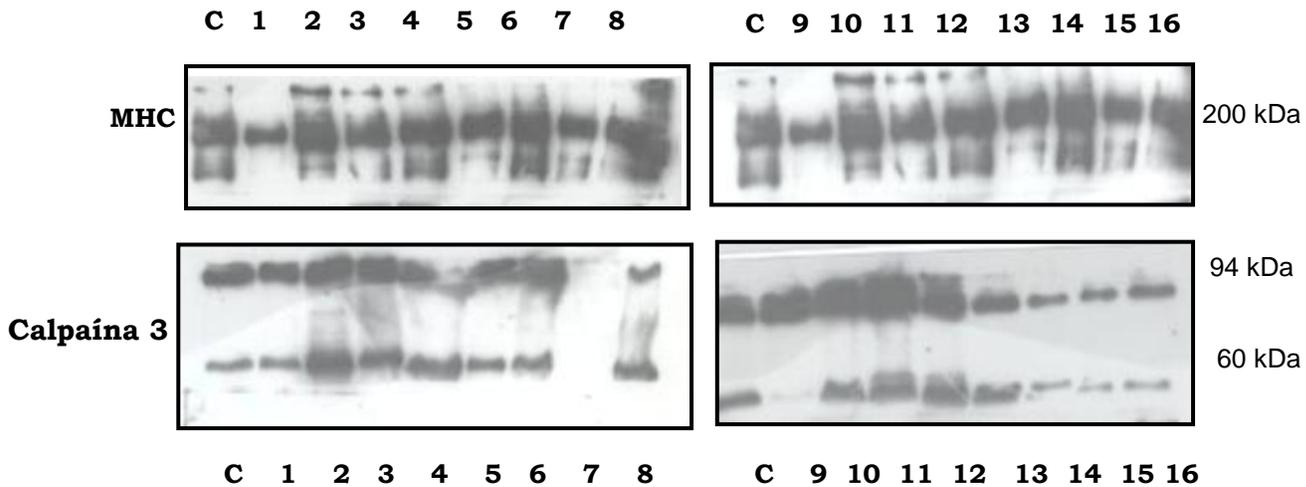
**C** = Control



**Figura 12.** Tinción con Azul de Coomassie de las proteínas.

#### 9.4 Resultados de la Inmunoelctrotransferencia de los pacientes analizados (Western blot).

De los 66 pacientes estudiados, 32 no mostraron disminución o ausencia en ninguna de las 12 proteínas analizadas, por lo que se realizó para 16 pacientes el Western blot para calpaína-3. Se cuantifico la cadena pesada de Miosina (MHC), empleándola como un marcador que permite normalizar la cantidad de proteína utilizada en la prueba, esto debido a que no se colocó la misma cantidad en cada caso, aunque se trató de llevar a todos a una concentración final de 180  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Tomando como base los controles, en la Inmunoelctrotransferencia, para el caso de Calpaína 3, se obtuvieron 2 bandas con pesos molecular de: 94 kDa, 60kDa . Mientras que para MHC, la banda resultante fue de 200 kDa.



**Figura 13.** Resultados de la Inmunoelctrotransferencia ( Western Blot). Podemos observar la expresion de Calpaína-3 y la cadena pesada de Miosina (MHC). En el paciente 7 se observó disminución total de la proteína Calpaína 3, mientras que en el paciente 9 se observó una disminución en la banda de 60kDa.

### 9.5 Estimación de la expresión de calpaína-3.

La cuantificación de las proteínas se efectuó en el analizador de imágenes, en el cual se midió el área bajo la curva de las bandas correspondientes a Calpaína 3 y Miosina. En cada caso se obtuvo la relación de Calpaína 3 y MHC para cada paciente, posteriormente estos valores fueron comparados frente a la relación de calpaína 3 y MHC del control positivo, para finalmente obtener el porcentaje de disminución de Calpaína 3, (Tabla 8).

En donde:

AC C3 = Área bajo la curva de Calpaína 3

AC MHC = Área bajo la curva de MHC

C3/MHC = Relación entre Calpaína 3 y Miosina

**Tabla 8.** Resultados obtenidos en el Analizador y cálculos realizados.

	<b>Cálculos para Calpaína-3</b>		
	<b>A/C C3</b>	<b>A/C MHC</b>	<b>C3 / MHC</b>
<b>Control</b>	14280	14145	1.009544
1	9900	9910	0.9989909
2	17236	14902	1.1566233
3	16236	15121	1.0737385
4	15932	15365	1.0369021
5	14523	13203	1.0999773
6	14321	13204	1.0845956
7	Sin banda	16523	0
8	8325	8652	0.9622053
<b>Control</b>	14880	14845	1.0023577
9	9015	9562	0.9427944
10	16782	16301	1.0295074
11	14621	13645	1.071528
12	16023	15123	1.059512
13	15235	15112	1.0081392
14	9013	9487	0.9500369
15	8125	8224	0.9879621
16	9548	9578	0.9968678

**[(C3/MHC P) / (C3/MHC C) ] = Resultado**

**R ≥ 1 es Normal**

**R < 1 es Deficiente**

En donde:

(C3/ MHC P) = Relación entre Calpaína 3 y Miosina del Paciente

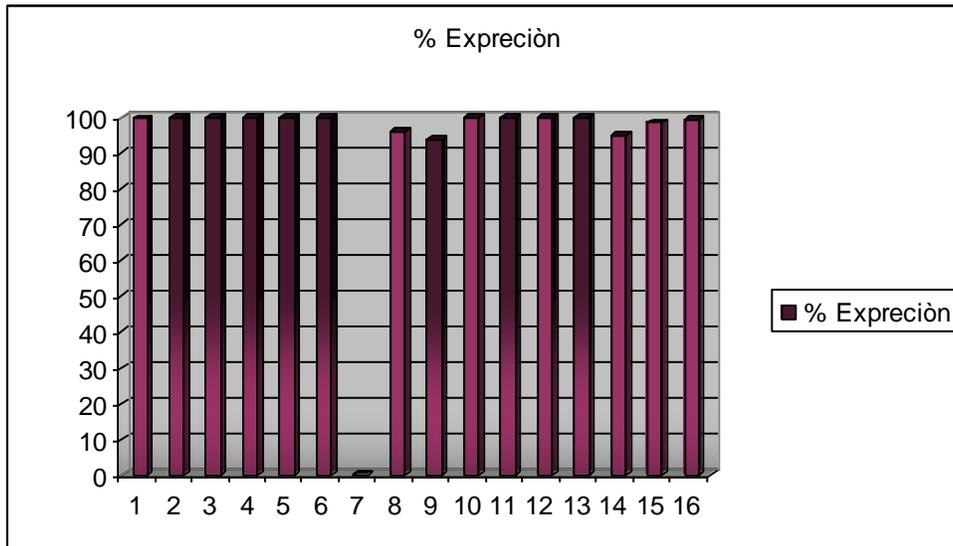
(C3/MHC C) = Relación entre Calpaína 3 y Miosina del Control

R = Resultado

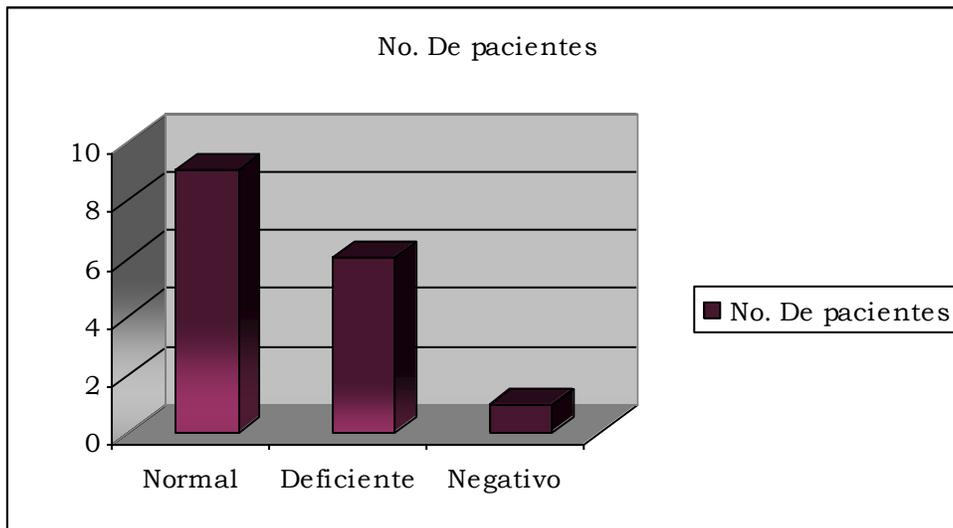
% Disminución = (1-R) (100)

<b>Paciente</b>	<b>(C3/MHC P)/(C3/MHC C)</b>	<b>R</b>	<b>% Disminución</b>	<b>% Expresión</b>	<b>Interpretación</b>
1	(0.9989)/(1.0095)	0.996641141	0.34	99.66	<b>Disminuido</b>
2	(1.1566)/(1.0095)	1.15390272	0	100	<b>Normal</b>
3	(1.0737)/(1.0095)	1.071212915	0	100	<b>Normal</b>
4	(1.0369)/(1.0095)	1.0344631	0	100	<b>Normal</b>
5	(1.0999)/(1.0095)	1.097389966	0	100	<b>Normal</b>
6	(1.0845)/(1.0095)	1.082044445	0	100	<b>Normal</b>
7	(0)/(1.0095)	0	0	0	<b>Negativo</b>
8	(0.9622)/(1.0095)	0.959942019	4.01	95.99	<b>Disminuido</b>
9	(0.9427)/(1.0023)	0.9405768	5.95	94.05	<b>Disminuido</b>
10	(1.0295)/(1.0023)	1.027085836	0	100	<b>Normal</b>
11	(1.0715)/(1.0023)	1.069007637	0	100	<b>Normal</b>
12	(1.0595)/(1.0023)	1.05701987	0	100	<b>Normal</b>
13	(1.0081)/(1.0023)	1.005767932	0	100	<b>Normal</b>
14	(0.9500)/(1.0023)	0.947802263	5.22	94.78	<b>Disminuido</b>
15	(0.9879)/(1.0023)	0.985638227	1.44	98.56	<b>Disminuido</b>
16	(0.9968)/(1.0023)	0.994523039	0.55	99.45	<b>Disminuido</b>

**Tabla 9.** Resultados del análisis por Inmunoelctrotransferencia.



**Gráfica 2.** Expresión de Calpaína 3 en pacientes analizados.



**Gráfica 3.** Resumen de resultados de la expresión de Calpaína 3 en pacientes analizados.

## **10. DISCUSIÓN.**

Las distrofias musculares son un grupo de enfermedades hereditarias que se caracterizan por la pérdida y debilidad progresiva del músculo. La mayoría de las distrofias musculares se producen por una disrupción del complejo (DGC), de la matriz extracelular, de la sarcómera, del citosol y del núcleo, ascendiendo a más de 30 los genes que han sido encontrados y relacionado con estos padecimientos, de los cuales en la mayoría de los casos se ha identificado su producto ya que mediante el arreglo de las proteínas asociadas a dicho complejo uniendo al citoesqueleto con la matriz extracelular, mantienen la estabilidad y da soporte mecánico al sarcolema durante la contracción y relajación de la fibra muscular. A nivel tisular se observan defectos en la permeabilidad de la membrana, pérdida de miofibras, e infiltración de tejido conectivo y adiposo que al reemplazar a las miofibras, ocasionan debilidad muscular. Esto origina que la interacción entre los componentes del complejo sea débil, lo que conduce a defectos de integridad del sarcolema y a la degradación de la fibra muscular.

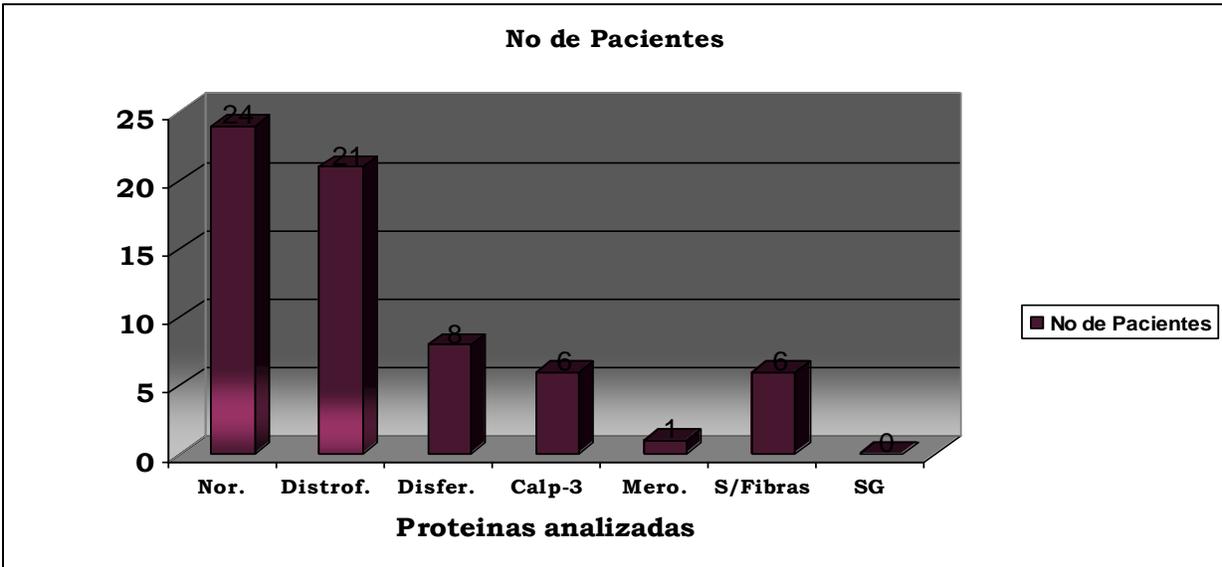
El diagnóstico de las distrofias musculares es complicado ya en general este desorden es muy heterogéneo, claro que el inicio del diagnóstico puede sustentarse por una historia clínica y familiar, niveles de CPK, biopsia muscular y electromiografía, sin embargo con todos estos datos, no es posible tener un diagnóstico certero del tipo de distrofia que presenta un paciente, puesto que una mutación en el mismo gen puede generar fenotipos diferentes como ocurre en la LGMD 2B y MM, o bien cuadros clínicos similares pueden aparecer en dos enfermedades distintas. Actualmente es factible identificar algunas de las proteínas defectuosas mediante pruebas, tales como la inmunofluorescencia indirecta y el Western blot con anticuerpos específicos, que nos ayudan a obtener un diagnóstico más confiable para cada paciente

En el presente trabajo se realizó el estudio por inmunodetención dividiéndose en inmunofluorescencia para distrofina,  $\alpha$ -SG,  $\beta$ -SG,  $\gamma$ -SG,  $\delta$ -SG, disferlina y merosina en 66 biopsias de pacientes diagnosticados con distrofia muscular, y en un análisis por Inmunoelctrotransferencia de Calpaína 3, en 16 pacientes que en resultados previos de inmunohistoquímica obtuvieron resultados normales.

De las 66 biopsias analizadas por inmunofluorescencia se encontraron 24 pacientes (36 %) con una expresión normal de las proteínas analizadas (Dys 2, Dys 3,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -,  $\gamma$ - SG, Dis H1 y Dis H2). Existen más de 30 tipos de distrofias musculares originados por mutaciones en distintos genes, y estos pacientes podrían presentar alteración en alguna otra proteína que no se estudió, en este trabajo. Por lo tanto no se descarta la posibilidad de alguna distrofia muscular no olvidando los síntomas compatibles con esta enfermedad, se representa los resultados totales en Tabla 9.

**Tabla 10.** Resultados del análisis por Inmunodetección y resultados de deficiencias de todas las proteínas analizadas.

<b>Proteínas Analizadas</b>	<b>No de Pacientes</b>
Normal	24
Distrofina	21
Disferlina	8
Calpaina 3	6
Merosina	1
S/Fibras	6
Sarcoglicanos	0



**Gráfica 4.** Representación de resultados de la expresión de todas las proteínas analizadas e incluidos los 66 pacientes.

Se encontraron 8 (37%) pacientes con una inmunotinción negativa para distrofina ya sea para el lado COOH o como el lado NH<sub>3</sub> de la proteína deficiente en la DMD, 6 de ellos de sexo masculino y una niña de 3 meses, los músculos afectados son principalmente las extremidades inferiores y superiores, presentando niveles elevados de CPK y signo de Gowers positivo. Cabe mencionar que además en todos estos casos se encontró deficiencia secundaria de por lo menos algún sarcoglicano (Tabla 7), y todos ellos exceptuando a la niña diagnosticados con dicha enfermedad, la ausencia de distrofina conlleva a la disminución de los sarcoglicanos provocando una desestabilización de la membrana celular y como consecuencia la pérdida de la integridad de la misma, lo que origina la necrosis de la fibra muscular (Vainzof y Zatz 2003).

Se ha sugerido que pacientes con DMD presentan mutaciones que alteran la pauta de lectura, originando un codon stop y no se produce distrofina (Tejeira y Navarro, 2004), esto puede explicar porque la ausencia de distrofina en la inmunohistoquímica. Aunque en el caso de los pacientes 6 y 20 la edad no coincide con lo descrito en la literatura para DMD, se debe tener en cuenta que el fenotipo clínico es muy variable y depende del tipo de mutación que la haya originado en cada paciente pues puede diferir.

En el caso particular de la paciente 9 se determinó una expresión nula en la parte COOH y NH<sub>3</sub> terminal de distrofina y una deficiencia secundaria de Disferlina (Fig. 6), presenta además un cuadro clínico de distrofia muscular, debilidad muscular desde los primeros días de vida al parecer le toma trabajo moverse para cualquier lado y bien sus niveles de CPK son elevados teniendo tan solo 3 meses de vida no se sabe si tiene mialgias o algún otro síntoma de Distrofia por su corta edad, sus padres no presentan consanguinidad, es producto de la primera gesta, por todo lo descrito anteriormente y sobre todo por los resultados del estudio de Inmunohistoquímica Indirecta podría tratarse de DMD, a pesar de que esta enfermedad es ligada al X y por lo tanto afecta primordialmente a los varones, actuando las mujeres como portadoras de la enfermedad (Engel *et al.*, 1994; Bushby KMD, 1991).

Consideramos que esta paciente debería tener estudio de cariotipo, además de FISH y observar el análisis ya que podría tratarse de una translocación o deleción en el cromosoma X lo que origine la pérdida de la proteína cabe mencionar que en; el laboratorio se presentó con anterioridad un caso similar.

La DMD tiene una frecuencia de 1/3500 varones nacidos vivos, las causas pueden ser: heredados por mujeres portadoras sin antecedentes familiares, mutaciones de novo, o bien por mutaciones heredadas desde las primeras generaciones (Erazo-Torricelli, 2004).

En 8 de los pacientes, en el estudio de Inmunofluorescencia Indirecta se determinó una deficiencia o pérdida en la expresión de esta proteína y observamos diferentes deficiencias en las dos diferentes partes de la proteína que probablemente se deban a la mutación, que podría interrumpir el marco de lectura del gen, afectando la parte COOH terminal del gen de Distrofina, no así para la parte NH<sub>3</sub> terminal. En estos pacientes también se observó una deficiencia secundaria de los sarcoglicanos, así como de disferlina tanto en la parte NH<sub>3</sub> como COOH terminal (Tabla 7), comprobando la idea que la pérdida de uno de los componentes del complejo, genera la pérdida secundaria de los demás proteínas asociadas e inclusive de proteínas que estructuralmente no forman parte del DGC como disferlina.

Antes de realizar las técnicas de las biopsias se estudian observándose cambios en el tamaño de las fibras musculares, infiltración de tejido adiposo y conectivo y en algunos casos núcleos centrales, estas observaciones histológicas nos daban pauta para recopilar más características dirigidas a algún tipo de distrofias musculares.

En 12 pacientes varones, que representa el 63% total, se encontró una deficiencia en la expresión de distrofina en la parte COOH y NH<sub>3</sub> terminal de la proteína (Tabla 7). Este patrón de fluorescencia es característico de la DMB, a estos pacientes se observó deficiencia secundaria de los sarcoglicanos o de disferlina. Se tiene reportado que la edad de inicio de los pacientes osciló entre 2 y 18 años, lo que coincide con lo ya descrito, en cuanto a que la evolución de la enfermedad en DMD/BMD se da desde la niñez en adelante y los pacientes mueren generalmente en la cuarta o quinta década de la vida (Prior y Bridgeman, 2005), cuyo rompimiento tiene como consecuencia la degeneración muscular característica de las distrofias musculares asociadas al DGC (Campbell, 1995; Straub y Campbell, 1997).

Se ha observado que hay mutaciones que generan un corrimiento en el marco de lectura del gen que permite la expresión de esta proteína, y se muestran 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) y se observa en pacientes con DMB una fluorescencia del 10 al 40 % de la proteína distrofina (Hoffman et al., 1988).

En cuanto a la disferlina en 8 pacientes (12% de nuestro total), se redujo la expresión de esta proteína, en el músculo esquelético la disferlina se localiza en el sarcolema y las vesículas citoplásmicas y participa en procesos de reparación de la membrana celular, y si este proceso está afectado favorecería la inestabilidad de la membrana y como consecuencia la fibra muscular pierde integridad generando la muerte celular, en el tráfico de vesículas y en la fusión de membrana en células musculares, por lo que su deficiencia altera estas funciones (Bansal y Campbell, 2004).

Reportes del laboratorio UIM en Genética Humana sugieren que la LGMD2B tiende a ser la distrofia más frecuente en nuestro país después de DMD/BMD (Estrada, 2005), aunque las mutaciones en este gen presentan una gran variabilidad clínica tanto intra como interfamiliar, ya que se ha reportado que una misma mutación genera fenotipos diferentes e incluso entre individuos de una misma familia, por lo que no se ha encontrado relación entre el genotipo y el fenotipo (Bonnemann *et al.*, 2002; Werler *et al.*, 1999; Bushby *et al.*, 2000), sin embargo de acuerdo con los resultados de este proyecto se observó que la distrofia más común después de DMD/BMD es la LGMD causada por mutaciones en el gen de calpaína-3.

El estudio de Calpaína 3 se realizó en pacientes que ya se habían estudiado anteriormente en el laboratorio de Genética Humana, y cuyos resultados de Inmunohistoquímica no se revelaron ninguna alteración en las proteínas analizadas tales como: Distrofina (parte COOH y NH<sub>3</sub>), α-SG, β-SG, γ-SG, δ-SG, Disferlina (parte COOH y NH<sub>2</sub>). Varios estudios han mostrado que Calpaína 3 es una de las LGMDs más frecuentes (Vainzof *et al.*, 2000) por lo que se decidió hacer la determinación de esta proteínas en los pacientes que no se les había reportado ninguna alteración.

Calpaína-3 es una proteína específica de músculo con actividad proteolítica dependiente de Ca<sup>2+</sup> y se considera que participa en la remodelación del citoesqueleto y se sugiere que las mutaciones en el gen que la codifica, afectan la interacción proteína-interdominio o reducen su actividad catalítica al disminuir su sensibilidad a Ca<sup>2+</sup> (Richard *et al.*, 1999).

Para realizar el estudio de Calpaína 3, se utilizo de la técnica de Western blot ya que como se ha descrito Calpaína 3 es una proteasa que se localiza en citosol, su estudio a través de Inmunofluorescencia no sería factible ya que no se observaría un patrón de fluorescencia. El Western Blot, es una técnica que emplea anticuerpos específicos dirigidos al sitio de interés, permitiendo la detección de la proteína.

De las 16 biopsias analizadas Western Blot, 9 pacientes mostraron una expresión normal de la proteína Calpaína 3, y 6 mostraron disminución en el porcentaje de expresión de Calpaína 3 y sólo uno mostró una degradación de la proteína.

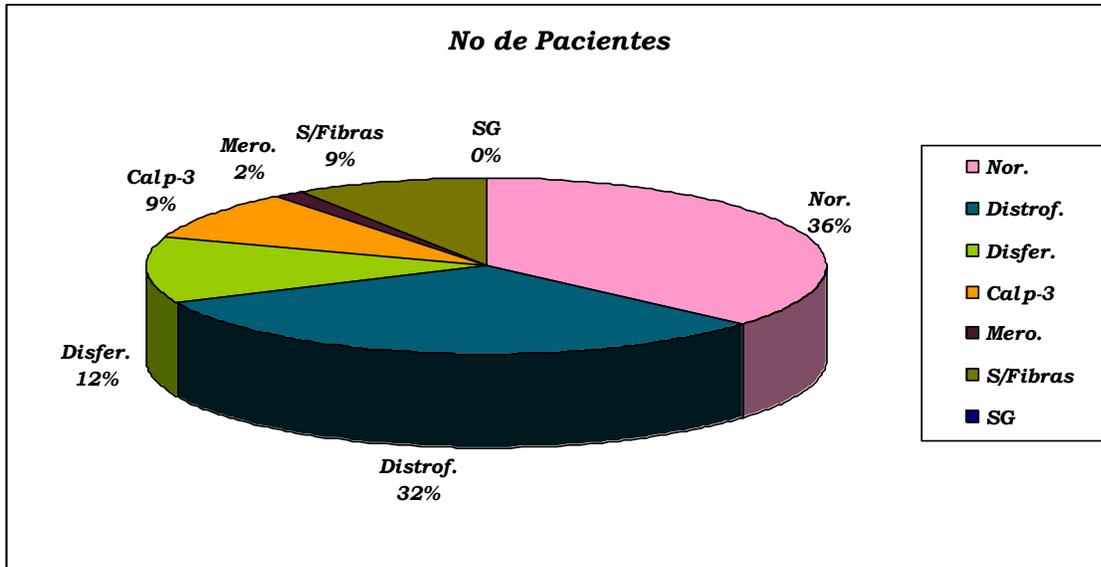
El resultado final del Western Blot o Inmunotransferencia se muestran 2 bandas de 94, 60 kDa respectivamente (Fig. 9), considerando principalmente a la banda de 94 kDa, esto con base a la literatura citada para esta técnica de Calpaína 3; cuando no hay expresión de Calpaína 3 la banda de 94 kDa es la que se observa deficiente.

Obtuvimos 6 pacientes cuyo porcentaje de expresión de Calpaína 3 fue debajo de lo normal como se observa en la tabla 8, en el WB se observan las dos bandas, y se observa que no hay alguna carencia de esta proteína pero al analizarla se comprobó que si se presenta, la mayoría de los pacientes presentan síntomas como, limitación para correr, subir escaleras, debilidad de predominio proximal, deterioro progresivo, debilidad proximal, hipertrofia progresiva de cintura, tanto escapular como pélvica, sin aumento de volumen en los gastrocnemios, mialgias sobre todo en la cadera, REM muestra pérdida del volumen muscular. Considerando que la deficiencia o ausencia de Calpaína 3, los defectos en esta proteína generan una forma de LGMD autosómica recesiva (LGMD2A), que en general clínicamente no es severa.

En este estudio se tiene un porcentaje muy elevado de pacientes afectados, ya sea con deficiencia o ausencia de Calpaína 3, ya que el 9% de las Distrofias musculares son por esta proteína, estos resultados coinciden con otros estudios que se han reportado, en la literatura, de esta manera se muestra que en México, al igual que en otros países, la LGMD 2A es una de las distrofias musculares más comunes.

Y por último tenemos al paciente 46 con tan solo un mes de vida, sus padres no presentan consanguinidad, tiene dos hermanos varones y los dos presentaron Distrofia Muscular congénita, con deficiencia de la proteína Merosina ( $\alpha$ -laminina), el paciente muestra signos

anormales durante los primeros días de vida, sus dos hermanos fueron diagnosticados por inmunodetección cabe mencionar que ellos también fueron diagnosticados en el laboratorio y sólo se le aplicó la técnica para Merosina por los antecedentes familiares.



**Gráfica 5.** Representación de resultados de la expresión de todas las proteínas analizadas en porcentajes observando el patrón de deficiencias de los 66 pacientes.

Estos resultados y los datos arrojados demuestran la frecuencia de ciertas mutaciones en las proteínas relacionadas a distrofias musculares en nuestro país. Además, debemos seguir integrando metodologías diagnósticas para detectar deficiencia de la mayor cantidad de proteínas relacionadas a distrofias musculares en pacientes con estas enfermedades como se observa en la anterior grafica 5.

## 11. CONCLUSIONES

- El análisis por Inmunofluorescencia Indirecta se llevó a cabo en 66 biopsias de pacientes que mostraron un cuadro clínico de distrofia muscular.
- En el estudio por Inmunofluorescencia Indirecta, la proteína que mostró mayor deficiencia primaria en los pacientes analizados fue distrofina con un 29% (19 pacientes), seguido de disferlina con un 12% (8 pacientes), 2% para un solo paciente para Merosina y 26 pacientes no mostraron alteración en ninguna de las proteínas analizadas por Inmunofluorescencia Indirecta.
- Los SG'S se ven afectados por la deficiencia de distrofina, pero no como una deficiencia primaria ya que también generan Distrofias Musculares de Cintura.
- En algunos casos también puede estar alterada la expresión de disferlina como deficiencia secundaria.
- El análisis de Calpaína 3 se llevó a cabo por medio de Western Blot debido a sus características ya mencionadas, en 16 pacientes, que previamente en estudios anteriores de Inmunofluorescencia Indirecta, no mostraron una alteración en las proteínas analizadas.
- En la determinación de Calpaína 3, por Western Blot 9 pacientes mostraron valores normales, 1 paciente mostró ausencia y 6 pacientes deficiencia de Calpaína 3, lo cual genera un alto porcentaje (9%) de pacientes que se ven afectados por la ausencia o disminución de Calpaína 3. Mostrándose así que LGMD 2A, es una de las distrofias musculares más comunes.

- Los pacientes que resultaron con valores normales en el estudio de Inmunofluorescencia Indirecta, no deben descartarse para estos desordenes, ya que hay mas de 30 proteínas asociadas a esta enfermedad, siguen aún sin un diagnóstico, aplicar técnicas que nos permita identificar la proteína que se encuentra afectada.
- Los diagnósticos con los que llegan las biopsias no concuerdan con el diagnóstico preliminar, esto nos arroja como dato que hay poco conocimiento de este tipo de enfermedades, así bien seguramente hay pacientes relacionados con estas enfermedades sin algun diagnostico certero.
- La mayoría de las muestras son del centro de la ciudad o del Edo de Mex, y ya contamos un número de muestra considerable, faltaría, aplicar este tipo de estudios en otros estados.

## 12. BLIBLIOGRAFIA.

Alcántara MA, Villarreal MT, Del Castillo V, Gutiérrez G, Saldaña Y, Maulen I, Lee R, Macías M y Orozco L. High frequency of *de novo* deletions in mexican Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. Implications for genetic counseling. Clin Genet. 1999; 55: 376-380.

Álvarez LM, Morales AA, Pérez ZJA, Segura RS, Quiroz MC y Paredes GA. Relations between delayed diagnosis and forms of onset in Duchenne muscular dystrophy. Gac Med Mex. 1994; 130: 459-464.

Álvarez LM, Ortiz MJD, Narro JA, Solís AJG y Morales AA. Evaluación de la actividad de la creatinofosfocinasa (CPK) para la detección de portadoras de distrofia muscular tipo Duchenne en familias de la ciudad de Monterrey, México. Rev Invest Clin. 1990. 42: 39-45.

Anderson JT, Rogers RP y Jarrett HW. Ca<sup>2+</sup>-calmodulin binds to the carboxyl-terminal domain of dystrophin. J Biol Chem. 1996; 271: 6605-6610.

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

Anderson LV, Davison K, Moss JA, Richard I, Fardeau M, Tome FM, Hübner C, Lasa A, Colomer J y Beckmann JS. Characterization of monoclonal antibodies to calpain 3 and protein expression in muscle from patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2A. Am J Pathol. 1998; 153: 1169-1179.

Arenas D, Coral R, Cisneros B, Peñaloza L, Salamanca F, Kofman S, Mercado R, Méndez J, Martínez, Montañez C. (1996). Carrier detection in Duchenne and Becker muscular dystrophy using dinucleotide repeat polymorphisms. A study in Mexican families. Arch Med Res 27:151-156.

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

Bansal D y Campbell KP. Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. Trends Cell Biol. 2004; 14: 206-213.

Barresi, R, Moore, SA, Stolle, A, Mendell, R, Campbell, KP (2000) Expression of g-arcoglycan in smooth muscle and its interaction with the smooth muscle sarcoglycan-sarcospan complex. J Biol Chem 275: 38554-38560.

Bonemann C.G., Modi R., Noguchi R., Mizuno Y., Yoshida M., Gussoni E., McNally E.M., et al. (1995). b-sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. Nat Genet 11:266-273.

Bonemann C.G., Modi R., Noguchi R., Mizuno Y., Yoshida M., Gussoni E., McNally E.M., et al. (1995). b-sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. Nat Genet 11:266-273.

Bonne G, Mercuri E, Muchir A, Urtizbera A, Becane HM, Recan D, Merlini L, Wehnert M, Boor R, Reuner U, Vorgerd M, Wicklein EM, Eymard B, Duboc D, Penisson-Besnier I, Cuisset JM, Ferrer X, Desguerre I, Lacombe D, Bushby K, Pollitt C, Toniolo D, Fardeau M, Schwartz K, Muntoni F. Clinical and molecular genetic spectrum of autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy due to mutations of the lamin A/C gene (2000). *Ann Neurol.* 48(2):170-180.

Bonne G. La saga de las laminopatias. *Rev Neurol.* 2003; 37; 772-774.

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

Brais B, Bouchard JP, Xie YG, Rochefort DL, Chretien N, Tome FM, Lafreniere RG, Rommens JM, Uyama E, Nohira O, Blumen S, Korczyn AD, Heutink P, Mathieu J, Duranceau A, Codere F, Fardeau M y Rouleau GA. Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nat Genet.* 1998; 18: 164-167.

Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC y Brecht DS. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell.* 1996; 84: 757-767.

Brenman JE, Chao DS, Xia H, Aldape K y Brecht DS. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell.* 1995; 82: 743-752.

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

Bushby KMD, Thambyayah M, Gardner-Medwin D. Prevalence and incidence of Becker muscular dystrophy (1991). *Lancet.* 337: 1022-4.

Bushby KMD. The limb-girdle muscular dystrophies. (2001) In: Emery AEH, ed. *The muscular dystrophies.* Oxford: Oxford University Press 109-36.

Caldwell CJ, Matthey DL y Weller RO. Role of the basement membrane in the regeneration of skeletal muscle. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1990; 16: 225-238.

Cambell KP. Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell.* 1995; 80: 675-679.

Camelo AL, Awad RA, Madrazo A y Aguilar F. Esophageal motility disorders in Mexican patients with Duchenne's muscular dystrophy. *Acta Gastroenterol Latinoam.* 1997; 27: 119-122.

Chan Yui-mo, Carsten. Molecular Organization of sarcoglycan complex in mouse myotubes in cultura. (1998). *The Journal of Cell Biology.*

Chrobakova T, Hermanova M, Kroupova I, Vondracek P, Marikova T, Mazanec R, Zamecnik J, Stanek J, Havlova M y Fajkusova L. Mutations in Czech LGMD2A patients revealed by analysis of calpain3 mRNA and their phenotypic outcome. *Neuromuscul Disord*. 2004; 14: 659-665.

Cohn RD y Campbell KP. Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve*. 2000; 23: 1456-1471.

Cohn RD, Durbeej M, Steve M, Coral-Vázquez R, Sally P, Campbell KP. 2001. Prevention of cardiomyopathy in mouse models lacking the smooth muscle sarcoglycan-sarcospan complex. *JCI* 107: R1-R7.

Coral-Vazquez R, Cohn RD, Moore SA, Hill JA, Weiss RM, Davisson RL, Straub V, Barresi R, Bansal D, Hrstka RF, Williamson R, Campbell KP. Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle: a novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy (1999). *Cell*. 98(4):465-474.

Coral-Vazquez, R, Arenas D, Cisneros D, Peñaloza L, Salamanca F, Kofman S, Mercado R, Montañez C. (1997). Pattern of Deletions of the Dystrophin Gene in Mexican Duchenne/Becker Muscular Dystrophy Patients: The Use of New Designed Primers for the Analysis of the Major Deletion "Hot Spot" Region. *Am J Med Genet* 70:240-246.

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

Crosbie R H., Lebakken C.S., Venzke D.P., Straub V., Lee J.C., Grady R.M., Chamberlain J.S., Sanes J.R., y Cambell K.P., (1999). Membrane targeting and stabilization of sarcospan is mediated by the sarcoglycan subcomplex. *J Cell Biol*. 145 (1): 153-165.

Crosbie RH, Heighway J, Venzke DP, Lee JC, Campbell KP. Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem*. 1997; 272(50):31221-31224.

Davies Kay E and Nowak Kristen J. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players (2006). *Nature*. 7: 762-773.

Durbeej M., Cohn R.D., Hrstka R.F., Moore S.A., Allamand V., Davidson B.L., et al. (2000). Disruption of the b-sarcoglycan gene reveals pathogenetic complexity of limb-girdle muscular dystrophy type 2E. *Cell* 5 :141-151

Emery AEH. (2002). The muscular dystrophies. *Lancet* 359 :687-695.

Engel AG, Yamamoto M, Fischbeck KH. Hystrophinopathies (1994). En: Engel AG, Franzini-Armstrong C, editores. *Myology*, 2ª ed. New York: Ed. McGraw-Hill. p. 1130-87.

Erazo-Torricelli R. Updates in muscular dystrophies *Rev Neurol*. 2004; 39(9):860-871.

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

Estrada FJ. Tesis de doctorado. Identificación y caracterización de isoformas del complejo sarcoglicano-sarcospan CSG-SSPN. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México. 2005.

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. Primary adhalinopathy (alphasarcoglycanopathy): clinical, pathologic, and genetic correlation in 20 patients with autosomal recessive muscular dystrophy. *Neurology* (1997) 48:1227–1234.

Fougerousse F, Durand M, Suel L, Pourquie O, Delezoide AL, Romero NB, Abitbol M, and Beckmann JS. Expression of genes (CAPN3, SGCA, SGCB, and TTN) involved in progressive muscular dystrophies during early human development(1998). *Genomics*. 48: 145-156.

Guglieri M, Magri F y Comi GP M, Magri F y Comi GP. Molecular etiopathogenesis of limb girdle muscular and congenital muscular dystrophies: boundaries and contiguities. *Clin Chim Acta*. 2005; 361: 54-79.

Hack AA, Groh ME, McNally EM. Sarcoglycans in muscular dystrophy (2000). *Microsc Res Tech*. 48: 167-80.

Hayashi T, Arimura T, Ueda K, Shibata H, Hohda S, Takahashi M, Hori H, Koga Y, Oka N, Imaizumi T, Yasunami M y Kimura A. Identification and functional analysis of a caveolin-3 mutation associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 313: 178-184.

Helbling-Leclerc A, Zhang X, Topaloglu H, et al. Mutations in the laminin alpha 2-chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Nat Genet* (1995);11:216– 8.

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

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

Illa I, Serrano-Munuera C, Gallardo E, Lasa A, Rojas-Garcia R, Palmer J, Gallano P, Baiget M, Matsuda C y Brown RH. Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype. *Ann Neurol*. 2001; 49: 130-134.

Illarioshkin SN, Ivanova-Smolenskaya IA, Greenberg CR, Nylen E, Sukhorukov VS, Poleshchuk VV, et al. Identical dysferlin mutation in limb-girdle muscular dystrophy type 2B and distal myopathy (2000). *Neurology*. 55: 1931-3.

Jones KJ, et al. The expanding phenotype of laminin alpha 2 chain (merosin) abnormalities: case series and review (2000). *J Med Genet*. 38: 649-57.

Kawabe K, Goto K, Nishino I, Angelini C, Hayashi YK. Dysferlin mutation analysis in a group of Italian patients with limb-girdle muscular dystrophy and Miyoshi myopathy. *Eur J Neurol*. (2004); 11(10):657-661.

Lim L.E., Duclos F., Broux O., Bourg N., Sunada Y., Allamand V., Meyer J., Richard J., et al. (1995). b-sarcoglycan (43 DAG): characterization and involvement in a recessive form of limb-girdle muscular dystrophy linked to chromosome 4q12. *Nat Genet* 11:257-265.

Maidment SL, Ellis JA. Muscular dystrophies, dilated cardiomyopathy, lipodystrophy and neuropathy: the nuclear connection (2002). *Expert Rev Mol Med*. 2002: 1-21.

Malhotra SB, Hart KA, Klamut HJ, Thomas NST, Bodrung SE, Burghes AHM, Bobrow M, Harper PS, Thompson MW, Ray PN, Worton RG. Frame-shift deletions in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy (1988). *Science*. 242: 755-759.

Manilal S, Recan D, Sewry CA, Hoeltzenbein M, Llense S, Leturcq F, Deburgrave N, Barbot J, Man N, Muntoni F, Wehnert M, Kaplan J, Morris GE. Mutations in Emery-Dreifuss muscular dystrophy and their effects on emerin protein expression (1998). *Hum Mol Genet*. 7(5):855-864.

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

McNally EM, Passos-Bueno MR, Bonnemann CG, Vainzof M, de Sa Moreira E, Lidov HG, Othmane KB, Denton PH, Vance JM, Zatz M, Kunkel LM. Mild and severe muscular dystrophy caused by a single gamma-sarcoglycan mutation (1996). *Am J Hum Genet*. 59(5):1040-1047.

McNally EM, Yoshida M, Mizuno Y, Ozawa E, Kunkel LM. (1994). Human adhalin is alternatively spliced and the gene is located on chromosome 17q21. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9690-4.

Melacini P, Fanin M, Duggan DJ, Freda MP, Berardinelli A, Danieli GA, Barchitta A, Hoffman EP, Dalla Volta S, Angelini C. (1999). Heart involvement in muscular dystrophies due to sarcoglycan gene mutations. *Muscle Nerve*. 22:473-9.

Merlini L, Kaplan JC, Navarro C, Barois A, Bonneau D, Brasa J, et al. Homogeneous phenotype of the gypsy limb-girdle MD with  $\gamma$ -sarcoglycan C283Y mutation (2000). *Neurology*. 54: 1075-9.

Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus (1988). *Genomics*. 2:90.

Moreira E.S., Vainzof M., Marie S.K., Nigro V., Zatz M., and Passos-Bueno M.R. (1998). A first missense mutation in the delta sarcoglycan gene associated with a severe phenotype and frequency of limb-girdle muscular dystrophy type 2F (LGMD2F) in Brazilian sarcoglycanopathies. *J. Med. Genet.* 35:951-3.

Moreira E.S., Vainzof M., Marie S.K., Sertié A.L., Zatz M., and Passos-Bueno, M.R. (1997). The seventh form of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy is mapped to 17q11-12. *Am. J. Hum. Genet.* 61:151-9

Moreira E.S., Wiltsire T.J., Faulkner G., Nilforoushan A., Vainzof M., Suzuki O.T., Valle G., Reeves R., Zatz M., Passos-Bueno R.M., Jenne D.E.. (2000). Limb girdle muscular dystrophy type 2G is caused by mutations in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin. *Nat. Genet.* 24:163-6.

Navarro C y Teijeira S. Miopatología. Un nuevo concepto. Nuevo laboratorio. *Neurología*. 2004; 19: 168-182.

Nigro V, De Sa Moreira E, Piluso G, et al. Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy, LGMD2F is caused by a mutation in the delta-sarcoglycan gene (1996). *Nat Genet.* 14: 195-8.

Nigro V., Moreira E.S., Piluso G., Vainzof M., Belsito A., Politano L., Puca A.A., Passo-Bueno M.R., Zartz M. (1996a). The 5q autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy (LGMD2F) is caused by a mutation in the d-sarcoglycan gene. *Nat. Genet.* 14:195-6.

Nigro V., Piluso G., Belsito A., Politano L., Pucca A.A., Papparella S., Rossi E., et al., (1996b). Identification of a novel sarcoglycan gene at 5q33 encoding a sarcolemmal 35 kDa glycoprotein. *Hum. Mol. Genet.* 5:1179-1186.

Noguchi S, McNally EM, Ben Othmane K, Hagiwara Y, Mizuno Y, Yoshida M, Yamamoto H, Bonnemann CG, Gussoni E, Denton PH, Kyriakides T, Middleton L, Hentati F, Ben Hamida M, Nonaka I, Vance JM, Kunkel LM, Ozawa E. Mutations in the dystrophin-associated protein gamma-sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy (1995). *Science*. 270(5237):819-822.

Ohlendieck K, Campbell KP. Dystrophin-associated proteins are greatly reduced in skeletal muscle from mdx mice (1991). *J Cell Biol.* 115(6): 1685-94.

Ohlendieck K, Matsumura K, Ionasescu VV, Tome FM, Nonaka I, Burghes AH, Mora M, Kaplan JC, Fardeau M, Campbell KP. The role of the dystrophin-glycoprotein complex in the molecular pathogenesis of muscular dystrophies (1993). *Neuromuscul Disord.* 3 (5-6); 533-5.

Piccolo F, Moore SA, Ford GC y Campbell KP. Intracellular accumulation and reduced sarcolemmal expression of dysferlin in limb-girdle muscular dystrophies. *Ann Neurol.* 2000; 48: 902-912.

Prior TW y Bridgeman SJ. Experience and strategy for the molecular testing of Duchenne muscular dystrophy. *J Mol Diagn.* 2005; 7: 317-326.

Richard I, Roudaut C, Saenz A, Pogue R, Grimbergen JE, Anderson LV, Beley C, Cobo AM, de Diego C, Eymard B, Gallano P, Ginjaar HB, Lasa A, Pollitt C, Topaloglu H, Urtizberea JA, de Visser M, van der Kooi A, Bushby K, Bakker E, Lopez de Munain A, Fardeau M y Beckmann JS. Calpainopathy-a survey of mutations and polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 1999; 64: 1524-1540.

Roberds S.L., Leturcq F., Allamand V., Piccolo F., Jeanpierre M., Anderson R.D., Lim L.E., et al. (1994). Missense mutation in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell* 78:625-633.

Roberds SL, Romero NB, Tome FMS, Leturcq F, Kerch FE, Aaibi K, Bachner L, Anderson RD, Campbell KP, Fardeau M. and Kaplan JC. Genetic heterogeneity of severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy with adhalin (50 kDa dystrophin-associated glycoprotein) deficiency (1994). *C.R. Acad Sci (Paris).*, 317: 70-76.

Roberds, Steven L, France Leturcq, Valérie Allamand, Federica Piccolo, Marc Jeanpierre, Richard D. Anderson, Leland E. Lim, Jane C. Lee, Fernando M.S. Tomé, Norma B. Romero, Michel Fardeau, Jacques S. Beckmann, Jean-Claude Kaplan, and Kevin P. Campbell. Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy (1994). *Cell.* 78(4):625-633.

Salamanca F, Coral R, Peñaloza R, Arenas D, Gonzalez M, Barrientos C y Buentello L. Molecular studies of Mendelian disorders, embryonic neoplasias, and polymorphisms in selected samples of the general population. A contribution to the genetic characterization of the Mexican population. *Arch Med Res.* 1995; 26: 69-75.

Sorimachi H, Kinbara K, Kimura S, et al. Muscle-specific calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connectin through IS2, a p94-specific sequence (1995). *J Biol Chem.* 270:31158-62.

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

Straub., V., and Campbell., K.P. (1997). Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Curr. Opin. Neurol.* 10, 168-175.

Takahashi T, Aoki M, Tateyama M, Kondo E, Mizuno T, Onodera Y, Takano R, Kawai H, Kamakura K, Mochizuki H, Shizuka-Ikeda M, Nakagawa M, Yoshida Y, Akanuma J, Hoshino K, Saito H, Nishizawa M, Kato S, Saito K, Miyachi T, Yamashita H, Kawai M, Matsumura T, Kuzuhara S, Ibi T, Sahashi K, Nakai H, Kohnosu T, Nonaka I, Arahata K, Brown RH Jr, Saito H, Itoyama Y. Dysferlin mutations in Japanese Miyoshi myopathy: relationship to phenotype (2003). *Neurology*. 60(11):1799-1804.

Towbin H, Staehelin T y Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci*. (1979); 76: 4350-4354.

Vainzof M y Zatz M. Protein defects in neuromuscular diseases. *Braz J Med Biol Res*. 2003; 36: 543-555.

Vainzof M, Anderson LV, McNally EM, Davis DB, Faulkner G, Valle G, Moreira ES, Avanello RC, Passos-Bueno MR y Zatz M. Dysferlin protein analysis in limb-girdle muscular dystrophies. *J Mol Neurosci*. 2001; 17: 71-80.

Vainzof M, Passos-Bueno MR, Pavanello RC, Marie SK, Oliveira AS y Zatz M. Sarcoglycanopathies are responsible for 68% of severe autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in the Brazilian population. *J Neurol Sci*. 1999; 164: 44-49.

Weiler T, Bashir R, Anderson LV, Davison K, Moss JA, Britton S, et al. Identical mutation in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B or Miyoshi myopathy suggests a role for modifier gene (s) (1999). *Hum Mol Genet* 8: 871-7.

Yang B, Jung D, Motto D, Meyer J, Koretzky G y Campbell KP. SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2. *J Biol Chem*. 1995; 270: 11711-11714.

Zatz M, de Paula F, Starling A y Vainzof M. The 10 autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord*. 2003; 13: 532-544.