



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

**“Determinación de Calpaína 3 por
Inmunoelctrotransferencia en pacientes con Distrofia
Muscular e Inmunofluorescencia Indirecta de Proteínas
Asociadas a la Enfermedad”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

ALICIA SÁNCHEZ PINEDA

ASESOR: DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉX.

2007



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.

DEDICATORIAS

A mi Familia:

A mi Mamá: Sra. Virginia Pineda Galván.

A mi Papá: Sr. Andrés Sánchez Hernández.

A mis hermanos y hermanas:

Andrés, Beatríz, Isabel, Alejandro, Estela y Leticia.

Porque este logro más que mío, les pertenece a ustedes. Porque gracias a ustedes fue posible, porque siempre estaré agradecida con Dios por haberme dado una familia tan hermosa, porque siempre hemos salido adelante juntos y porque toda la vida estemos unidos. Gracias por ser parte de mi vida. Los amo.

AGRADECIMIENTOS

Gracias Dios mío, por permitirme lograr una meta más en mi vida, por poner en mi camino a todas aquellas personas que me ayudaron a conseguirlo. Porque jamás me has abandonado y me has llenado la vida de tantas alegrías y bendiciones. Se que aún me falta mucho por recorrer, pero con tu ayuda se que lo lograré.

A mi Mamá: Sra. Virginia Pineda Galván.

A mi Papá: Sr. Andrés Sánchez Hernández.

Los seres que me dieron la vida y que yo más Amo. Gracias por su infinito amor, su esmero, su dedicación, sus desvelos, porque nunca han escatimado esfuerzos, ni sacrificios para formarme y educarme, a mi y a mis hermanos. Gracias porque siempre han confiado y creído en mí. Ustedes son lo que yo más amo en esta vida y se que por más que yo lo intente, jamás podré pagar todo lo que han hecho por mí. Esta meta alcanzada no es solo mía, si no también de ustedes, por que ustedes lo hicieron posible. Gracias Mamá, Gracias Papá por todos y por cada uno de sus sabios consejos y sus palabras de aliento, gracias por todas sus enseñanzas y por todo su Amor.

A mis hermanos y hermanas:

Andrés, Beatriz, Isabel, Alejandro, Estela y Leticia.

Gracias por todos esos momentos de felicidad, risas y alegrías, que desde la infancia hemos compartido, porque ustedes son parte muy importante en mi vida, por que sin ustedes mi vida no seria la misma. Gracias por su amistad, por su motivación para seguir adelante, por sus enseñanzas, por su convivencia diaria, por estar conmigo siempre en las buenas y en las malas. Pero sobre todo gracias por su amor, hermanos los Amo.

A ti Juan, porque a tu lado he aprendido muchas cosas, porque hemos compartido momentos hermosos. Por que aun a pesar del tiempo seguimos juntos. Gracias por hacerme feliz, gracias por quererme tanto.

Al Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez, gracias por haberme permitido pertenecer a su equipo de trabajo y ser su alumna, por brindarme la oportunidad de aprender más, gracias Dr. Ramón por todo su apoyo, ha sido para mi un gran maestro y ejemplo, yo lo admiro mucho no solo por sus logros profesionales, si no también por la gran persona que es usted.

A Victoria, por que el laboratorio no seria el mismo sin ti, gracias porque siempre que te necesite estuviste presente, gracias por tu amistad.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Rocío, Gabriel, Bladimir, Manuel, Sofía, Benjamín, Adrián, Alhondra y Deyanira. Gracias por su amistad, compañerismo y por todo lo aprendido en el laboratorio.

A todos y cada uno de los miembros de mi jurado: Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo, Dra. Patricia Ramirez Noguera, Dr. Victor Zendejas Buitrón, Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez y QFB. Ladislao Palomar Morales. Gracias por su tiempo dedicado en la revisión y contribución a este trabajo.

A mis queridas amigas de toda la vida: Susana y Alma.

Gracias por su amistad, que aun con el paso de años jamás se ha perdido, al contrario se ha fortalecido más. Gracias por su apoyo que siempre me han brindado. Saben que en mí siempre tendrán a una amiga.

A mis queridos profesores, gracias por todas sus enseñanzas, por su dedicación a las clases, y por su esmero para que nosotros como alumnos aprendiéramos lo mejor.

A mi amada Universidad, gracias por haberme permitido ser parte de ella, por que es un sueño hecho realidad ser egresada de esta máxima casa de estudios.

A mis amigos(as) de la Facultad: Sara, gracias por tú confianza y amistad, por ser la linda persona que eres. Veronica, mi gran compañera y amiga, gracias por tu amistad y por los momentos compartidos. Guadalupe, Janette, Mario y Carlos mis queridos amigos, sin ustedes la facultad no hubiera sido la misma, gracias por que desde que los conocí se convirtieron en mis mejores amigos y compañeros de la Facultad, gracias por su amistad y los momentos tan agradables que compartimos. A Cristal y Griselda, gracias por su amistad y compañerismo.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de la debilidad muscular predominante en los diferentes tipos de distrofia muscular	3
Figura 2. Estructura de una fibra de músculo esquelético	5
Figura 3. Organización molecular integrales y periféricos de las proteínas del DGC implicadas en distrofia muscular de músculo esquelético	7
Figura 4. Organización de las calpaínas ubicuas, de la subunidad pequeña y Calpaína 3	24
Figura 5. Representación de una laminilla con criosecciones	40
Figura 6. Representación de un gel de poliacrilamida, gel concentrador y gel separador	45
Figura 7. Transferencia de proteínas	46
Figura 8. Imagen del estudio de Inmunofluorescencia Indirecta del paciente 5	49
Figura 9. Arbol genealógico del paciente 13	50
Figura 10. Imagen de Inmunofluorescencia indirecta del paciente 13	51
Figura 11. Árbol genealógico del paciente 8	52
Figura 12. Imagen del análisis de Inmunofluorescencias del paciente 8	53
Figura 13. Estudio Inmunohistoquímico de la paciente 3	54
Figura 14. Estudio de Inmunofluorescencia del paciente 1	55
Figura 15. Resultados de Inmunofluorescencia del paciente 10	56
Figura 16. Estudio de Inmunofluorescencia del paciente 4	57
Figura 17. Resultado de Inmunofluorescencia del paciente 15	58
Figura 18. Resultado de Inmunoelctrotransferencia de la estandarización para Calpaína 3 y MHC.	60
Figura 19. Tinción con Azul de Coomassie para las proteínas	61
Figura 20. Resultados de la Inmunoelctrotransferencia	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla. 1. Proteínas relacionadas con distrofias musculares	9
Tabla 2. Datos de los 20 pacientes analizados por Inmunofluorescencia Indirecta	39
Tabla 3. Preparación de diluciones de anticuerpos específicos	42
Tabla 4. Datos de los 12 pacientes analizados para la determinación de Calpaína 3 por medio de Inmunoelectrotransferencia	43
Tabla. 5. Anticuerpos empleados en la Inmunoelectrotransferencia	47
Tabla 6. Resultados del análisis por Inmunofluorescencia Indirecta	48
Tabla 7. Resultados de IDV (Integrated Density Value) de Calpaína 3	63
Tabla. 8. Resultados de IDV (Integrated Density Value) de Miosina	63
Tabla 9. Cálculos para Calpaína 3	64
Tabla 10. Resultados del análisis por Inmunoelectrotransferencia	65

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Grafica 1. Resultados de Inmunofluorescencia Indirecta	59
Gráfica 2. Expresión de Calpaína 3 en pacientes analizados por Inmunoelectrotransferencia	66

ÍNDICE

Abreviaturas	<i>i</i>
Índice de Figuras	<i>iv</i>
Índice de Tablas	<i>v</i>
Índice de Gráficas	<i>v</i>
Índice	<i>vi</i>
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades	1
1.2. Músculo esquelético	4
2. Complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina (DGC)	7
3. Distrofina	10
3.1. Distrofinopatías (Duchenne y Becker)	12
4. Distrofias musculares de cinturas (LGMDs)	14
4.1. Subcomplejo Sarcoglicano-sarcospan (SG-SSPN)	15
4.1.1. α - Sarcoglicano (LGMD 2D)	17
4.1.2. β - Sarcoglicano (LGMD 2E)	18
4.1.3. γ - Sarcoglicano (LGMD 2C) y δ - Sarcoglicano (LGMD 2F)	19
4.1.4. ε - Sarcoglicano	20
4.1.5. ζ - Sarcoglicano	20
4.1.6. Subcomplejo Distroglicano	21
5. Disferlina	22
5.1. LGMD 2B	23
6. Calpaína-3	24
6.1. LGMD 2A	27
7. Distrofia muscular de Emery-Dreifuss	28
7. 1. Emerina	28
7.1.1. Distrofia muscular de Emery-Dreifuss ligada al cromosoma X (X-EDMD)	28
7.2. Lamina A/C	29
8. Distrofias musculares congénitas	30
8.1. α 2-Laminina (Merosina)	31
9. Caveolina-3	31
9.1. Caveolinopatías	32
10. Teletonina	33
10.1. LGMD 2G	33
11. JUSTIFICACIÓN	34
12. OBJETIVO	35
13. OBJETIVOS PARTICULARES	35
14. MATERIAL Y MÉTODOS	36
14.1. Soluciones	37
14.2. Pacientes	37
14.3. Biopsias musculares	40
14.4. Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta	41
14.4.1. Anticuerpos empleados para inmunohistoquímica	42
14.5. Técnica de Inmunolectrotransferencia (IET)	42
14.5.1. Extracción de proteínas (Método de sonicación)	43
14.5.2. Cuantificación de proteínas por espectrofotometría	44
14.5.3. Caracterización de las proteínas por Inmunolectrotransferencia	44
14.5.4. Técnica de Tinción con Azul de Coomassie	45

14.5.5. Transferencia de Proteínas	45
14.5.6. Identificación de Proteínas	46
14.5.7. Cuantificación de proteínas con el analizador de imágenes (Densitometría)	47
15. RESULTADOS	48
15.1. Resultados de Inmunofluorescencia Indirecta	48
15.2. Resultados de Inmunoelectrotransferencia (IET)	60
15.2.1. Estandarización de IET para Calpaína 3 y MHC	60
15.2.2. Tinción con Azul de Coomassie	61
15.2.3. Resultados de la IET de los pacientes analizados	61
15.2.4. Cuantificación en el analizador de imágenes	62
15.2.4.1. Cálculos	64
16. ANÁLISIS DE RESULTADOS	67
17. CONCLUSIONES	74
18. BIBLIOGRAFÍA	75

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	Albúmina 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. ₂₆₀	Densidad óptica a una longitud de onda de 260 nm
DAGI	Gen que codifica para las proteínas α -dístroglicano y β -dístroglicano
DAPI	4',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 disferlina
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	Coeficiente intelectual
Kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
LAMA2	Gen que codifica para la proteína α 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 ribonucleico mensajero
NH ₂	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 desnaturalizante
seg	Segundos
SG	Sarcoglicano
SGCA	Gen que codifica para la proteína α -sarcoglicano
SGCB	Gen que codifica para la proteína β -sarcoglicano
SGCD	Gen que codifica para la proteína δ -sarcoglicano
SGCG	Gen que codifica para la proteína γ -sarcoglicano
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 Drefuss ligada al cromosoma X
Xp21	Brazo corto del cromosoma X region 2 banda 1
α -DG	Proteína α -dístroglicano
α -SG	Proteína α -sarcoglicano
β -DG	Proteína β -dístroglicano
β -SG	Proteína β -sarcoglicano
γ -SG	Proteína γ -sarcoglicano
δ -SG	Proteína δ -sarcoglicano

DETERMINACIÓN DE CALPAÍNA 3 POR INMUNOELECTROTRANSFERENCIA EN PACIENTES CON Distrofia Muscular e Inmunofluorescencia Indirecta de Proteínas Asociadas a la Enfermedad

1.- INTRODUCCIÓN:

1.1. Generalidades

Las distrofias musculares son un grupo heterogéneo de desordenes miopáticos determinados genéticamente, que se caracterizan principalmente por la pérdida y debilidad progresiva del músculo esquelético. (Maidment y Ellis, 2002). El término distrofia muscular abarca más de 30 enfermedades hereditarias, la debilidad muscular conduce a la pérdida de ambulación, dificultad para respirar, comer, y en la mayoría de los casos, la muerte prematura. (Davies Kay E y Nowak Kristen J, 2006).

Las características citopatológicas principales del músculo distrófico incluyen: núcleos centrales, necrosis-regeneración de fibras, además de la acumulación de tejido conectivo y adiposo. La distrofia muscular generalmente no implica el sistema nervioso central o los nervios periféricos, a pesar de su relación anatómica cercana entre el músculo y nervios; sin embargo sí pueden verse afectados el corazón y otros órganos (Davies Kay E y Nowak Kristen J, 2006).

Genéticamente las distrofias musculares se pueden heredar de forma dominante o recesiva, en muchos casos causados por mutaciones de *novo*, y son por lo tanto esporádicas (Davies Kay E y Nowak Kristen J, 2006). El modo de herencia, la edad de inicio, el tipo de músculo esquelético particularmente implicado y la progresión de la enfermedad, se han utilizado para clasificar las diversas formas de distrofia muscular. La edad de inicio de estas enfermedades va desde el nacimiento hasta la edad adulta, siendo en la mayoría de los casos letales antes de la cuarta década de vida. La marcada heterogeneidad fenotípica intrafamiliar en pacientes con distrofia muscular ha dificultado su clasificación. Durante los últimos 10 años, un mayor número de genes se han identificado como causa de diversas formas de distrofia muscular. Estos resultados han conducido a un

cambio profundo en la clasificación de las distrofias musculares, con un nuevo enfoque sobre la base genética molecular más que en síntomas clínicos solamente. (Cohn Ronald D y Campbell Kevin P, 2000).

De acuerdo con los músculos principalmente afectados, las distrofias musculares se clasifican en:

- a) Distrofinopatías (Duchenne/Becker) (DMD/DMB).
- b) Distrofia de Emery-Dreifuss (DMED).
- c) Distrofia de cintura (LGMD).
- d) Distrofia facioescapulohumeral (DFEH), en donde los músculos inicialmente afectados son los de la cara y de la cintura escapular, posteriormente se afectan los músculos extensores de los pies y cintura pélvica (Zatz, 2002).
- e) Distrofia distal.
- f) Distrofia oculofaríngea, se ven afectados los músculos extraoculares y los faciales superiores, debilidad en el cuello. La caída de los párpados (presencia de ptosis) y dificultad para tragar (disfagia) son características frecuentes de esta enfermedad (Brais *et al*, 1998; Emery, 2002). (Fig. 1) (Emery Alan E.H., 2002).

Además de estos tipos de distrofias también se encuentra la distrofia muscular congénita (DMC) en la cual se presenta una afección generalizada (Jones *et al*, 2001).

En varios de estos desordenes el tejido cardiaco puede verse seriamente afectado, algunas veces en ausencia de una debilidad clínica significativa. (Emery Alan E.H., 2002).

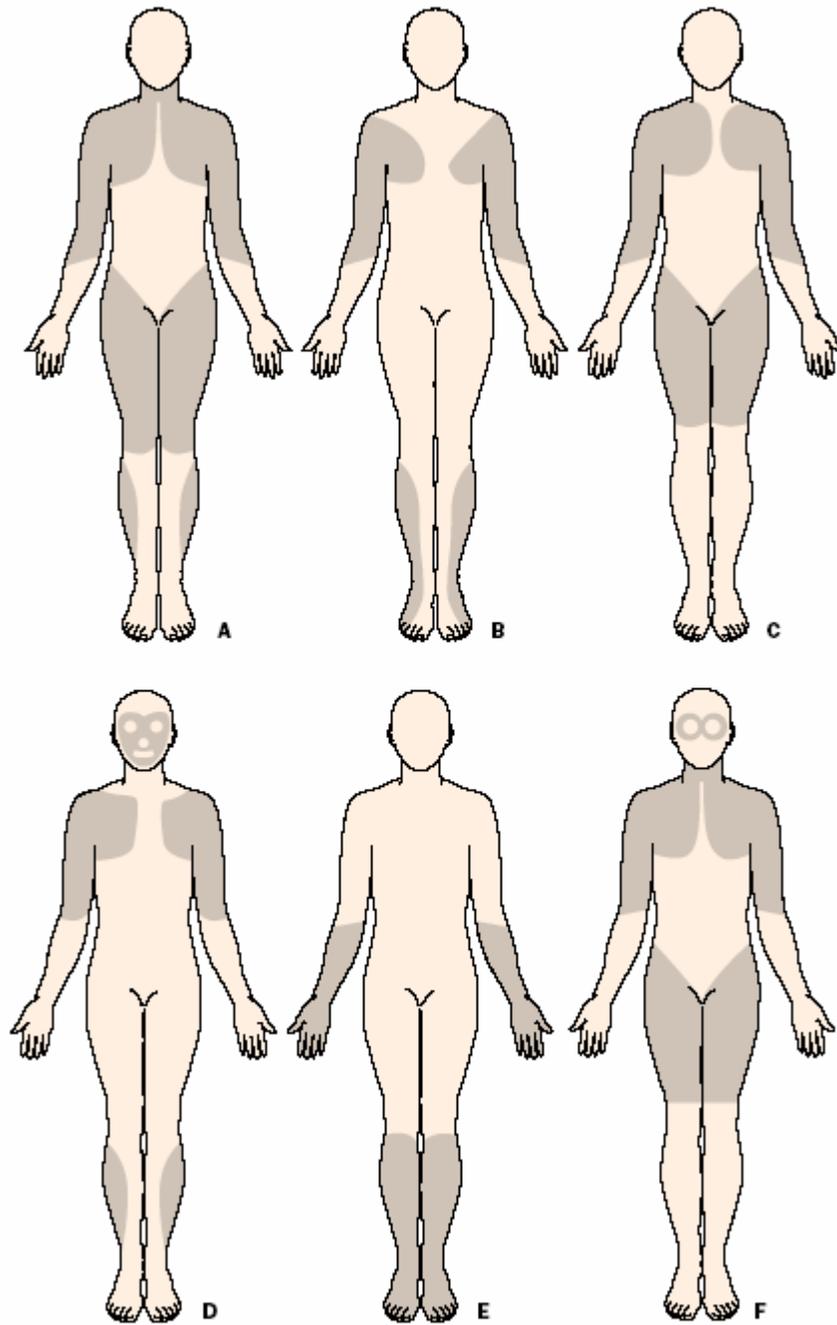


Figura 1. Distribución de la debilidad muscular predominante en los diferentes tipos de distrofia muscular. a) Tipo Duchenne y Becker, b) Emery-Dreifuss, c) Cintura, d) Facioescapulohumeral, e) Distal, f) Oculofaringea. Reproducida de Emery Alan E H, 2002.

1.2. Músculo Esquelético

El músculo esquelético es el músculo que se encuentra unido al esqueleto. Los extremos de los músculos esqueléticos se insertan en estructuras óseas mediante tendones constituidos por tejido conjuntivo muy resistente. Cuando se contrae un músculo disminuye su tamaño y da lugar a una tensión de sus tendones y de los huesos en los que se inserta. La tensión muscular causa movimiento de los huesos en las articulaciones, de manera que unos huesos presentan mayor movimiento que otros (Tortora G, 2005).

Las proteínas del tejido conjuntivo fibroso de los tendones rodean al músculo con una disposición irregular formando una vaina denominada *epimisio* (*epi*=por encima; *my*=músculo). El tejido conjuntivo procedente de esa cubierta externa se extiende hacia el interior del músculo y lo divide en columnas o *fascículos*. Así cada uno de esos fascículos está rodeado por su propia vaina o cubierta de tejido conjuntivo que se denomina *perimisio* (*peri*=alrededor de). La disección de fascículo muscular bajo el microscopio revela que, a su vez, el fascículo está constituido por numerosas fibras musculares o miofibras. Cada fibra muscular está rodeada por una membrana celular denominada *sarcolema* que aparece cubierta por una fina capa de tejido conjuntivo denominada *endomisio* (Tortora G, 2005).

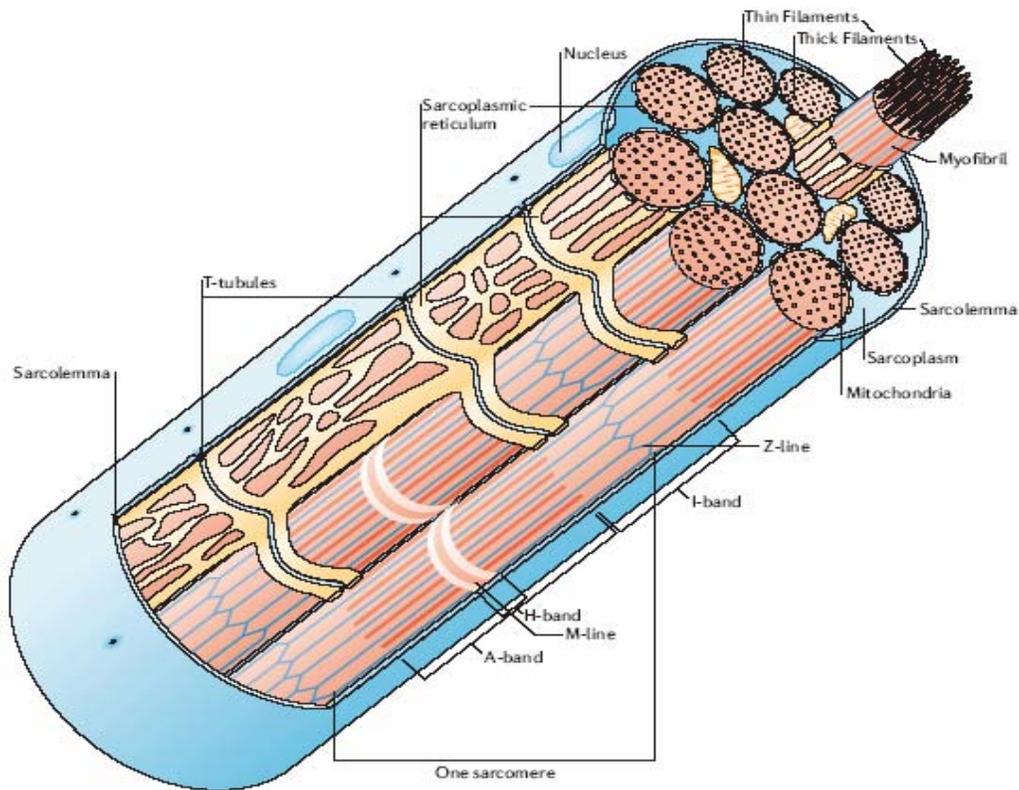


Figura 2. Estructura de una fibra de músculo esquelético. Reproducida de Davies Kay E y Nowak Kristen J, 2006.

El sarcolemma forma una barrera física contra el ambiente externo, interviene en la señalización entre el exterior y la célula muscular. El *sarcoplasma* es el citoplasma especializado de la fibra del músculo estriado que contiene los elementos subcelulares, aparato de Golgi, un retículo endoplásmico conocido como retículo sarcoplásmico (RS), los gránulos del glucógeno, la mioglobina y las mitocondrias. Los túbulos transversos T son invaginaciones del sarcolemma (Fig. 2)(Davies Kay E y Nowak Kristen J, 2006.) que permite que las señales de acción-potencial penetren a la célula y activen al RS que forma una red alrededor de las miofibras, almacenando y proporcionando Ca^{2+} que se requiere para la contracción del músculo.

Las miofibras son unidades contráctiles que consisten en un arreglo de miofilamentos longitudinales. Los miofilamentos pueden ser filamentos gruesos constituidos por miosina o filamentos finos constituidos por actina. El

movimiento (regulada por Ca^{2+}) de los puentes cruzados que van de los filamentos gruesos a los finos causa el deslizamiento de los filamentos con aparición de tensión muscular y acortamiento. (Davies Kay E. y Nowak Kristen J., 2006.)

A pesar de su forma alargada poco habitual, las fibras musculares contienen los mismos orgánulos que las demás células: mitocondrias, membranas intracelulares, gránulos de glucógeno, entre otros. Sin embargo, a diferencia de la mayor parte de las células del cuerpo, las fibras musculares esqueléticas son multinucleadas. La razón es que cada fibra muscular es una estructura sincicial; es decir, cada fibra muscular está formada por la unión de varios mioblastos embrionarios. Sin embargo, la característica más notable de las fibras musculares esqueléticas es su aspecto estriado cuando se contempla en el microscopio. Las estriaciones se deben a la alternancia de bandas oscuras y claras. Las bandas oscuras se denominan bandas A constituida por filamentos gruesos y las claras, bandas I, constituida por filamentos finos. Cuando se observan las fibras musculares esqueléticas con el microscopio electrónico, en la parte media de las bandas I existen líneas oscuras finas que se denominan líneas Z. Las letras A e I indican *anisotrópica* e *isotrópica*, respectivamente, y se refieren al comportamiento de la luz polarizada cuando atraviesa estas regiones; la letra Z procede del vocablo alemán *Zwischenscheibe*, que significa entre discos (Tortora G, 2005).

disrupción del DGC, el cual está integrado por tres subcomplejos de acuerdo con sus características bioquímicas:

- I. En el primer subcomplejo, se encuentran los componentes citoplasmáticos que consisten en proteínas periféricas intracelulares de la membrana: distrofina, sintrofinas, y distrobrevinas. La distrofina es un proteína de 247 kDa que se encuentra unida en su parte amino (NH_2) terminal a F-actina, las sintrofinas y distrobrevinas de 80 y 58 kDa respectivamente se encuentran también asociadas a la distrofina en su parte carboxilo (COOH) terminal.
- II. El segundo subcomplejo designado como complejo distroglicano, constituido por las subunidades α - y β - Distriglicano (DG), α -Distroglicano es una proteína de matriz extracelular, tiene un peso de 156 kDa y se encuentra asociada a la proteína de la lamina basal $\alpha 2$ -laminina, β -Distroglicano es una proteína transmembranal de 46 kDa que se encuentra unido a la parte carboxilo terminal de distrofina. Ambos distroglicanos se traducen de un solo RNAm y se expresan en varios tejidos (Chan Yiu-mo, *et al*, 1998).
- III. El tercer subcomplejo comprende un grupo de proteínas transmembranales denominado Complejo Sarcoglicano-Sarcospan (SG-SSPN) constituido por las subunidades α , 50 kDa; β , 43 kDa; γ , 35 kDa; y δ , 35 kDa, además de la proteína Sarcospan (SSPN), el complejo SG-SSPN se encuentran unido a β -DG por su interacción con δ -SG (Chan Yiu-mo, *et al*, 1998).

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.

Tabla. 1. Proteínas relacionadas con distrofias musculares. Modificado de Guglieri M, *et al*, 2005.

Proteína	PM (kDa)	Localización subcelular	Gen	Locus	Función propuesta	Fenotipo clínico
Distrofina	247	Subsarcolema	DMD	Xp21	Mecánica (ayuda a la estabilización de la membrana) y señalización.	DMD/DMB
Emerina	34	Núcleo	EMD	Xp28	Diferenciación celular y estabilidad a la membrana nuclear.	X-EDMD
Lamina A/C	70 / 65	Núcleo	LMNA	1q11	Diferenciación celular y estabilidad a la membrana nuclear	LGMD1B, AD-EDMD, AR-EDMD, CMT2
Caveolina 3	24	Sarcolema	CAV3	3p25	Señalización celular y formar parte de las caveolas.	LGMD1C
Calpaína 3	94	Citosol	CAPN3	15q15.1-q21.1	Actividad enzimática y remodelación del citoesqueleto.	LGMD2A
Disferlina	230	Sarcolema	DYSF	2p13.3-p13.1	Mecanismos de reparación de membrana.	LGMD 2B, MM, DMAT
α SG	50	Sarcolema	SGCA	17q12-q21.33	Estabilización del DGC.	LGMD 2D

β SG	43	Sarcolema	SGCB	4q12	Estabilización del DGC.	LGMD 2E
γ SG	35	Sarcolema	SGCG	13q12	Estabilización del DGC.	LGMD 2F
δ SG	35	Sarcolema	SGCD	5q33	Estabilización del DGC.	LGMD 2C
Teletonina	19	Sarcómero	TCAP	17q12	Integridad de la sarcómera, autofosforilación en diferenciación temprana de miocitos.	LGMD 2G
α2-Laminina	385	Matriz extracelular	LAMA2	6q2	Unión de α -DG con lámina basal.	MDC1A y una forma similar a LGMD

3. Distrofina

En el año de 1987 se consiguió localizar el gen del 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 deleciones 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. (Teijeira S y Navarro C, 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, el DGC ligaba la actina del citoesqueleto con la matriz extracelular. Estudios posteriores mostraron que el DGC estaba compuesto por tres subcomplejos. (Teijeira S y Navarro C, 2004)

El gen de distrofina 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 (R Erazo-Torricelli, 2004). En la estructura de la distrofina se distinguen cuatro dominios: el NH₃ 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 cisternas; el último dominio de la distrofina es el COOH terminal y su secuencia es sólo comparable al de la utrofina y de la distrobrevina. (Teijeira S y Navarro C, 2004).

En la DMD/B se presentan deleciones, 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 deleciones de los dominios cisteína y C-terminal (R Erazo-Torricelli, 2004). La existencia de estos *hots spots* permite detectar el 98-100 % de las deleciones 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 AP, *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 spot* y no se produce distrofina. (Teijeira S y Navarro C, 2004).

Como las distrofinopatías son enfermedades ligadas al cromosoma X, se expresan en varones, siendo las mujeres portadoras (Engel AG, *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”. En el primero, la mujer presentaría una translocación entre un cromosoma X y un autosoma, translocación que incluye total o parcialmente el gen de la distrofina. El segundo supuesto sería, el de una mujer con cariotipo normal con una mutación en el gen de la distrofina en una X y una desviación en la *lyonización* o *lyonización desigual*, resultando más cromosomas X mutados activos que inactivos. El tercer supuesto, sería el de un síndrome de Turner o alguna de sus variantes que ocurriese una mutación en el único cromosoma X que posee la paciente. Y un cuarto supuesto, en una mujer con cariotipo normal y una delección en estado homocigoto causado por isodisomía materna del cromosoma X completo (Quan F, *et al*, 1997).

La distrofina se expresa en el músculo liso y estriado, el corazón y el cerebro, está codificada por un gen situado en el brazo corto del cromosoma X, en el locus Xp21. La distrofina forma parte de un complejo de varias proteínas sarcolémicas y de glicoproteínas. Se localiza en el sarcoplasma, en posición subsarcolémica, anclada de su extremo NH₂ terminal a la proteína del citoesqueleto F-actina. Su parte COOH terminal que es rica en cisteína, y se encuentra unida al complejo de glicoproteínas del sarcolema además de las sintrofinas y distrobrevinas. (Vainzof M y Zatz M, 2003).

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. (R 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).

3.1. Distrofinopatías (Duchenne y Becker)

La distrofia muscular de Duchenne/Becker (DMD/BMD) (distrofinopatías), es causada por mutaciones en el gen que codifica para la proteína distrofina, que se encuentra localizado en el cromosoma X, (Tabla 1), es una enfermedad recesiva y ligada al cromosoma X, por lo tanto los varones son los principales afectados. El gen puede sufrir deleciones, o mutaciones puntuales, lo que determina un fallo en la producción de distrofina. La gravedad del fenotipo depende, fundamentalmente del sitio de la mutación más que de su tamaño. La debilidad muscular es generalmente proximal y progresiva.

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 (R Erazo-Torricelli, 2004), debilidad progresiva con dificultad para subir escaleras, frecuentes caídas además de una marcada hipertrofia en las pantorrillas (Vainzof M y Zatz M, 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 M y Zatz M, 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 cardiacos es la principal causa de muerte, lo que sucede en la segunda década de vida. (Emery Alan E H, 2002).

Los niveles séricos de creatincinasa (CK) están muy elevados, alrededor de 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 aminotrasferasa (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 1:18450 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 e indemnidad de los flexores del cuello. 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. (R Erazo-Torricelli, 2004). El signo de Gowers 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 Alan E H, 2002).

La proteína distrofina generalmente está ausente en pacientes con distrofia muscular de Duchenne, pero hay una reducción significativa en los pacientes con

distrofia muscular de Becker. Sin embargo, en casos raros de distrofia muscular de Duchenne la proteína distrofina puede ser detectada (Vainzof M y Zatz M, 2003).

4. Distrofias musculares de cinturas (LGMD)

Las distrofias musculares de cinturas (*Limb girdle muscular dystrophies* LGMD) se describen como un grupo heterogéneo de enfermedades musculares genéticamente determinadas, con afección predominante en los músculos proximales de la extremidades y en las cinturas escapular y pélvica (Vainzof M y Zatz M, 2003). Aunque hay cuadros de predominio distal como la distrofia de Miyoshi (R Erazo-Torricelli, 2004). Esta definición tan general engloba a enfermedades de herencia recesiva y dominante y a otras con cuadros clínicos muy diversos algunos graves y otros de evolución lenta y benigna.

El termino distrofia muscular de cinturas fue introducida por Walton y Natrass en 1954 y fue retomado por Bushby y Beckmann en 1995 como propuesta para una nueva clasificación de las distrofias musculares. (Teijeira S y Navarro C, 2004). En 1994 se localizó el gen de α -sarcoglicano en el cromosoma 17, en el locus 17q12-q21.33 y se detectaron mutaciones en este gen en casos diagnosticados clínicamente.

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 (α -, β -, γ - y δ -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 son a menudo ausentes o reducidos significativamente, en la membrana con base a lo demostrado por estudios de inmunofluorescencia.

Los complejos sarcoglicano-sarcospan (SG-SSPN) y distroglicano (DG) son componentes esenciales del DGC (Blakem, *et al*, 2002). La ausencia de distrofina conduce a la desorganización del DGC y especialmente a la disminución de la expresión de los sarcoglicanos (SGs) del músculo esquelético (Chamberlain *et al*, 1997).

4.1. Subcomplejo Sarcoglicano-sarcospan (SG-SSPN)

El complejo Sarcoglicano-sarcospan (SG-SSPN) es un subcomplejo del DGC, constituido por diferentes proteínas transmembranales llamadas sarcoglicanos, a las cuales se les asocia la proteína sarcospan. Los sarcoglicanos 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). Sarcospan es una proteína de 25 kDa (Crosbie, *et al*, 1997), es un miembro de la familia de tetraspan, (Maecker, *et al*, 1997). El complejo sarcoglicano esta constituido por proteínas denominadas por letras del alfabeto griego en orden decreciente según su peso molecular α -, β -, γ -, y δ -SG (de 50, 43, 35 y 35 kDa respectivamente) y dos proteínas que han sido descubiertas más recientemente; una de ellas llamada ϵ -SG con un peso molecular de 50 kDa que tiene una alta homología con α -SG (Ettinger, *et al*, 1997; Straub, 1999); otra denominada ζ -SG con un peso molecular de 40 kDa y una alta homología con los sarcoglicanos γ y δ (Wheeler, 2002).

Las causas descritas por las que un sarcoglicano puede estar ausente son las mutaciones en los genes que codifican específicamente a las proteínas: α -SG, β -SG, γ -SG y δ -SG. La ausencia de estos sarcoglicanos trae como consecuencia los distintos tipos de Sarcoglicanopatías: LGMD 2D, LGMD 2E, LGMD 2C y LGMD 2F respectivamente (Teijeira S y Navarro C, 2004).

Se han descrito dos complejos distintos que coexisten en el músculo esquelético, el primero constituido por las subunidades α -, β - γ - y ζ -SG, y un segundo formado por ϵ -, β -, γ - y δ -SG (Straub, 1999). En el músculo liso se ha reportado un complejo conformado por las subunidades ϵ -, β -, γ - y δ -SG asociado con una distrofina. Para el caso de ζ -SG se ha detectado su expresión en músculo esquelético, cardiaco y liso vascular (Wheeler, 2002).

El ensamblaje de los sarcoglicanos se caracteriza por tener un proceso específico, en el cual β -SG tiene un papel fundamental, actuando como promotor de la formación del complejo. La glicosilación de β -SG sirve para la asociación con δ -SG, que es esencial para la localización apropiada en la membrana, la unidad β - δ SG se denomina nucleador. Mientras que γ -SG, se propone que sirve como puente de unión entre el nucleador y α -SG (Hack A A, *et al*, 2000). Se determinó que la subunidad ζ -SG forma parte importante del complejo pero se desconoce como se ensambla en él. La ausencia de uno de los sarcoglicanos genera la disminución o pérdida del DGC. La principal función que se adjudica al complejo SG-SSPN es que interviene en la estabilización de la membrana, aunque estudios recientes sugieren que también tiene un papel no mecánico, ya que este complejo puede funcionar como receptor para algún ligando extracelular a través de los SGs β -, γ -, δ - mientras que el α -SG, podría actuar como un efector secundario en la posible participación del complejo SG-SSPN en procesos de transducción de señales (Shi, 2004; Chan You-mi, 1998, Hack A A, 1999).

La integridad del complejo de SG-SSPN requiere de la traducción y el montaje coordinados de sus subunidades. Las perturbaciones de este complejo conducen a las distrofias musculares de cinturas y cardiomiopatías en los seres humanos

(Bonnemann, *et al*, 1995; Coral-Vazquez, *et al*, 1999; Lim, *et al*, 1995; Nigro, *et al*, 1996; Noguchi, *et al*, 1995; Roberds, *et al*, 1994).

Sarcospan tiene un PM de 25 kDa, forma parte de la familia de proteínas tetraspaninas, está compuesto por cuatro dominios transmembranales, sus extremos NH₃ y COOH terminal se ubican en la región citoplasmática (Hack A A, 2000; Wheeler, 2002).

4.1.1. α - Sarcoglicano (LGMD 2D)

El α -SG, también llamado aldhalina, es una glucoproteína transmembranal de 50 kDa. El RNAm de α -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 glucoproteína revela que al igual que ϵ -SG es una proteína de tipo I, ya que su región NH₃ terminal es extracelular. Posee una secuencia señal NH₃ terminal, un dominio señal transmembranal, dos sitios predictivos de glicosilación en el lado NH₃ y un sitio COOH terminal citoplasmático (Hack A A, *et al*, 2000). α - y ϵ -SG presentan una homología del 62 %.

El déficit primario de α -SG origina la distrofia muscular α -Sarcoglicanopatía o LGMD 2D. Las mutaciones en α -SG son las más frecuentes y originan fenotipos menos graves, se observan residuos 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 α -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 cardiaco podría explicar la baja disfunción cardiaca en los pacientes.

El fenotipo de LGMD 2D es muy variable, habiéndose descrito presentaciones similares a la DMD, junto a cuadros clínicos que solamente muestran intolerancia al ejercicio. El espectro de edad de inicio es amplio, pero el promedio son de 6-8 años.

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

4.1.2. β - Sarcoglicano (LGMD 2E)

El β -SG se expresa en músculo esquelético, cardiaco y liso, aunque su RNAm se puede encontrar en otros tejidos como el cerebro (Fougerousse, *et al*, 1998). El déficit de β -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 (Teijeira S y Navarro C, 2004). La afección cardiaca se presenta, especialmente en relación a las β -, γ - y δ -sarcoglicanopatías (Bonnemann CG, *et al*, 2002; Emery AEH, 2002). Particularmente las mutaciones *missense* (sin sentido) en β -SG pueden encontrarse en pacientes con un fenotipo severo y una ausencia casi completa de todos los sarcoglicanos de la membrana (Bonemann, *et al*, 1996 y 1998).

Los sarcoglicanos: β -, γ - y δ - tienen un grupo de residuos de cisteína en la región COOH, cuya función se desconoce (McNally, 1996), aunque esta estructura se ha reportado en moléculas receptoras. Las subunidades β -, γ -, δ - y ζ -SG son proteínas de tipo II, ya que su parte NH₃ terminal es intracelular, además contiene grandes regiones hidrofóbicas. (Hack AA, *et al*, 2000).

El β -SG tiene una baja homología con los demás sarcoglicanos (α -SG y ε -SG) (Hack AA, *et al*, 2000). La secuencia primaria revela que posee un dominio señal transmembranal y tres sitios predictivos de glicosilación a la parte NH₃ terminal a nivel intracelular con regiones hidrofóbicas.

4.1.3. γ - Sarcoglicano (LGMD 2C) y δ - Sarcoglicano (LGMD 2F)

Los sarcoglicanos γ y δ son glucoproteínas 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 δ -SG y γ -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 δ -SG es solamente un homólogo débil de β -SG, con más homología en el dominio extracelular (Hack AA, *et al*, 2000). El RNAm de γ -SG es expresado en músculo esquelético, cardíaco y en menor proporción en músculo liso. Mediante un splice alternativo del exón 8 hay la expresión de este sarcoglicano en otros sitios; sin embargo carece de los residuos conservados de cisteína (Jung, *et al*, 1996).

Los sarcoglicanos β , γ y δ tienen residuos de cisteína conservados en su parte COOH terminal que es extracelular (Hack AA, *et al*, 2000). Los dominios extracelulares de β -, γ - y δ -SG son casi idénticos en longitud (225 a.a., 224 a.a. y 224 a.a., respectivamente).

El déficit de δ -SG origina δ -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 (Teijeira S y Navarro C, 2004). Puede observarse miocardiomiopatía dilatada exclusiva por mutaciones de δ -Sarcoglicano (Moreira ES, *et al*, 1998; Bonnemann CG, *et al*, 2002). En LGMD 2F se ha observado una deficiencia secundaria de distrofina, lo cual sugiere que esta subunidad de sarcoglicanos tiene una interacción más directa con distrofina (Vainzof, *et al*, 1999).

El γ -SG se encuentra exclusivamente en músculo esquelético y cardiaco (Hack AA, *et al*, 2000). Su extremo COOH terminal es similar al de β - y δ -SG con subunidades conservadas de cisteína en una posición fija similar a los sitios de unión de proteínas ricas en cisteína (McNally, *et al*, 1996). En la γ -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 γ -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 L, *et al*, 2000).

Mutaciones en el extremo COOH terminal como C283Y que modifica los residuos conservados de cisteína, producen inestabilidad a la proteína evitando su adecuado ensamblaje al complejo SG (Piccolo, *et al*, 1996).

4.1.4. ϵ - Sarcoglicano

En 1997 se identificó ϵ -SG (45 kDa) una proteína cuya homología con α -SG es del 62 % a nivel de a.a., es una proteína transmembranal de tipo I (Hack AA, *et al*, 2000) con una secuencia señal NH_3 terminal y un dominio transmembranal. Los residuos de cisteína se conservan tanto en α -SG como en ϵ -SG. Su parte COOH terminal reside en el citoplasma. La estructura de los genes del α -SG y ϵ -SG tienen una estructura tan parecida que se ha sugerido que proceden de una duplicación genética. Ambos genes están compuestos de al menos nueve exones (McNally, *et al*, 1998). El ϵ -SG a diferencia de α -SG, se expresa en muchos tipos de tejidos diferentes (Ettinger, *et al*, 1997; McNally, *et al*, 1998). El sarcoglicano ϵ , es también expresado en etapas tempranas del desarrollo y se muestra disminuido en ratones *mdx* (ratones deficientes de distrofina) (Sicinski, *et al*, 1989), pero al parecer mantiene su expresión en deficiencia primaria de α -SG y γ -SG (Duclos, *et al*, 1998; Hack, *et al*, 1998).

El ϵ -SG está codificado por un gen localizado en el cromosoma 7, en el locus 7q21 (McNally, *et al*, 1998). Se han descrito cinco mutaciones que causan un síndrome con distonía y mioclonías (Teijeira S y Navarro C, 2004).

4.1.5. ζ - Sarcoglicano

En el 2002, un sexto sarcoglicano fue descrito y nombrado como ζ -SG de aproximadamente 40 kDa con 299 a.a, codificado por un gen en el cromosoma 8. Esta proteína, que se expresa en músculo esquelético, cardíaco y liso vascular, aunque es parte integral del complejo de sarcoglicanos, no ha sido asociada a ninguna patología (Teijeira S y Navarro C, 2004; Wheeler, *et al*, 2000).

4.1.6. Subcomplejo Distroglicano

Está constituido por dos proteínas: α - y β -distroglicano, codificadas por un solo gen (DAG1) situado en el cromosoma 3, locus 3p25 (Ibraghimov-Beskrovnaya, *et al*, 1993) organizado en únicamente dos exónes. El RNAm codifica un único precursor de 97 kDa que tras modificaciones postraslación da lugar a α -DG de 156 kDa y al β -DG de 43 kDa. En el músculo esquelético se expresa en el sarcolema en la unión neuromuscular y en la unión miotendinosa.

En el caso de los distroglicanos α y β , así como de las sintrofinas α , β 1, β 2 y γ -distrobrevina, no se ha descrito deficiencia primaria de estas proteínas asociadas con algún tipo de distrofia muscular (Williamson, 1997). Aunque se ha observado una disminución distroglicanos en las distrofinopatías y en las sarcoglicanopatías y más recientemente en las distrofias relacionadas con el déficit de la proteína relacionada con la Fukutina (FKRP).

El complejo distroglicano tiene una función esencial en el ensamblaje del citoesqueleto a la matriz extracelular y, por tanto, en el mantenimiento de la integridad de la membrana de la fibra muscular (Teijeira S y Navarro C, 2004). Se ha observado en ratones deficientes de estos distroglicanos, que es muy probablemente que mutaciones en dichas proteínas sean letales (Williamson, 1997).

El complejo DG es importante en las etapas tempranas del desarrollo embrionario de ratón, la ausencia de distroglicanos origina un defecto a nivel de membranas, provocando la muerte del embrión en el día 6 del desarrollo embrionario (Williamson, *et al*, 1997). Investigaciones recientes indican que los distroglicanos

son importantes para la formación adecuada de membranas (Henry y Campbell, 1998; Montanaro, *et al*, 1999).

5. Disferlina

Es una proteína de 240 kDa, 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 LV, *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 D, *et al*, 2003; Hayashi YK, 2003). Además se sugiere también que disferlina interviene en la fusión de membranas en células musculares y en el transporte de vesículas (Bansal y Campbell, 2004).

La disferlina está codificada por el gen DYSF, posee de 55 exones, que abarca aproximadamente 150 kb de DNA genómico, se encuentra codificado en el cromosoma 2, en el locus 2p13.3-p13.1, además de expresarse en músculo esquelético, también se localiza en corazón y riñón. A pesar de que disferlina no es un componente integral del DGC, su distribución se halla alterada en distrofias musculares asociadas al DGC, en las cuales su expresión se encuentra disminuida en la membrana plasmática e incrementada en vesículas citoplasmáticas (Piccolo, *et al*, 2000).

Sus mutaciones dan lugar a las llamadas disferlinopatías, que se expresan clínicamente en diversas formas, pero fundamentalmente en tres: una presentación proximal en la LGMD 2B, distal posterior en la Miopatía de Miyoshi (MM) y la Miopatía distal con afección del compartimento distal anterior (DMAT) (Serrano-Munuera C, *et al*, 2001). También se han descrito familias con variable expresión familiar y otras que presentan los dos fenotipos clínicos (MM y LGMD 2B) entre los afectados (Weiler T, *et al*, 1996, Illarioshkin SN, *et al*, 1996).

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 T, *et al*, 2003). Tanto en inmunohistoquímica como en Western blot o Inmunoelctrotransferencia se ha descrito una ausencia de marcaje o de banda en los respectivos estudios, en las disferlinopatías, cualquiera que sea su fenotipo clínico. Se ha observado un déficit secundario de Calpaína-3 en diversas familias con LGMD 2B (Anderson LV, *et al*, 2000). El músculo en sí presenta un patrón distrófico y con gran frecuencia infiltrados inflamatorios llamativos. En examen ultraestructural muestra alteraciones características de la membrana plasmática en las fibras no necróticas, con pequeños defectos de continuidad y presencia de diminutas vesículas subyacentes a estos defectos o subsarcolémicas (Selcen D, *et al*, 2001).

5.1. LGMD 2B

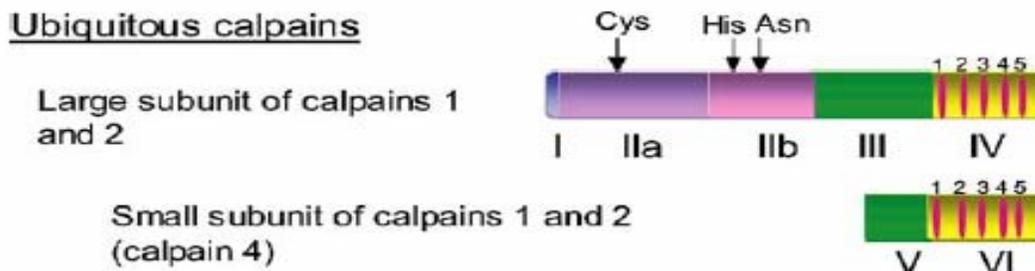
La edad de inicio de la LGMD 2B es en la segunda o tercer década de vida. En las formas de predominio proximal, la musculatura periescapular se afecta muy poco, por lo cual las escápulas aladas no se observan en los estadios iniciales de la LGMD 2B (Illarioshkin SN, *et al*, 2000; Bushby KM, 2000), tiene 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 gastrocnemios, que se presenta también, aunque en menor grado, en la LGMD 2B (Illarioshkin SN, *et al*, 2000; Bushby KM, 2000; Anderson, *et al*, 1999), también se observa afectada la cintura pélvica. La MM es la más común dentro de

las disferlinopatías. A diferencia de la MM, la Miopatía del compartimento distal anterior (DMAT) tiene una rápida progresión de la debilidad en el músculo anterior distal tibial (IIIa, *et al*, 2001; Vainzof M, *et al*, 2001).

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 CG, *et al*, 2000; Weiler T, *et al*, 1999; Bushby KM, 2000).

6. Calpaína-3

La proteína Calpaína-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. Calpaína-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 (Ueyama H, *et al*, 1998). Están implicadas en procesos de señalización, factores de transcripción, proteínas citoesqueléticas y apoptosis (Chrobakova T, *et al*, 2004). En tejido muscular se expresan principalmente tres diferentes calpaínas: las calpaínas ubicuas 1 y 2 (también llamadas (μ) mu- y m-, respectivamente) y Calpaína 3 que es altamente expresada en este tejido (Figura 4.) (Bartoli M y Richard I, 2005).



La función exacta de Calpaína 3, así como la identificación de sus sustratos y de su mecanismo de activación, sigue siendo desconocida. Varias moléculas con funciones reguladoras se han divulgado para ser sustratos de Calpaína 3 en la célula muscular, pero las líneas de investigación sugieren que Calpaína 3 puede estar implicada en la degradación y remodelación del citoesqueleto (Kramerova I, *et al*, 2005). Es poco probable que Calpaína 3 esté implicada en la fusión de mioblastos, pero puede ser que actúe en el desmontaje de miofibras en etapas tempranas o podría causar un defecto post-fusión en la maduración del músculo (Spencer M, *et al*, 2002). Taveau y cols., proponen que Calpaína 3 puede estar implicada en la modificación de las propiedades del músculo y permite exhibir una respuesta fisiológica eficiente a los estímulos externos e internos. Y puede tratarse de una enzima reguladora que interviene en procesos de factores de transcripción que controlan genes de la sobrevivencia (Guglieri M, *et al*, 2005). Se sugiere que la Calpaína 3 es importante en la homeostasis del músculo, otros estudio proponen que su deficiencia está asociada a la apoptosis mionuclear por una perturbación en la vía I κ B α /NF- κ B (Cohn RD y Campbell KP, 2000; Guglieri M, *et al*, 2005). Aunque el significado de estos estudios todavía necesitan ser establecidos, estos podrían considerarse, por lo menos en parte, la pérdida progresiva de células del músculo esquelético en LGMD 2A.

La Calpaína 3 forma parte de los procesos de remodelación del citoesqueleto, está implicada en la fusión de mioblastos y reparación, su deficiencia lleva a interrupciones de la regulación en la interacción proteína-proteína del sarcolema o la línea Z del sarcómero (Guglieri M, *et al*, 2005; Thompson TG, 2000; Takada F, *et al*, 2001; Salmikangas P, *et al*, 2003).

No hay puntos mutacionales en el gen de la Calpaína 3, lo que dificulta su diagnóstico genético. El diagnóstico por biopsia muscular es difícil, por ser Calpaína 3 una proteasa localizada en citosol, pues los anticuerpos ensayados hasta el momento no reaccionan en los cortes titulares y al no poder ser detectada por inmunohistoquímica (Bonnemann CG, *et al*, 2002; López de Munain A, *et al*, 1999), se debe recurrir al Western blot (Wb) o

Inmunoelectrotransferencia (IET), en el que se distinguen tres bandas: 94, 60 y 55 kDa, utilizando anticuerpos específicos.

El patrón del IET es variable, existiendo casos con ausencia total de la proteína generalmente asociados a fenotipo severo y mutaciones *nonsense* en homocigosis. En general las mutaciones *missense* (sin sentido) se asocian a una disminución variable de la proteína, pero una misma mutación puede dar lugar a cuadros clínicos de diferente gravedad. En algunos casos la disminución de proteína es muy débil, 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 LGMD 2I y LGMD 2J (Haravouri, *et al*, 2001).

La correlación directa entre la cantidad residual de Calpaína 3, en el análisis de Inmunoelectrotransferencia y la severidad del fenotipo no han sido demostrados (Anderson LV, *et al*, 1998).

6.1. 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, confirmándose 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 M, *et al*, 2003).

Clínicamente la distrofia muscular causada por deficiencia de Calpaína 3 no es muy severa. La edad de inicio es extremadamente variable: se ha reportado desde 8 a 15 años, con un rango de 2 a 40 años, (Topaloglu H, *et al*, 1997) mientras que

en un análisis muy reciente realizado en 175 pacientes genéticamente confirmados mostró un rango de 2 a 49 años.

Varias poblaciones tienen alta incidencia de Calpainopatías como la Isla Reunión, poblaciones Amish en Indiana (E.U), el país Vasco, en España y países latinoamericanos como Brazil (Fardeau M, *et al*, 1996; López de Munain A, *et al*, 1999; Vainzof M, *et al*, 2001).

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 gastrocnemios.

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 o 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.

En ratones knockout en Calpaína 3, se ha observado un decremento de peso en los músculos EDL (*Extensor Digitorum Longum*) y *soleus*, asociado con un decremento en el diámetro de las fibras. La reducción secundaria de Calpaína 3 ha sido demostrada también en otras formas de LGMD, como LGMD 2I, LGMD 2B.

7. Distrofia muscular de Emery-Dreifuss.

Hay dos formas genéticas de DMED: ligada al cromosoma X y autosómica dominante (AD). La forma ligada al cromosoma X es la más frecuente. El fenotipo Emery-Dreifuss se inicia en la niñez con distribución humeroperoneal: debilidad de la cintura escapular, proximal en los miembros superiores y debilidad distal

en las extremidades inferiores (Bonne, 2003), acompañada de contracturas precoces de codos, tendón de Aquiles y cuello. En la edad adulta se presenta miocardiopatía. En algunos casos hay una afectación final de la cintura pélvica (Manilal, *et al*, 1998).

7. 1. Emerina

La proteína Emerina es una proteína integral de la membrana nuclear, asociada con la lamina A/C, se expresa ubicuamente, codificada por el gen EMD localizada en el cromosoma X, Su función está relacionada con la estabilidad de la membrana nuclear, la regulación de genes (Maidment y Ellis, 2000), la cinética del ciclo celular (Fairley, *et al*, 2000), y/o estabilización del núcleo durante la mitosis (Teijeira S y Navarro C, *et al*, 2004).

7.1.1. Distrofia muscular de Emery-Dreifuss ligada al cromosoma X (X-EDMD)

La EDMD ligada al cromosoma X se produce por una mutación en el gen de la Emerina (EDM) en el locus Xp28 (Wehnert MS, *et al*, 2002, Bione, *et al*, 1994), lo que origina una deficiencia en la proteína Emerina (Fairley EA, *et al*, 1999). La enfermedad se inicia generalmente en la infancia, es de progresión lenta, de distribución humero-peroneal, proximal en los miembros superiores y distal en los miembros inferiores, presenta contracturas del tendón de Aquiles, los codos y músculos cervicales posteriores. Hay una afección final de la cintura pélvica. En la edad adulta se muestra antes de los 30 años, hay defectos en la conducción atrio-ventricular, cardiomiopatía (Maidment y Ellis, 2002). Se han reportados casos de mujeres portadoras que presentan síntomas (Manilal S, *et al*, 1998).

7.2. Lamina A/C

Las proteínas nucleares lamina A y lamina C están codificadas por el mismo gen (LMNA), a través de un splicing alternativo de una sola transcripción, localizado en el cromosoma 1, locus 1q21.2, (Lin F y Worman HJ, 1993). Son expresadas ubicuamente, no se sabe aún por que las mutaciones en el gen LMNA afectan particularmente al músculo esquelético y cardíaco. Pero además también se han

observado afecciones a tejido adiposo, sistema nervioso periférico y óseo (Stuurman, *et al*, 1998).

No se saben específicamente sus funciones, pero se ha sugerido que proveen estabilidad a la membrana nuclear, por la formación de homo y heteropolímeros (Sakaki M, *et al*, 2001; Stuurmann N, *et al*, 1998), actúan en la diferenciación de mioblastos a miocitos, por sus interacciones con la cromatina, por su interacción con factores de transcripción regulan la expresión de genes tejido-específico, durante la diferenciación celular. (Genschel, *et al*, 1998).

Las proteínas: lamina A/C y B constituyen el componente principal de la lamina nuclear, una malla que rodea internamente la membrana nuclear. Sólo las láminas A y C se relacionan con distrofias musculares (Wehnert MS, *et al*, 2002; Bonne G, *et al*, 2000). La variación en la cantidad de estas proteínas es difícil de detectar por Inmunohistoquímica o Inmuno-electrotransferencia (Wehnert MS, *et al*, 2002; Bonne G, 2003).

Existe una infrecuente forma recesiva de AR-DMED producida también por mutaciones del gen LMNA (Barletta M, *et al*, 2000), una de forma autosómica dominante AD-DMED (Bonne G, *et al*, 1999) y en algunos casos autosómica dominante LGMD 1B (Muchir A, *et al*, 2000), esta última forma de distrofia muscular es caracterizado por una afección cardíaca con defectos en la conducción atrioventricular y menos frecuente cardiomiopatía dilatada, las manifestaciones tienen inicio en las dos primeras décadas de vida, con debilidad en cintura pélvica y proximal, escápulas aladas, la progresión generalmente es lenta (van der Kooi AJ, *et al*, 1996; 1997; Maidment y Ellis, 2002).

El fenotipo de los dos tipos de distrofia muscular Emery Dreifuss, causada por mutaciones en el gen LMNA, es igual al causado por mutaciones en el gen EMD, sólo se ha observado un espectro más amplio en la severidad de la enfermedad en pacientes con AD-EDMD, al compararlos con X-EDMD.

Mutaciones en el gen LMNA son también responsables de la AD-EDMD se caracteriza clínicamente por debilidad muscular progresiva con distribución humero-peroneal, contracturas de tendones y arritmia y/o cardiomiopatía.

La LGMD 1B y AD-EDMD tienen características clínicas más severas, clínicamente son muy parecidas con la X-EDMD, causado por la deficiencia de emerina. Esto correlaciona con la demostración de interacción entre lamina A/C y Emerina en la membrana nuclear (Guglieri M, *et al*, 2005; Saki, *et al*, 1995).

8. Distrofias musculares congénitas

Es un grupo muy heterogéneo de enfermedades de herencia autosómica recesiva, que se presenta con hipotonía y debilidad muscular desde el nacimiento o los primeros meses de vida (Emery AEH, 2002).

Actualmente se clasifican en dos grupos: las que se acompañan de retraso mental y las que no se asocian a un retraso mental significativo. También se dividen en formas puras (con y sin déficit de Merosina), y asociadas a afectación cerebral.

La deficiencia de Merosina se puede mostrar a través de Inmunoelctrotransferencia o Inmunohistoquímica de músculo esquelético así como material para diagnóstico prenatal (Muntoni F, *et al*, 1995).

8.1. α 2-Laminina (Merosina)

La Merosina o cadena α 2-Laminina es un componente de la matriz extracelular que se conecta con el α -dístroglicano. Se halla también en la dermis. Los pacientes deficientes en merosina muestran ausencia de lamininas 2 y 4 (Mercuri E, *et al*, 2002). Las lamininas intervienen en la adhesión, la diferenciación, el crecimiento, la forma y la migración celular. 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 AEH, 2002). Esta forma de distrofia muscular ligada al cromosoma 6 es la más frecuente de las Distrofias musculares congénitas (DMC).

La deficiencia parcial de Merosina se origina por defecto del cromosoma 6, tiene una expresión clínica más leve, y casos con deficiencia secundaria de Laminina, entre los que destacan los causados por defectos del gen de la Fukutina. Recientemente, se han descrito casos de deficiencia parcial primaria de Merosina no asociados a un defecto del gen 6 (Jones KJ, *et al*, 2001).

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. La enfermedad no se asocia a retraso mental. El 10 % de los niños presenta crisis epilépticas. Puede asociarse neuropatía periférica y, raramente cardiomiopatía (Gilhuis HJ, *et al*, 2002).

9. Caveolina 3

También llamada M-Caveolina, es una proteína integral del sarcolema, tiene un peso molecular de 21-24 kDa, está codificada por el gen CAV3 que se encuentra localizado en el cromosoma 3, locus 3p25. El RNAm de Caveolina 3 se expresa en músculo esquelético, cardíaco y diafragma (Tang ZL, *et al*, 1996), es el principal componente de las caveolas, que son invaginaciones vesiculares (50-10nm) de la membrana plasmática, que participan en procesos de transducción de señales así como en el tráfico de vesículas y moléculas receptoras (Cohn RD y Campbell KP, 2000; Schleger A, *et al*, 1998; Galbiati F, *et al*, 2000; Scherer PE, *et al*, 1997). La Caveolina 3 también organiza y concentra lípidos y proteínas dentro de los microdominios de la caveola (Matsuda C, *et al*, 2001; Engelman, *et al*, 1998). Las mutaciones en CAV3 originan alteraciones en la formación de caveolas así como de la membrana plasmática, afectándose así rutas de señalización (McNally, *et al*, 1998). Caveolina 3 se encuentra asociada con el DGC por la unión con el dominio β -DG (Crosbie RH, *et al*, 1998). Se ha demostrado que Caveolina 3 se encuentra unido a nNOS, y recientemente fue sugerida una interacción directa con disferlina (Matsuda C, *et al*, 2001).

La familia de las caveolinas, está formada por caveolina 1, 2 y 3, las dos primeras se expresan en muchos tipos de células, como fibroblastos, endotelio, células epiteliales y particularmente niveles elevados en adipocitos, mientras que la expresión de Caveolina 3 es músculo-específico, aunque también se ha encontrado en células de músculo liso (Song k, *et al*, 1996; Scherer, *et al*, 1997). Estudios recientes indican que hay un incremento en el número de caveolas en músculo esquelético, de pacientes con DMD, y en los ratones mdx (modelo animal de DMD, con deficiencia de distrofina) presentan un incremento en la expresión de Caveolina 3 en músculo esquelético (Vaghy, *et al*, 1998; Galbiati F, *et al*, 2000). Aunque se desconoce si el incremento en los niveles de Caveolina 3 en pacientes con DMD contribuye a la patogénesis.

La regulación de la expresión de Caveolina 3, parece esencial en el mantenimiento de la homeostasis normal del músculo (Galbiati F, *et al*, 2000). El análisis de músculo esquelético en un ratón transgénico, con sobreexpresión de Caveolina 3, revela un incremento en el número de caveolas, hipertrofia, necrosis, inmadurez y regeneración de células musculares con núcleos centrales, así como una baja regulación en la expresión de distrofina y β -DG. Este ratón muestra también niveles elevados de Creatincinasa sérica (Galbiati F, *et al*, 2000).

9.1. Caveolinopatías

Las caveolinopatías se originan por mutaciones en el gen CAV3, presentan un modo de herencia autosómica dominante, se asocian a cuatro fenotipos diferentes: Distrofia muscular de cinturas de tipo 1C (LGMD 1C), RMD (*Rippling Muscle Disease*), Miopatía distal (DM) e hipercikemia (HCK), (Betz, *et al*, 2001; Carbone I, *et al*, 2000; Minetti C, *et al*, 1998). Y un estudio reciente describe una mutación en CAV3 asociada a cardiomiopatía hipertrófica (Hayashi T, *et al*, 2004).

10. Teletonina

Teletonina es la primera proteína del sarcómero que ha sido relacionada con una distrofia muscular (Moreira ES, *et al*, 2000). Está codificada por el gen TCAP (Zatz, *et al*, 2003), se encuentra localizada en el disco Z del músculo estriado y

cardíaco, donde interactúa con el dominio COOH terminal de la Titina (Horowitz R, *et al*, 1986). Se ha propuesto que la Teletonina es un sustrato de Titina, que fosforila su dominio COOH terminal, en la diferenciación de miocitos (Mayans O, *et al*, 1999). La Teletonina es requerida para la estructura integral del sarcómero, sin embargo en músculo de pacientes con LGMD 2G y mutaciones en el gen de Teletonina, la arquitectura del sarcómero se mantiene, sugiriendo que la degeneración del músculo y el fenotipo clínico, es debido, más por un defecto funcional que por una alteración de la estructura del sarcómero (Vainzof M, *et al*, 2003). Todas las demás proteínas implicadas en distrofias, se expresan de manera normal en la LGMD 2G.

10.1. LGMD 2G

La LGMD 2G ha sido descrita solamente en cuatro familias brasileñas (Moreira ES, *et al*, 2000). La edad de inicio tiene un rango de 2 a 15 años, con una debilidad proximal en las cuatro extremidades y marcada debilidad muscular y atrofia en los músculos distales de las piernas. Algunos pacientes presentan una hipertrofia de pantorrillas, simétrica o asimétrica, puede haber implicaciones del corazón (Moreira ES, *et al*, 2000). Dos mutaciones diferentes fueron identificadas en las cuatro familias, resultando proteínas truncadas carentes del dominio COOH terminal, que generalmente es fosforilado por titina cinasa (Moreira ES, *et al*, 2000).

11. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad hay más de treinta genes implicados en las distrofias musculares. Se sabe que cuadros clínicos similares pueden presentarse en dos enfermedades distintas, producto de mutaciones en diferentes genes. Pero 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. 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 la Inmunoelectrotransferencia, mediante el empleo de anticuerpos específicos, dirigidos contra las principales proteínas involucradas (Distrofina, α -SG, β -SG, γ -SG, δ -SG, Disferlina y Merosina) en las distrofias musculares, estas técnicas nos permiten detectar la(s) proteína(s) que se encuentran 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 del paciente, además de auxiliar al asesoramiento genético correcto.

En el caso particular de Calpaína 3, estudios sobre esta proteína han reportado una incidencia alta de pacientes afectados por una alteración en Calpaína 3, por ello es de suma importancia realizar el estudio de esta proteína; sin embargo por ser Calpaína 3 una proteasa localizada en el citosol, los anticuerpos ensayados hasta el momento no reaccionan en los cortes tisulares empleados en la Inmunohistoquímica Indirecta, por lo que se debe recurrir a la Inmunoelectrotransferencia, para determinar la disminución o ausencia de la proteína.

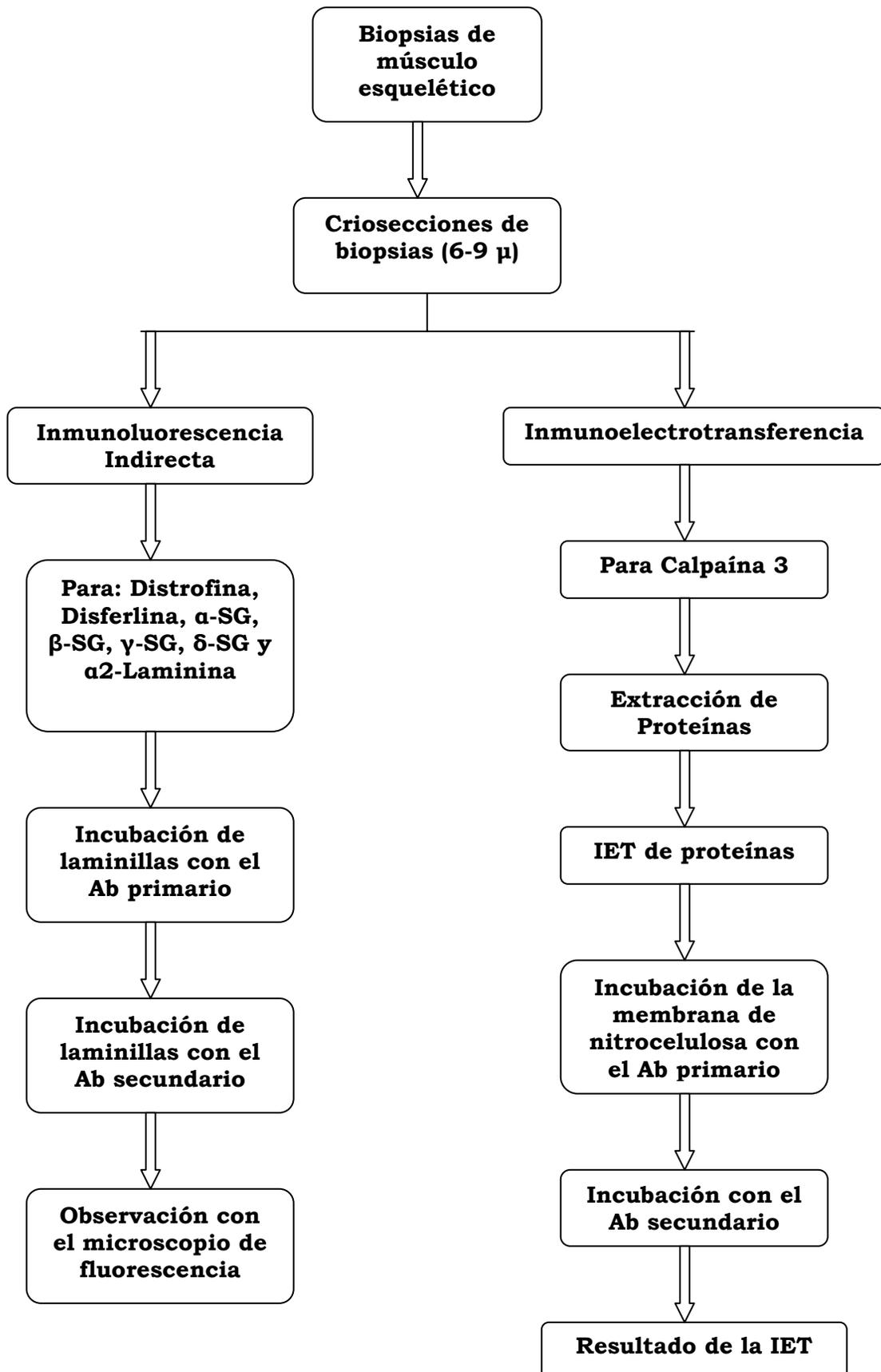
12. OBJETIVO

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

13. OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar mediante Inmunofluorescencia Indirecta y anticuerpos monoclonales la síntesis de las proteínas: Distrofina, α -SG, β -SG, γ -SG, δ -SG, Disferlina y α 2-Laminina (Merosina), en biopsias de músculo esquelético, de pacientes con un cuadro clínico de distrofia muscular.
- Cuantificar los niveles expresión de la proteína muscular Calpaína 3 mediante la técnica de Inmunolectrotransferencia, en pacientes con distrofia muscular, que en sus estudios previos de Inmunofluorescencia Indirecta no se detectaron alteraciones, en las proteínas analizadas.
- Clasificar al grupo de pacientes con distrofia muscular, de acuerdo a la proteína primordialmente afectada.

14. MATERIAL Y MÉTODOS



14.1. Soluciones

PBS 1x

Cloruro de Sodio (NaCl)	8g
Cloruro de Potasio (KCl)	0.2g
Na ₂ HPO ₄	1.44g
KH ₂ PO ₄	0.24g
H ₂ O Aforar a	1L
pH 7.4	
Esterilizar	

BSA 5% (p/v)

2.5g de albúmina sérica bovina (SIGMA)
Aforar a 50mL con PBS 1x

Buffer de extracción de proteínas

125mM Tris-HCl	0.30g
10% glicerol	2 mL
4M urea	4.8g
5% β-mercaptoetanol	1mL
0.0025% azul de bromofenol	
4% SDS	0.8g
pH 6.8	
Aforar a	20 mL

*El β-mercaptoetanol se adiciona hasta el momento de usar: 1.5 μL /30 μL de buffer.

Agregar una tableta de mini complete (inhibidores de proteasas) por cada 10ml de buffer de extracción. Agitar constantemente durante la preparación.

Gel separador 6%

30% acrilamida/0.8% bisacrilamida	2.0 mL
Amortiguador de corrida pH 8.8	2.5 mL
Persulfato de amonio (APS) al 10%	50 μL
TEMED	10 μL
Agua	5.3 mL
Vol final	≈ 10mL

*Si se requiere hacer geles de mayor o menor concentración, solo se varía la cantidad de acrilamida/bisacrilamida así como también el agua para ajustar el volumen.

Gel concentrador 4%

30% acrilamida/0.8% bisacrilamida	650 μL
Amortiguador concentrador pH 6.8	1.25 mL
Persulfato de amonio (APS) al 10%	25 μL
TEMED	5 μL
Agua	3.05mL
Vol final	≈ 5 mL

Azul brillante de coomassie

40% metanol

10 % ácido acético

0.1% azul de coomassie

Buffer de corrida 4x (para el gel separador)

1.5M Tris-HCl pH8.8 91g en 300ml de agua, ajustar pH con HCl

0.4% de SDS 2g

Vol final 500mL, guardar a 4°C

Buffer de concentración 4x (para el gel concentrador)

0.5M Tris-HCl pH6.8 6.05g en 40ml de agua, ajustar pH con HCl

0.4% de SDS 4g

Vol final 100mL, guardar a 4°C

Amortiguador de corrida 5x

25mM Tris 30.2g

192mM glicina 144g

0.1% SDS 10g

pH 8.3

Vol final 2L

Amortiguador de transferencia

25mM Tris 3.09g

192mM glicina 144g

20% metanol 200mL

pH 8.3

Vol final 1L

Solución bloqueadora al 6%

Leche descremada 0.3g

Aforar a 5mL con PBS-Tween 20 al 0.3%

PBS-Tween 20 al 0.3%

Tween 20 300µL

Aforar com PBS 1x a 100 mL

14.2. Pacientes (Población Estudiada)

Se tomo como criterio de inclusión a pacientes que manifestaran un cuadro clínico relacionado con distrofia muscular, dichos pacientes fueron diagnosticados en diversas instituciones del sector salud como: en el servicio del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional S. XXI-IMSS, Hospital de Especialidades del CMN S. XXI-IMSS, Instituto Nacional de Rehabilitación (INR), Hospital Infantil de México (HIM), Centro Médico Nacional La Raza (CMN La Raza), Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNyN) así como el Instituto Nacional de Pediatría (INP).

Tabla 2. Datos de los 20 pacientes analizados por Inmunofluorescencia Indirecta.

M:

Paciente	Sexo	Edad	Dx. Probable	Procedencia
1	M	8 años	Posible distrofia muscular	CNR
2	F	28 años	Posible distrofia muscular	CNR
3	F	3 años, 6 meses	Debilidad Muscular, Pseudohipertrofia de gemelos	INP
4	M	18 años	Posible distrofia muscular	Clínica 26 Nac. Oaxaca
5	M	14 años	Posible distrofia muscular	CMN S. XXI
6	M	14 años	DMD, DMB	Hospital general de México
7	M	50 años	Posible distrofia muscular	Especialidades
8	M	8 años	DMD	CNR
9	F	2 meses	Posible Distrofia Muscular Congénita	CMN S. XXI Hospital de Pediatría
10	M	D/N	Posible distrofia muscular	INNN Neurología
11	M	4 años	Miopatía Congenita	CMN S. XXI Neurología Pediátrica
12	M	16 años	Posible distrofia muscular	CMN S. XXI
13	M	28 años	Distrofia Muscular vs Polimiositis	CMN Raza
14	M	9 años	Posible DMD	CNM Raza
15	F	D/N	Posible distrofia muscular	INN y N
16	M	17 años	Posible distrofia muscular	INN y N
17	F	D/N	Posible distrofia muscular	INN y N
18	M	7 años	Miopatía	Michoacan
19	M	2 años	Distrofia Congénita	D/N
20	M	14 años	Posible distrofia muscular	CMN La Raza

Masculino; F: Femenino; Dx: Diagnóstico; D/N: Datos no proporcionados.

14.3. Biopsias musculares

Con el previo consentimiento informado, se tomo de los pacientes una biopsia de músculo de cuádriceps o deltoides, de aproximadamente 0.5 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 congela la biopsia en Nitrógeno líquido a $-160\text{ }^{\circ}\text{C}$, y se guardan a -85°C para realizar posteriormente las criosecciones.

Se realizaron cortes transversales entre $7\text{ y }8\text{ }\mu\text{m}$ 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).

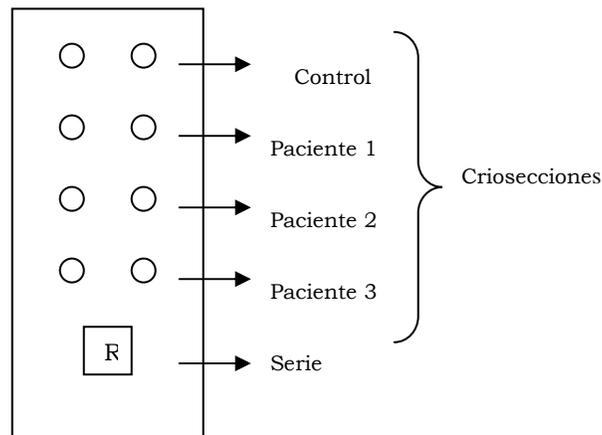


Figura 5. Representación de una laminilla con criosecciones.

Para verificar que las criosecciones fueran transversales, antes de realizar la Inmunohistoquímica se tiñó una laminilla con Hematoxilina-Eosina (HE), que además nos permitió observar alteraciones en las fibras como la variación de tamaño, pérdida de fibras, infiltración de tejido adiposo y conectivo.

14.4. Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta o Inmunohistoquímica

Para la técnica de Inmunofluorescencia se utilizaron 20 biopsias de pacientes que inicialmente fueron diagnosticados con un cuadro clínico de distrofia muscular.

Las laminillas se colocan en un contenedor con un poco de agua en el fondo, para mantener la humedad, y se incuban con solución bloqueadora BSA al 5% p/v (albúmina sérica bovina SIGMA, preparada en Buffer salino de fosfato o PBS 1x), durante 60 minutos a temperatura ambiente, con el objetivo de eliminar la señal de fondo o inespecífica. Pasado este tiempo las muestras se incuban con el anticuerpo primario (Distrofina parte COOH y NH₃, α-, β-, γ- y δ-sarcoglicanos, Disferlina parte COOH y NH₃ y α2-laminina) (Tabla 2) correspondiente a 4°C toda la noche (12 a 18 hrs). 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 10μl 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. Las laminillas fueron observadas en el microscopio de fluorescencia (Carl-Zeiss, Axioplan II-Apotome) con un aumento de 40x, para finalmente ser fotografiadas.

14.4.1. Anticuerpos empleados para Inmunohistoquímica

Tabla 3. Preparación de diluciones de anticuerpos específicos.

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo Secundario	Dilución
Dys 2 (distrofina COOH terminal) (Novocastra)	1:200 en PBS 1x	CY-3 (cianina 3) cabra anti-ratón,	1:250 en PBS 1x
Dys 3 (distrofina NH ₃ terminal) (Novocastra)	1:200 en PBS 1x	CY-3 (cianina 3) cabra anti-ratón,	1:250 en PBS 1x
α-SG (Novocastra)	1:200 en PBS 1x	CY-3 (cianina 3) cabra anti-ratón,	1:250 en PBS 1x
β-SG (Novocastra)	1:200 en PBS 1x	CY-3 (cianina 3) cabra anti-ratón,	1:250 en PBS 1x
γ-SG (Novocastra)	1:200 en PBS 1x	CY-3 (cianina 3) cabra anti-ratón,	1:250 en PBS 1x
δ-SG (Novocastra)	1:200 en PBS 1x	CY-3 (cianina 3) cabra anti-ratón,	1:250 en PBS 1x
Dis H1 (disferlina COOH terminal) (Novocastra)	1:150 en BSA 5%	CY-3 (cianina 3) cabra anti-ratón,	1:250 en PBS 1x
Dis H2 (disferlina NH ₃ terminal) (Novocastra)	1:150 en BSA 5%	CY-3 (cianina 3) cabra anti-ratón,	1:250 en PBS 1x
α2-Laminina (Chemicon)	1:5000 en PBS 1x	CY-3 (cianina 3) cabra anti-ratón,	1:250 en PBS 1x

14.5. Técnica de Inmunoelectrotransferencia (IET)

Para la técnica de Inmunoelectrotransferencia se emplearon 12 biopsias de pacientes que en sus estudios previos de Inmunofluorescencia Indirecta no se observó deficiencia de ninguna de las proteínas analizadas (Distrofina, α-, β-, γ-, δ-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. Datos de los 12 pacientes analizados para la determinación de Calpaína 3 por medio de IET.

No.	Sexo	Edad	Dx. Probable	Procedencia
21	M	4 años	Miopatía	La Raza
22	M	D/N	Posible distrofia muscular	Neurología
23	F	9 años	LGMD	La Raza
24	M	13 años	Debilidad muscular y atrofia distal	CMN
25	F	27 años	Posible distrofia muscular	INN y N
26	M	D/N	Posible distrofia muscular	INN y N
27	M	4 años	Posible distrofia muscular	CMN
28	F	6 años	Posible distrofia muscular	CMN
29	M	3 años 6 meses	LGMD	CMN
30	F	31 años	Posible distrofia muscular	INN
31	M	52 años	Posible distrofia muscular	La Raza
32	F	22 años	LGMD ED	INN y N

M: Masculino; F: Femenino; Dx: Diagnóstico; D/N: Datos no proporcionados.

14.5.1. Extracción de proteínas (Método de Sonicación)

A partir de las biopsias de músculo esquelético previamente tratadas, se realizan 10 cortes de 7 a 9µm, se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5mL, se adicionan 30µL de buffer de extracción de proteínas (sin colorante azul de bromofenol), sonicar las muestras e incubar 3 minutos a 99 °C, centrifugar a 14000 rpm durante 5 minutos y recuperar el sobrenadante.

14.5.2. 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: 2µL de la extracción de proteína más 98µL de agua estéril.

Para el blanco: 2µL de buffer de extracción de proteínas más 98µL de agua estéril.

Leer la absorbancia a 280nm. Después de obtenidos los resultados de absorbancia, cuantificar la cantidad de proteína en cada muestra:

Ejemplo:

500µg _____ 1 D.O

X _____ 0.163

X = 81.5µg / 2µL = 40.75µg de proteína/ µL de muestra

Y hacer los cálculos para cargar en cada pozo del gel, aproximadamente 180 µg 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.

Ejemplo:

183.75µg de proteína = 4.5µL de muestra + 4.5µL de buffer de extracción de proteínas con colorante azul de bromofenol.

En cada pozo se cargo un volumen final de 9 µL de cada muestra con colorante.

14.5.3. Caracterización de las proteínas por Inmunoelectrotransferencia

Se prepara un gel separador al 6% y el gel concentrador al 4%, se deja polimerizar toda la noche. Después se calienta la proteína a 90 °C durante 3 minutos y se carga en cada pozo del gel un volumen de 9µl 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 3.0µL. Se deja correr el gel a 152 volts durante 45 a 60min, a temperatura ambiente.

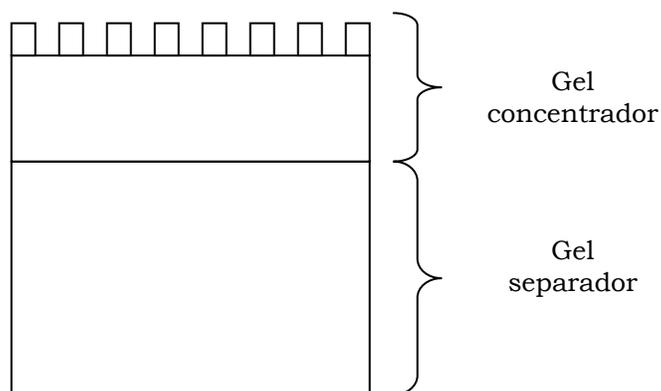


Figura 6. Representación de un gel de poliacrilamida, gel concentrador y gel separador.

14.5.4. 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.

14.5.5. 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, a 4°C, posteriormente se tiñe la membrana con Rojo Ponceau para confirmar la transferencia de proteínas.

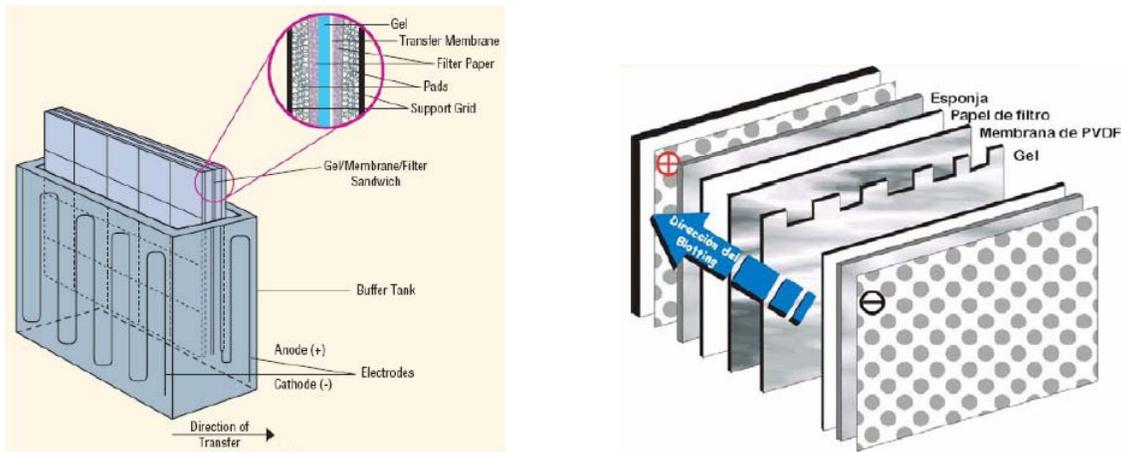


Figura 7. Transferencia de proteínas. La migración de las proteínas es de la carga negativa a la positiva.

Cuando se aplica un campo eléctrico, las proteínas migran fuera del gel de poliacrilamida hacia la superficie de la membrana donde quedan fuertemente adheridas, por lo que la membrana resultante es una copia exacta del patrón de proteínas que se tenía en el gel de poliacrilamida.

14.5.6. Identificación de Proteínas

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.

Ambos fragmentos de membrana de nitrocelulosa se incuban con una solución bloqueadora al 5% (leche descremada en PBS-Tween 20 al 0.3%), durante 1 hr a 37 °C, con agitación constante. Pasado este tiempo se adiciona el anticuerpo primario correspondiente a Calpaína 3 y MHC, y se incuba de 12 a 18 hrs a 4 °C con agitación constante, hacer 6 lavados de 5 minutos cada uno, con PBS-Tween 20 al 0.3% con agitación constante y a temperatura ambiente. Incubar con la dilución del anticuerpo secundario correspondiente, durante 1hr, y se hacen otros 6 lavados de 5 minutos cada uno, se adiciona el reactivo quimioluminiscente Luminol-Peroxido (SuperSignal[®], PIERCE) en relación 1:1 en volumen. En el cuarto oscuro se exponen las membranas en las placas de

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. Anticuerpos empleados en la Inmunoelectrotransferencia.

Anticuerpo Primario	Dilución	Anticuerpo Secundario	Dilución
Calpaína 3 (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%
Miosina (MHC) (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%

14.5.7. Cuantificación de proteínas con el analizador de imágenes (Densitometría).

Empleando el analizador de imágenes (Alphalmage Light Cabinet, Alpha Ease^R FC Software, Versión 4.1) 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 normalizante, 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.

15. RESULTADOS

15.1. RESULTADOS DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Tabla 6. Resultados del análisis por Inmunofluorescencia Indirecta

Biopsia	Dys 2	Dys 3	α -SG	β -SG	γ -SG	δ -SG	Dis H1	Dis H2	α 2-Laminina
1	---	+	+	++	+	++	++	+	+++
2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3	---	---	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+++
5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
6	---	---	+	++	+	+++	+++	+++	+++
7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
8	---	---	+	++	+	+++	+++	+++	+++
9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---	+	+++
10	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
11	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
12	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	---	+++
13	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
14	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
15	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+++
16	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
17	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
18	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
19	---	+++	++	+	+	+++	++	+	+++
20	---	---	++	+	+	+	+++	+++	+++

+++ = normal ++ = deficiente + = muy deficiente --- = negativo

Dys 2 (distrofina parte COOH terminal), Dys 3 (distrofina parte NH₂ 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 NH₃ terminal) y α 2-laminina (alfa, dos laminina).

De las 20 biopsias analizadas por inmunofluorescencia: 8 pacientes, mostraron una expresión normal de las proteínas analizadas (Dys 2, Dys 3, α -, β -, δ -, γ - SG, Dis H1, Dis H2 y α 2-Laminina), de los cuales 2 son pacientes femeninas (2, 17) y 6 pacientes masculinos (5, 7, 11, 13, 16, 18).

Uno de estos casos se describe a continuación: un paciente masculino de 14 años de edad (paciente 5), sus padres no presentan consanguinidad, desarrollo psicomotor normal, el paciente muestra un cuadro clínico de distrofia muscular, a los 10 años 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. Presenta además dificultad para deglutir (disfagia) desde los 13 años, dolor muscular, problema visual y auditivo, calambres en pantorrillas, CPK anormal, EMG miopático. En el estudio de inmunohistoquímica realizado no presentó ninguna deficiencia de las proteínas analizadas.

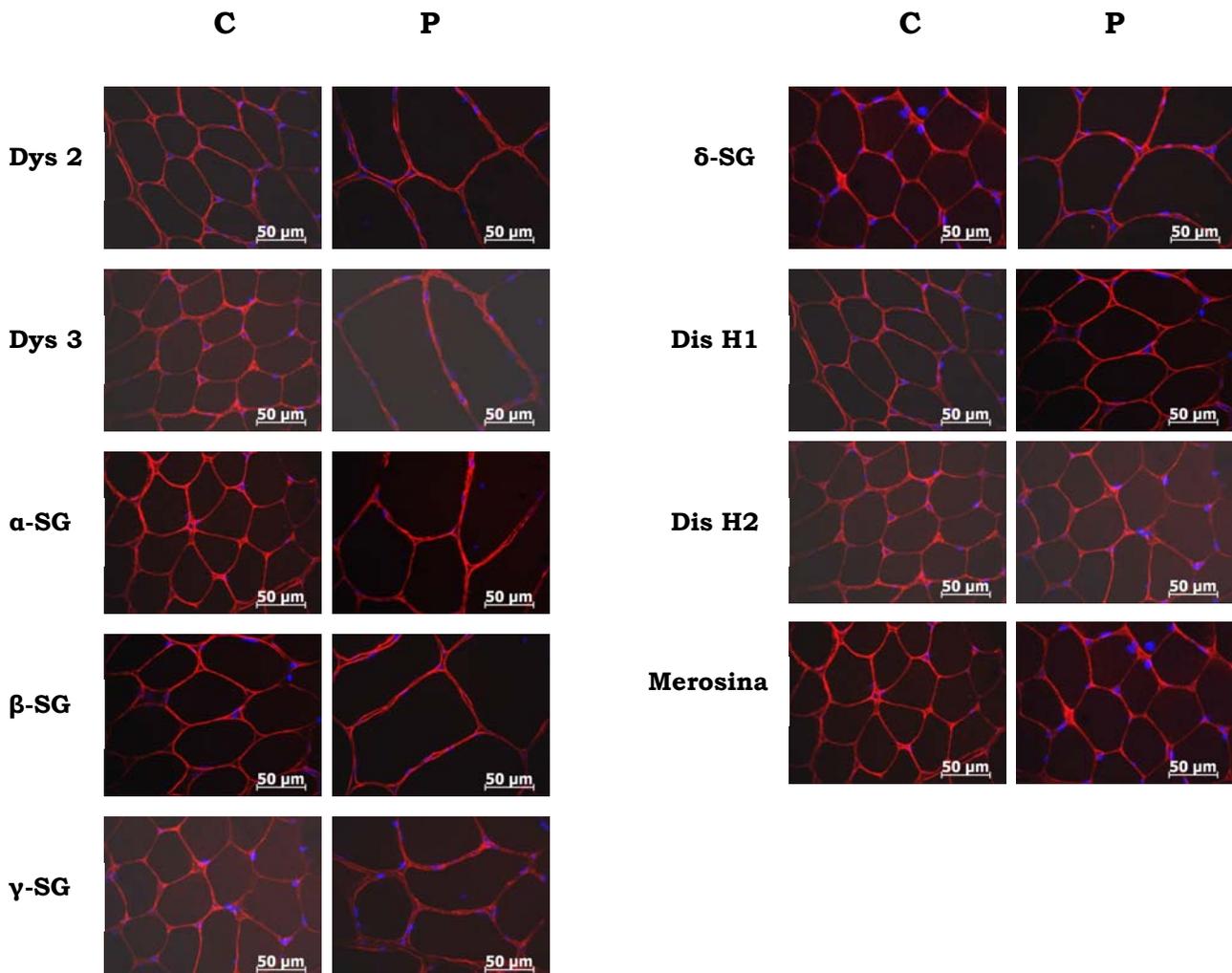


Figura 8. Imagen del estudio de Inmunofluorescencia Indirecta del paciente 5. Se observa una expresión normal (+++) de las proteínas analizadas.

Dys 2 (distrofina parte COOH terminal), Dys 3 (distrofina parte NH₃ 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 NH₃ terminal), merosina (también conocida como α 2-laminina), C (control), P (paciente).

En el caso del un paciente 13, de sexo masculino de 28 años de edad, presenta disminución de fuerza en hombros y músculos, de forma bilateral, dificultad para subir escaleras, levantarse de la silla, de cubito dorsal, perdida de masa muscular en miembros superiores.

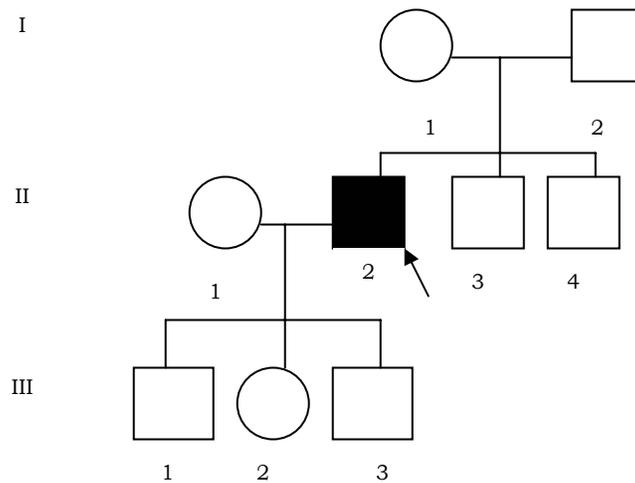
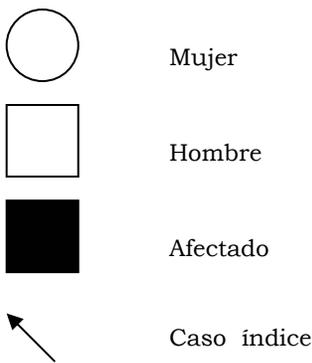


Figura 9. Arbol genealógico del paciente 13, de sexo masculino (II-2) (indicado con la flecha), edad de 28 años, su familia no presenta consanguinidad. Madre de 45 años y padre de 48 años. Sus hijos de 8, 7 años y 2 meses respectivamente.



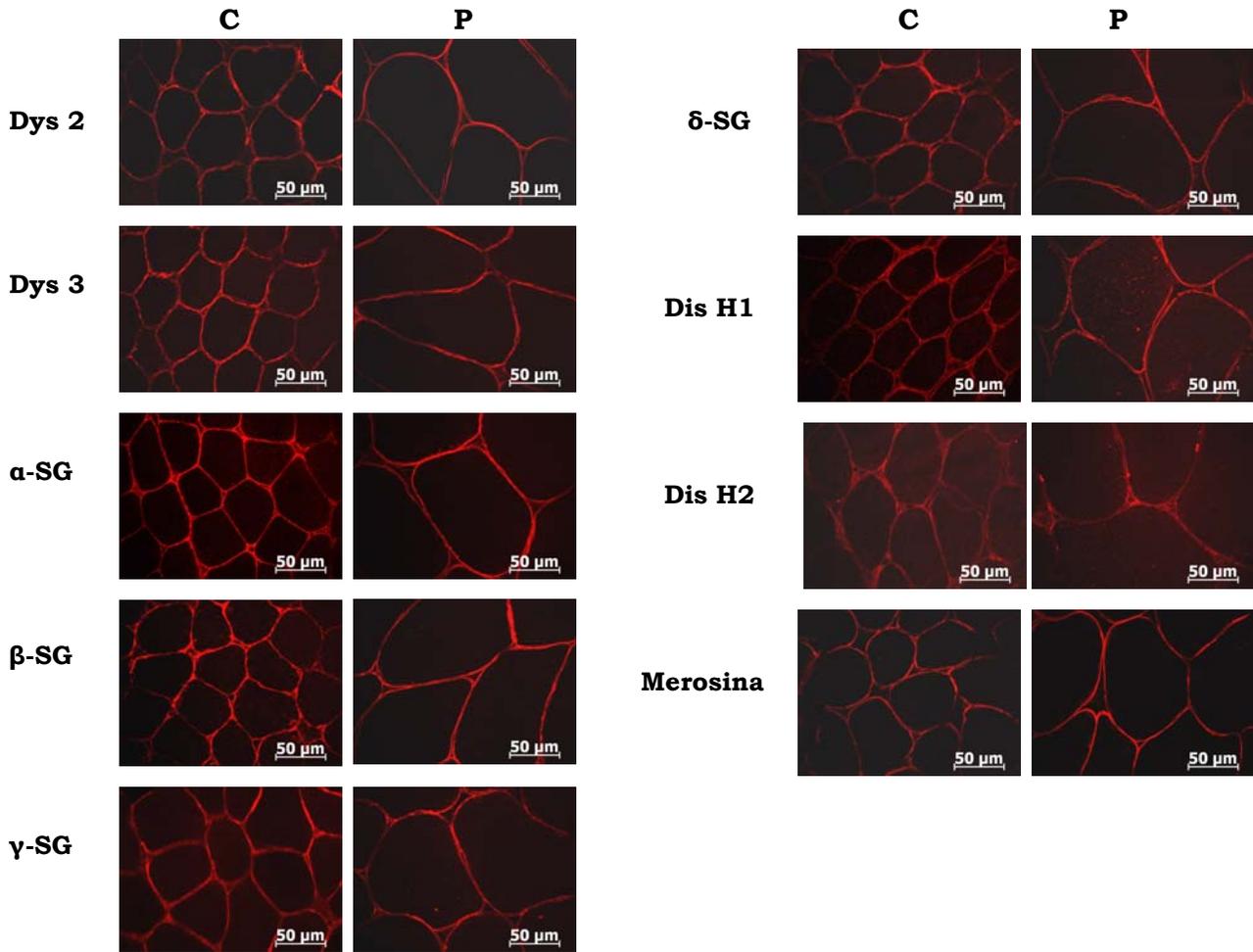


Figura 10. Imagen de inmunofluorescencia indirecta del paciente 13, en donde se muestra un nivel normal de Inmunofluorescencia para las proteínas analizadas.

Dys 2 (distrofina parte COOH terminal), Dys 3 (distrofina parte NH₃ 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 NH₃ terminal), merosina (también conocida como α2-laminina), C (control), P (paciente).

En el análisis de inmunohistoquímica se detectó 4 pacientes con deficiencia de distrofina en la parte NH₃ y COOH. 3 de ellos masculinos de 8 a 14 años (8, 20, 6) y una niña de 3 años (3). 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, esto estaría implicando una deficiencia secundaria de dichos sarcoglicanos.

El siguiente árbol genealógico es del paciente 8, masculino de 8 años de edad con un cuadro clínico de distrofia muscular, edad de inicio al año y 8 meses, presento dificultad al empezar a caminar. No puede subir escaleras, no puede levantarse de cuclillas (Gowers), caídas frecuentes, calambres, dificultad para hablar (disartria).

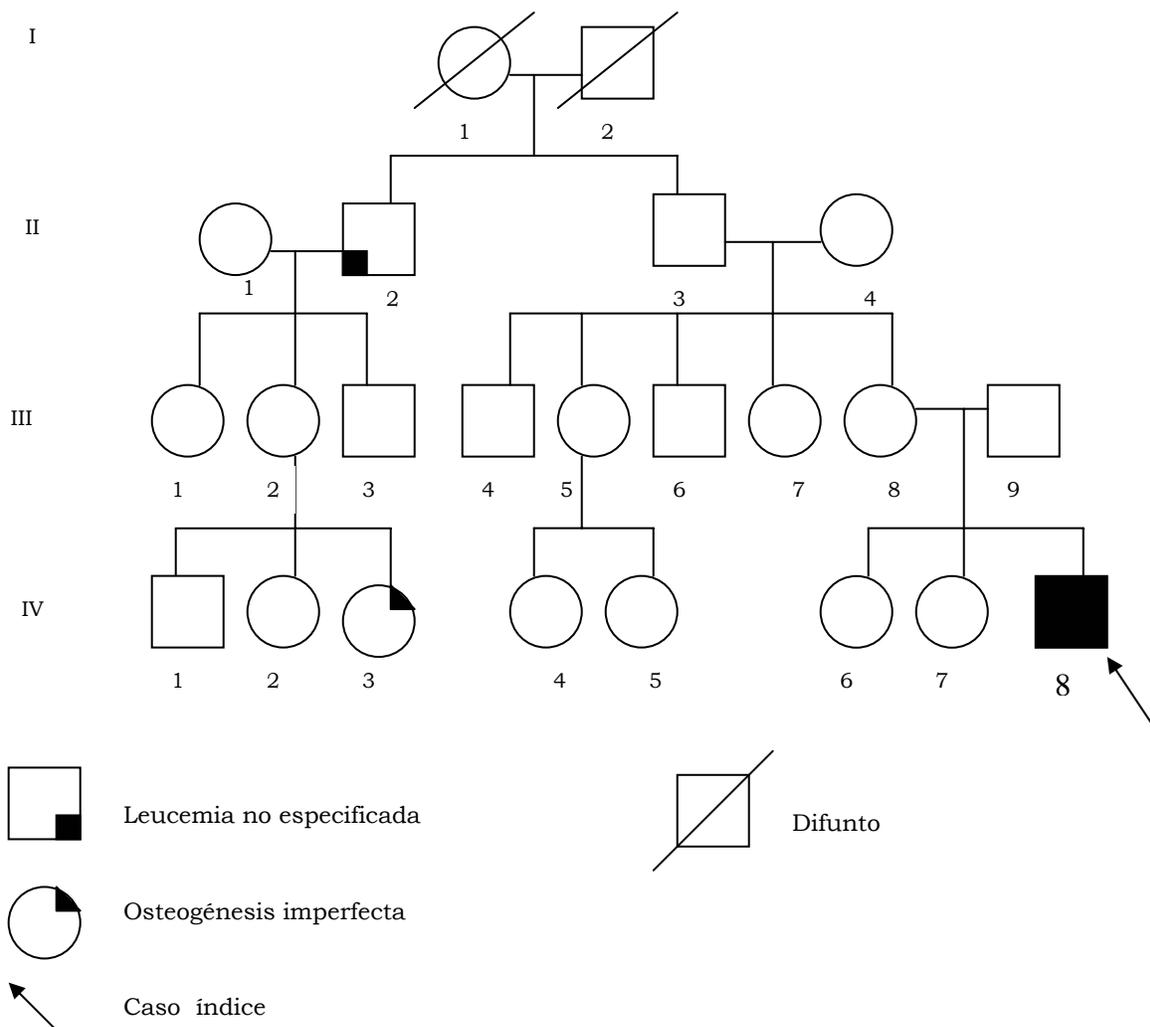


Figura 11. Arbol genealógico del paciente 8, de 8 años y 8 meses (IV-8), en su familia es el único caso de distrofia muscular que se ha reportado, posiblemente la madre sea portadora y sus hermanas tienen por lo tanto una probabilidad del 50 % de ser portadoras también.

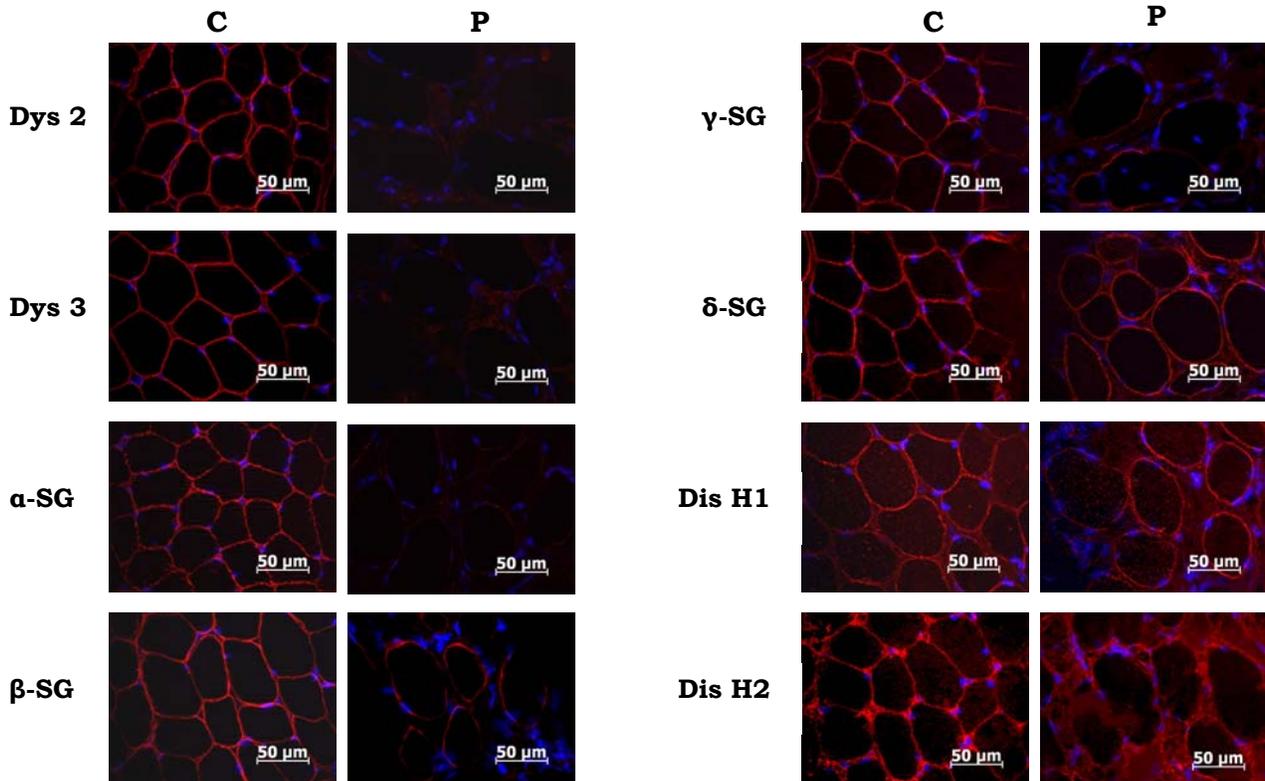


Figura 12. Imagen del análisis de Inmunofluorescencias del paciente 8, en donde se muestra negativo para Dys 2 y Dys 3 terminal de distrofina, además se observa una deficiencia secundaria de α -SG (+), β -SG (++) y γ -SG (+).

Dys 2 (distrofina parte COOH terminal), Dys 3 (distrofina parte NH₃ 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 NH₃ terminal), merosina (también conocida como α 2-laminina), C (control), P (paciente).

La paciente 3, una niña de 3 años, 6 meses, en su estudio de inmunohistoquímica mostró una inmunotinción negativa para distrofina en la parte NH₃ y COOH terminal, además expresó deficiencia secundaria de α -SG, la paciente muestra un cuadro clínico de distrofia muscular, debilidad muscular desde que comenzó a caminar, marcha tambaleante, dificultad para subir escaleras, caídas frecuentes, no puede correr ni saltar, signo de Gowers positivo, contracturas del Tendón de Aquiles, pseudohipertrofia de gemelos, CPK elevado de 13, 690 hasta 19, 140 UI/L, EMG miopático. Sus padres no presentan consanguinidad, es la segunda gesta, tiene antecedentes de aborto del primer trimestre.

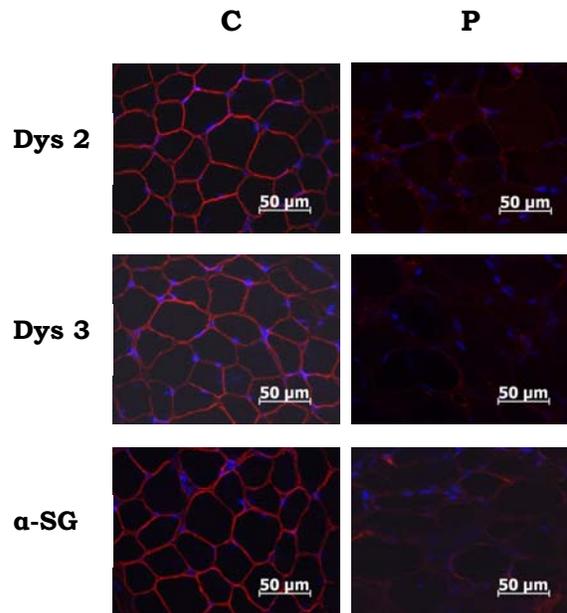


Figura 13. Estudio inmunohistoquímico de la paciente 3, se detectó inmunotinción negativa para Dys 2 y Dys 3, además de una deficiencia secundaria de α -SG (+), las demás proteínas analizadas (β -SG, γ -SG, δ -SG, DisH1, Dis H2 y merosina) mostraron una expresión normal.

Dys 2 (distrofina parte COOH terminal), Dys 3 (distrofina parte NH₃ 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 NH₃ terminal), merosina (también conocida como α 2-laminina), C (control), P (paciente).

En dos casos se encontró una expresión negativa sólo para la parte COOH terminal de Distrofina, en los pacientes 1 y 19, en el primer caso también hay deficiencia de la parte NH₃ terminal, mientras que en el segundo hay una expresión normal de la parte NH₃ de Distrofina. Ambos pacientes son de sexo masculino, de 8 y 2 años respectivamente.

En el estudio inmunohistoquímico del paciente 1, un niño de 8 años de edad, no solo hubo deficiencia secundaria de los sarcoglicanos si no también de Disferlina en su parte COOH y NH₃ terminal.

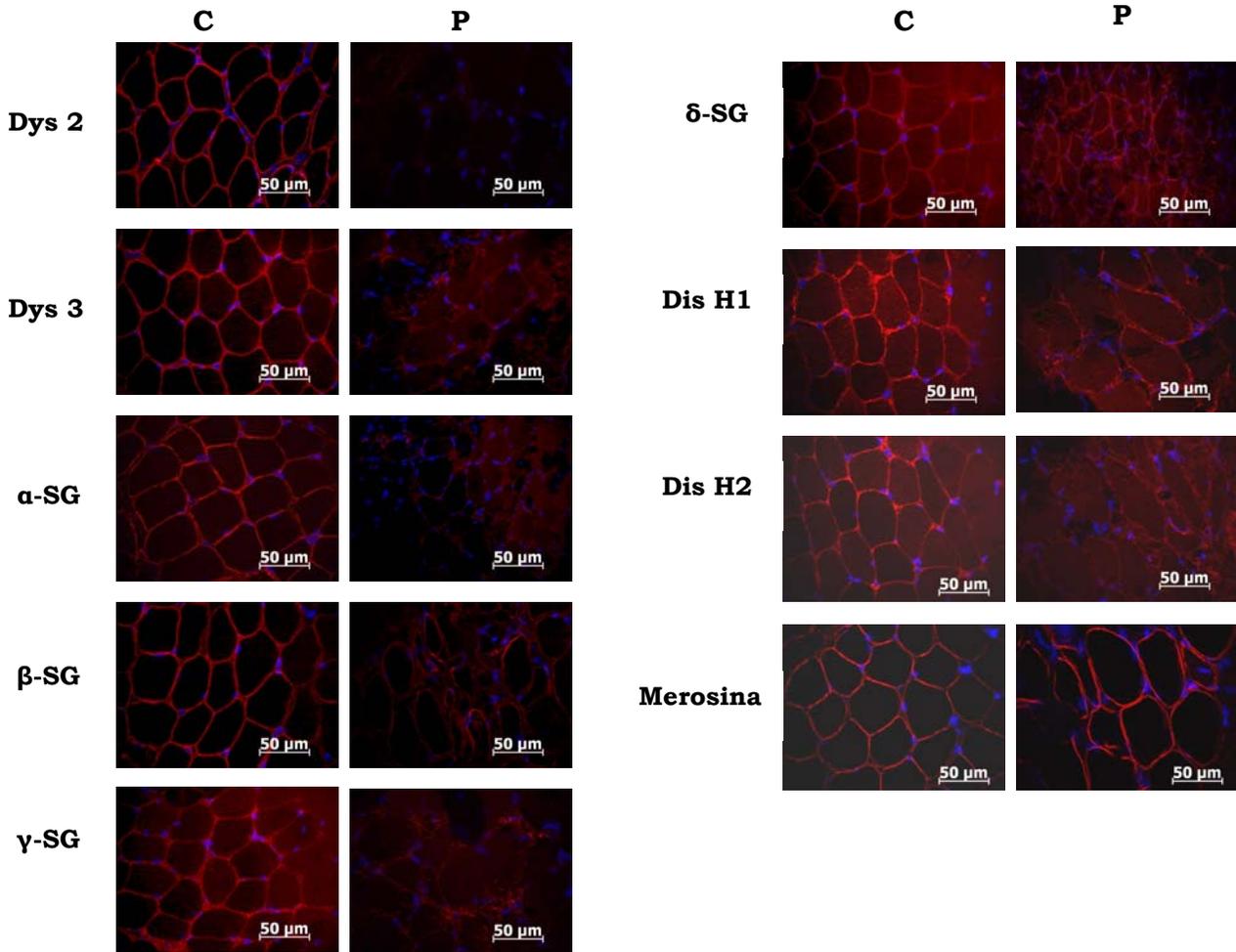


Figura 14. Estudio de Inmunofluorescencia del paciente 1, que se muestra negativo para Dys 2 (---), disminuido para Dys 3 (+), asimismo hay disminución de α-SG (+), β-SG (++), γ-SG (+), δ-SG (++), Dis H1 (++) y Dis H2 (+). No así para Merosina o α2-laminina cuya inmunotinción es normal.

Dys 2 (distrofina parte COOH terminal), Dys 3 (distrofina parte NH₃ 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 NH₃ terminal), merosina (también conocida como α2-laminina), C (control), P (paciente).

Se encontraron dos pacientes (10 y 14) con una disminución en la parte COOH y NH₂ terminal de distrofina, en donde también se observó una deficiencia secundaria de sarcoglicanos.

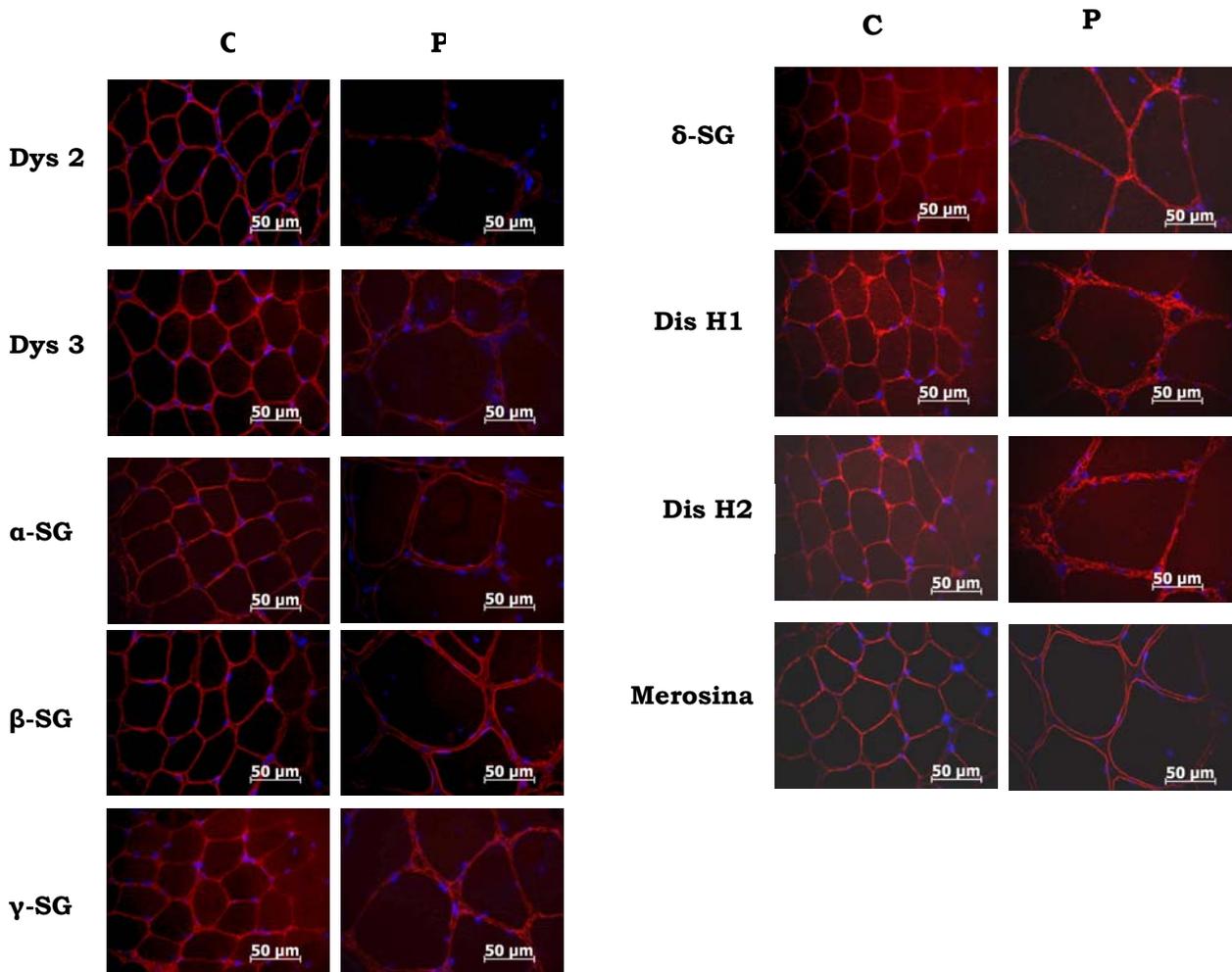


Figura 15. Resultados de inmunofluorescencia del paciente 10, se observa una deficiencia primaria de Dys 2 (+) y Dys 3 (++), deficiencia secundaria de α-SG (++). En β-SG, γ-SG, δ-SG, Dis H1, Dis H2 y merosina no muestran alteración.

Dys 2 (distrofina parte COOH terminal), Dys 3 (distrofina parte NH₂ 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 NH₂ terminal), merosina (también conocida como α2-laminina), C (control), P (paciente).

Hubo casos de pacientes con deficiencia en Disferlina en la parte COOH y NH₃ terminal, como el caso del paciente 4, un paciente de 18 años, que presenta un cuadro clínico de distrofia muscular.

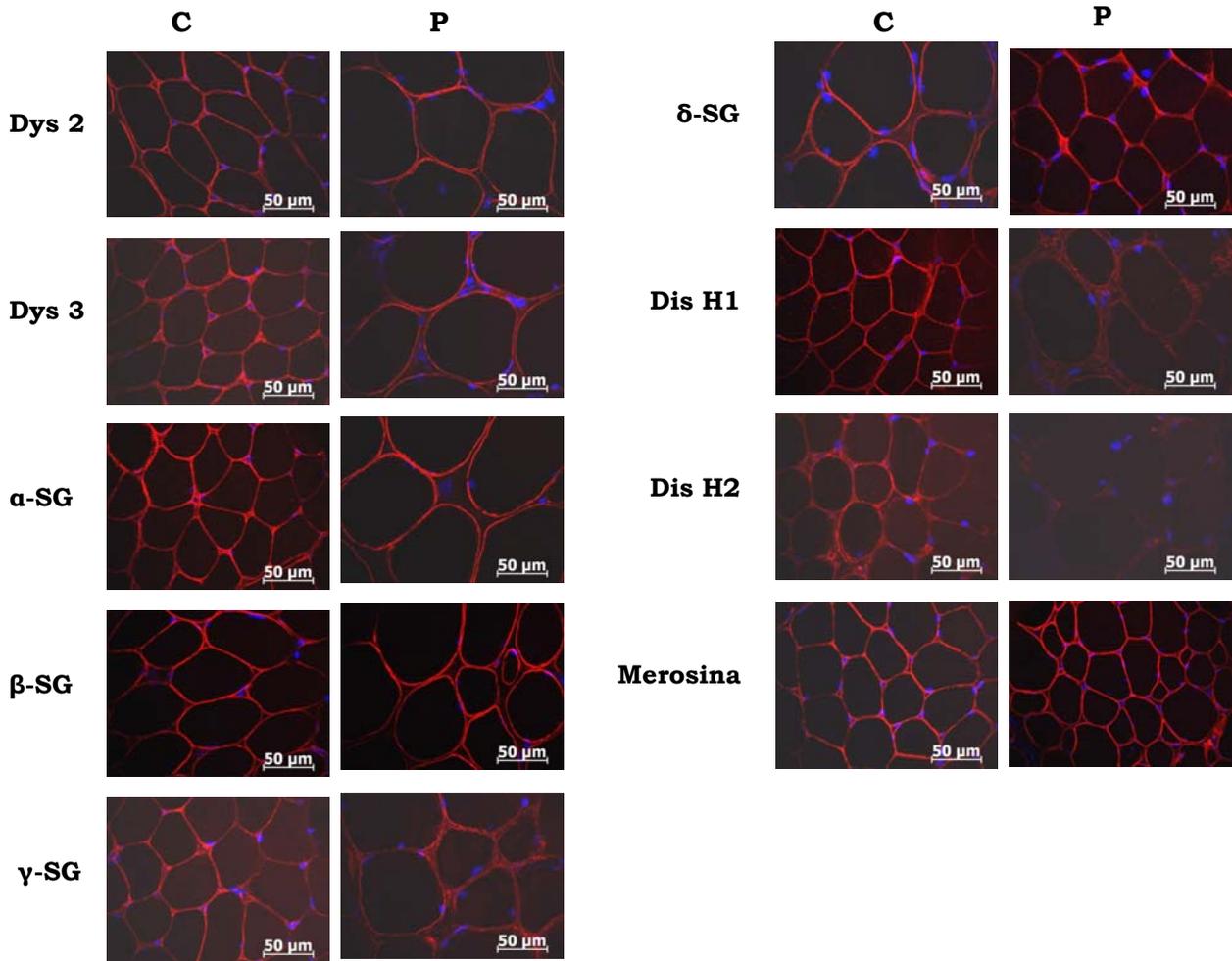


Figura 16. Estudio de inmunofluorescencia del paciente 4, tiene 18 años de edad, se observa Dis H1 (++) y Dis H2 (+). En las proteínas distrofina, α -SG, β -SG, γ -SG, δ -SG y merosina no se observa alteración.

Dys 2 (distrofina parte COOH terminal), Dys 3 (distrofina parte NH₃ 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 NH₃ terminal), merosina (también conocida como α 2-laminina), C (control), P (paciente).

El siguiente panel que se muestra se trata del paciente 15, una mujer con cuadro clínico de distrofia muscular, en el estudio de inmunohistoquímica se determinó negativo para Disferlina tanto en su parte COOH como NH₃ terminal.

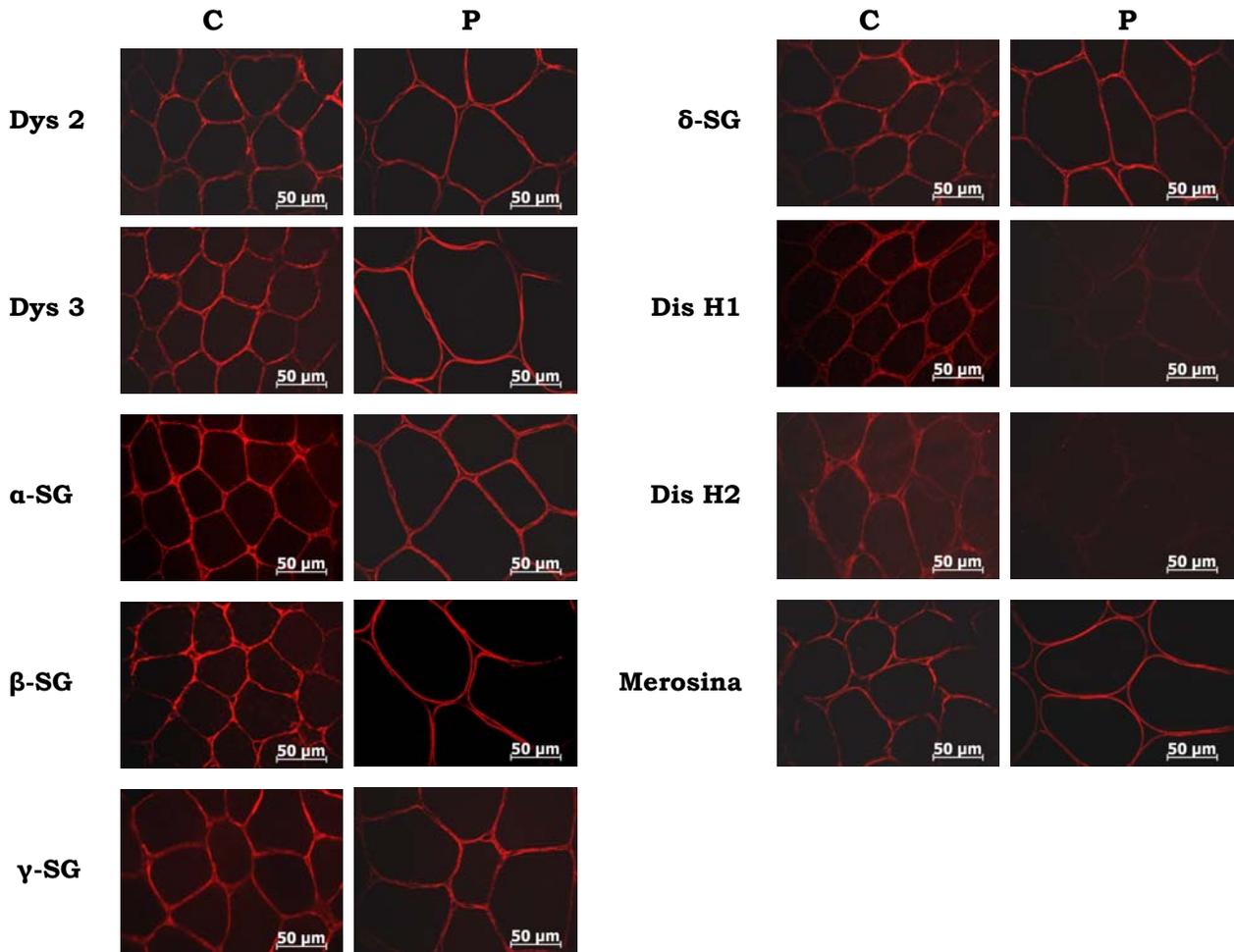
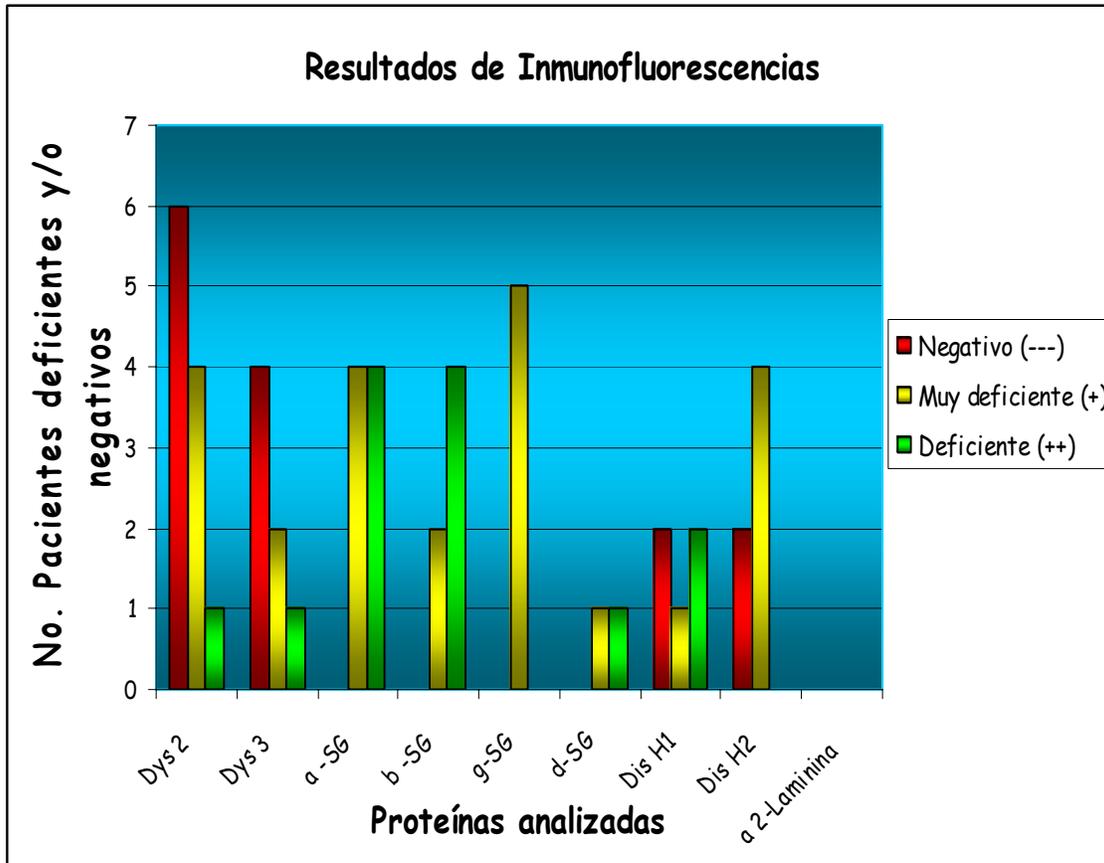


Figura 17. Resultado de inmunofluorescencia del paciente 15, se muestra Dis H1 y Dis H2 negativos. Y normal para Dys 2, Dys 3, α-SG, β-SG, γ-SG y δ-SG, al igual que merosina.

Dys 2 (distrofina parte COOH terminal), Dys 3 (distrofina parte NH₃ 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 NH₃ terminal), merosina (también conocida como α2-laminina), C (control), P (paciente).



Grafica 1. Resultados de Inmunofluorescencia Indirecta, las barras muestran el número de pacientes deficientes y/o negativos, para cada una de las proteínas analizadas.

15.2. RESULTADOS DE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

15.2.1. Estandarización de Inmunolectrotransferencia para Calpaína 3 y la Cadena Pesada de Miosina (MHC)

Con base a la hoja técnica del anticuerpo para Calpaína-3, se realizaron ensayos empleando las diluciones 1:10 y 1:100 para hacer la comparación entre estas diluciones y utilizar la dilución que mostrara mejores resultados. Ambas diluciones mostraron ser factibles por lo que cualquiera de estas dos podría ser empleada, sin embargo se opto por utilizar la dilución 1:100, con el fin de utilizar menor cantidad de anticuerpo. Se observaron tres bandas: uan de 94 kDa, 60 kDa y 55kDa, aunque esta última banda se observo 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 banad visible de 200 kDa que corresponden a la cadena pesada de Miosina (MHC).

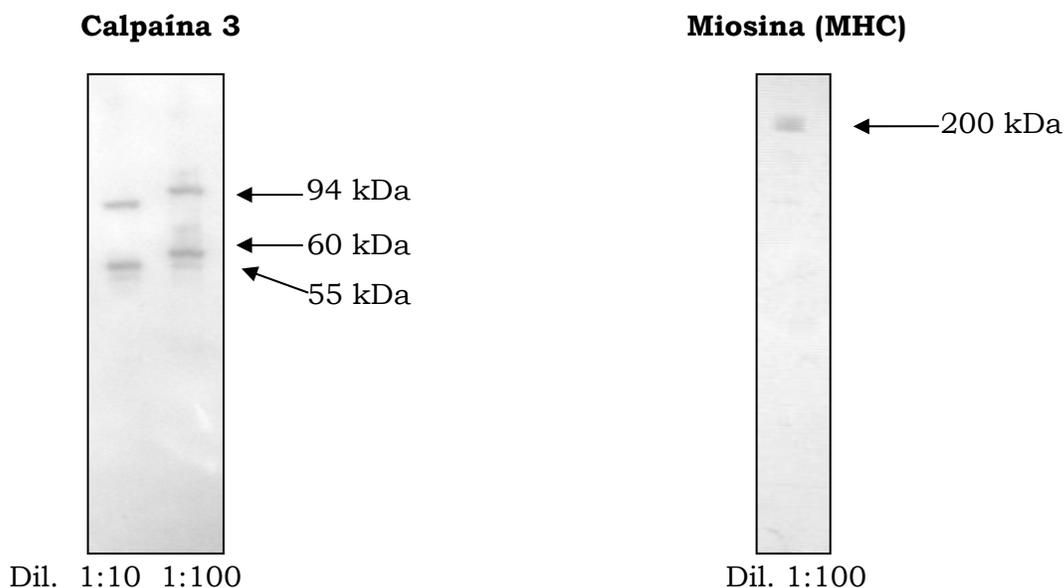


Figura 18. Resultado de Inmunolectrotransferencia de la estandarización para Calpaína 3 y MHC para la estandarización.

15.2.2. Tinción con Azul de Coomassie

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.

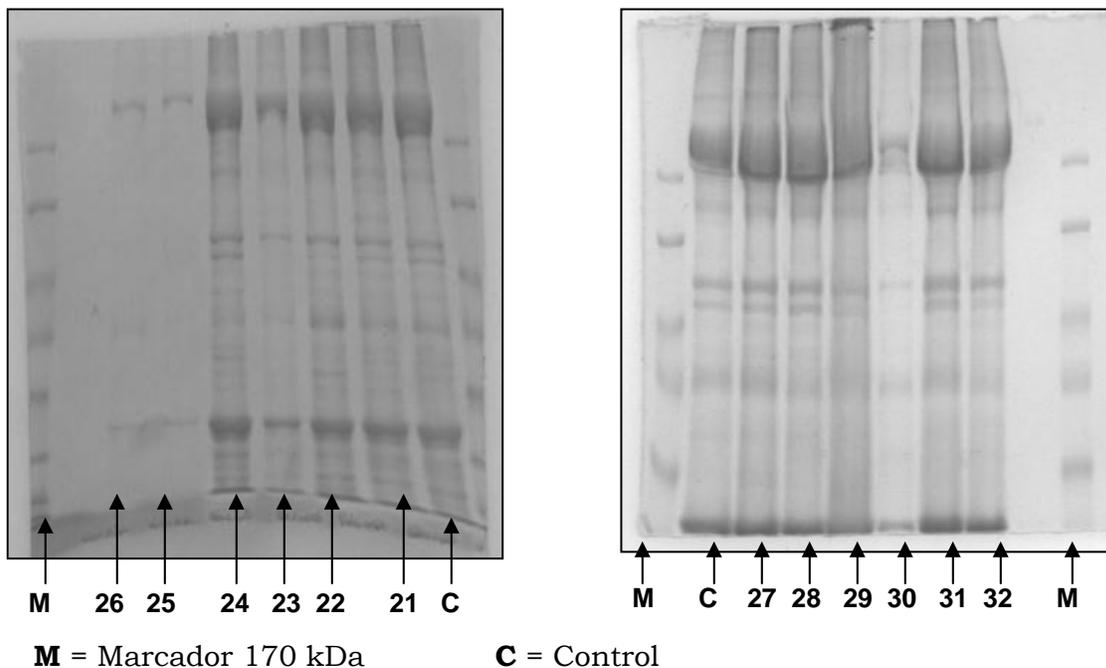
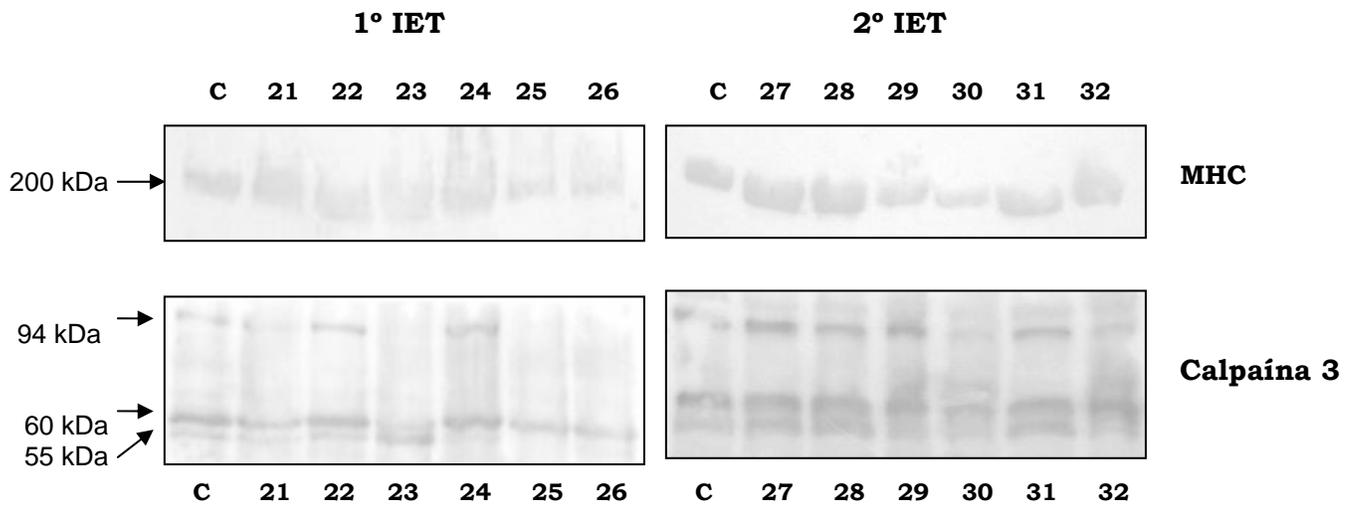


Figura 19. Tinción con Azul de Coomassie de las proteínas.

15.2.3. Resultados de la Inmunoelctrotransferencia de los pacientes analizados.

Se cuantifico la cadena pesada de Miosina (MHC), empleandola 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 3 bandas con un peso molecular de: 94 kDa, 60kDa y 55 kDa. Mientras que para MHC, la banda resultante fue de 200 kDa.

Figura 20. Resultados de la Inmunolectrotransferencia (IET).**M** = Marcador 170 kDa**C** = Control

15.2.4. Cuantificación en el analizador de imágenes

La cuantificación de las proteínas se efectuó en el analizador de imágenes, a través del cual se midió el área bajo la curva de las manchas correspondientes a Calpaína 3 y Miosina. A partir de estos datos se obtuvo la relación de Calpaína 3 y MHC para cada paciente, 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 7. Resultados de IDV (Integrated Density Value) de Calpaína 3

Resultados de Calpaína-3 (1° IET)	
Banda de 94 kDa	IDV
Control	11550
21	9100
22	10500
23	Sin banda
24	15400
25	Sin banda
26	Sin banda
Resultados de Calpaína-3 (2° IET)	
Control	13860
27	11880
28	9900
29	12540
30	5280
31	7920
32	5850

Tabla 8. Resultados de IDV (Integrated Density Value) de Miosina (MHC)

Resultados de Miosina (1° IET)	
Banda de 200 kDa	IDV
Control	11340
21	9180
22	8100
23	6480
24	6480
25	11880
26	9180
Resultados de Miosina (2° IET)	
Control	14280
27	8400
28	10080
29	13440
30	13440
31	10920
32	8400

15.2.4.1. Cálculos

$$\text{ABC C3} / \text{ABC MHC} = \text{C3/MHC}$$

En donde:

ABC C3 = Área bajo la curva de Calpaína 3

ABC MHC = Área bajo la curva de MHC

C3/MHC = Relación entre Calpaína 3 y Miosina

Tabla 9. Cálculos para Calpaína 3.

Cálculos para Calpaína-3 (1° IET)			
	ABC C3	ABC MHC	C3 / MHC
Control	11550	11340	1.0185
21	9100	9180	0.9913
22	10500	8100	1.2963
23	Sin banda	6480	-
24	15400	6480	2.3765
25	Sin banda	11880	-
26	Sin banda	9180	-
Cálculos para Calpaína-3 (2° IET)			
Control	13860	14280	0.9706
27	11880	8400	1.4143
28	9900	10080	0.9821
29	12540	13440	0.9330
30	5280	13440	0.3929
31	7920	10920	0.7253
32	7920	8420	0.6948

$$[(C3/MHC P) / (C3/MHC C)] = UR P$$

≥ 1 es Normal
< 1 es Deficiente

En donde:

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

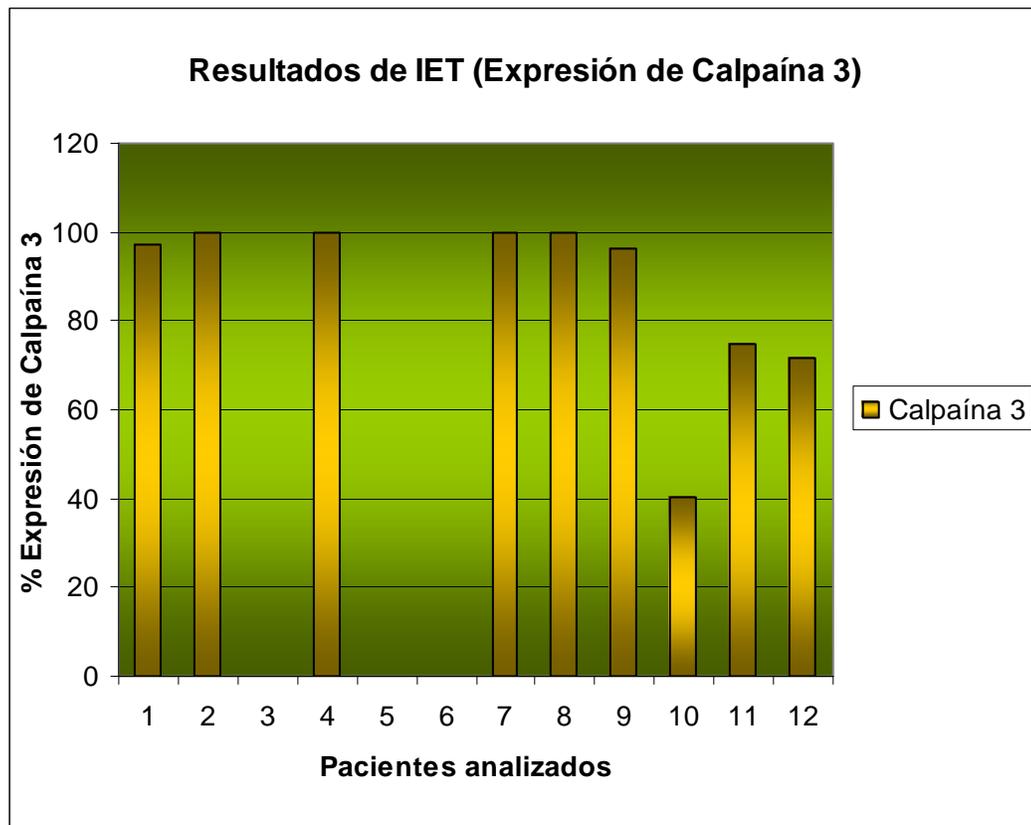
(C3/MHC C) = Relación entre Calpaína 3 y Miosina del Control

UR P = Unidades Relativas del Paciente

% Disminución = (1-UR P) (100)

Tabla 10. Resultados del análisis por Inmunoelctrotransferencia.

1° Inmunoelctrotransferencia					
Paciente	(C3/ MHC P) / (C3/MHC C)	UR P	% Disminución	% Expresión	Interpretación
21	(0.9913)/(1.0185)	0.9733	2.67	97.33	Disminuido
22	(1.2963)/(1.0185)	1.2728	0	100	Normal
23			100	0	Negativo
24	(2.3765)/(1.0185)	2.33	0	100	Normal
25			100	0	Negativo
26			100	0	Negativo
2° Inmunoelctrotransferencia					
27	(1.4143)/(0.9706)	1.4571	0	100	Normal
28	(0.9821)/(0.9706)	1.0118	0	100	Normal
29	(0.9330)/(0.9706)	0.9613	3.87	96.13	Disminuido
30	(0.3929)/(0.9706)	0.4048	59.52	40.48	Disminuido
31	(0.7253)/(0.9706)	0.7473	25.27	74.73	Disminuido
32	(0.6948)/(0.9706)	0.7158	28.42	71.58	Disminuido



Gráfica 2. Expresión de Calpaína 3 en pacientes analizados.

16. ANÁLISIS DE RESULTADOS

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), 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.

En un inicio el diagnóstico puede sustentarse por una historia clínica y familiar, niveles de CPK, biopsia muscular y electromiografía, más 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. Por lo cual es necesario emplear técnicas como Inmunofluorescencia Indirecta e Inmunoelctrotransferencia que nos ayudan a obtener un diagnóstico más confiable para cada paciente.

En el presente trabajo se realizó el estudio por inmunofluorescencia para distrofina, α -SG, β -SG, γ -SG, δ -SG, disferlina y merosina en 20 biopsias de pacientes con distrofia muscular, además del análisis por Inmunoelctrotransferencia de Calpaína 3, en 12 pacientes que en resultados previos de inmunohistoquímica obtuvieron resultados normales.

De las 20 biopsias analizadas por inmunofluorescencia se encontraron 8 pacientes (40 %) con una expresión normal de las proteínas analizadas (Dys 2, Dys 3, α -, β -, δ -, γ - SG, Dis H1 y Dis H2), de los cuales 2 son pacientes femeninas (2, 17) y 6 masculinos (5, 7, 11, 13, 16, 18)(Tabla 5)(Fig 8). 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.

Para el caso del paciente 11, un niño de 4 años de edad, presenta un cuadro clínico compatible con distrofia muscular congénita, por lo que en primera instancia se sospechaba que Merosina pudiera estar disminuida o ausente; sin embargo en el estudio de Inmunohistoquímica Indirecta realizado, todas las proteínas analizadas arrojaron resultados normales. Se debe destacar que hay varios tipos de distrofias musculares congénitas, pero en el laboratorio solo se realiza la prueba para merosina; también conocida como $\alpha 2$ -Laminina, por lo que no se descarta la posibilidad de que se trate de una distrofia muscular congénita aunque también podría ser otro tipo de distrofia muscular.

Se encontraron 4 pacientes (20 %) con una inmunotinción negativa para distrofina tanto en el lado COOH como el lado NH₂ de la proteína deficiente en la DMD, tres de ellos de sexo masculino (6, 8, 20) de 14, 8 y 14 años respectivamente y una niña de 3 años y 6 meses (paciente 3), 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 5), 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 (Ervasti, et-al., 1990; Ohlendieck y Campbell, 1991; Ohlendieck, et-al., 1993). Se ha sugerido que pacientes con DMD presentan mutaciones que alteran la pauta de lectura, originando un codon spot y no se produce distrofina (Tejeira S y Navarro C, 2004), esto puede explicar por que 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 (Monaco AP, 1988).

En el caso particular de la paciente 3 se determinó una expresión nula en la parte COOH y NH₃ terminal de distrofina y una deficiencia secundaria de α-SG (Fig. 13), presenta además un cuadro clínico de distrofia muscular, debilidad muscular desde que empezó a caminar, marcha tambaleante, dificultad para subir escaleras, caídas frecuentes, imposibilidad para correr y saltar, buen desarrollo neurológico, signo de Gowers positivo, contractura del tendón de Aquiles, pseudohipertrofia de gemelos, CPK de 19140 UI/L, EMG miopático, sus padres no presentan consanguinidad, es producto de la segunda 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 AG, et-al, 1994; Bushby KMD, 1991). En el laboratorio de genética humana también se le realizó un estudio de su cariotipo, además de FISH y en el análisis se determinó una translocación en un cromosoma X y un autosoma por lo cual la paciente fue finalmente diagnosticada con DMD.

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 (Worton y Thompson 1988).

El paciente 1, un niño de 8 años de edad, en su estudio de Inmunofluorescencia Indirecta (Fig. 14) se determinó una expresión negativa para la parte COOH terminal de Distrofina, mientras que en la parte NH₂ terminal hay deficiencia. El paciente 19 en su estudio de Inmunofluorescencia se observó una inmunotinción negativa para la parte COOH terminal de Distrofina y expresión normal para la parte NH₃. Ambos casos 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 NH₃ terminal en el caso del paciente 19. En estos dos pacientes también se observó una deficiencia secundaria de los sarcoglicanos, así como de disferlina tanto en la parte NH₃ como COOH terminal (Tabla 5), esto apoya la idea de 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.

Cabe señalar que en la mayoría de las 20 biopsias analizadas por inmunofluorescencias, se observaron cambios en el tamaño de las fibras musculares, infiltración de tejido adiposo y conectivo y en algunos casos núcleos centrales, estas observaciones histológicas son características de las distrofias musculares.

En dos pacientes varones (10 y 14) se encontró una deficiencia en la expresión de distrofina en la parte COOH y NH₃ terminal de la proteína (Tabla 5). Este patrón de fluorescencia es característico de la DMB, a estos pacientes se observó deficiencia secundaria de los sarcoglicanos: α y β en el caso del paciente 14 y deficiencia de α -SG en el paciente 10 (Fig. 15). El paciente 14 tiene 9 años, presenta un cuadro clínico de distrofia muscular. Se tiene reportado que en la DMB los síntomas comienzan entre los 5 y 15 años de edad, y este paciente entra en este rango. La escasa fluorescencia observada en el estudio de estos pacientes se debe a la expresión de una proteína más pequeña que conserva el lado NH₃ y COOH terminal y que es parcialmente funcional. Se ha observado que hay mutaciones que generan un corrimiento en el marco de lectura del gen que permite la expresión de esta proteína, por ejemplo se ha visto que en pacientes que presentan deleciones del exón 3 al exón 7 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).

El paciente 15 de sexo femenino mostró una fluorescencia negativa para disferlina, en su parte COOH y NH₃ terminal, el paciente 12 (masculino) con inmunotinción negativa para la parte NH₃ y deficiente en la parte COOH terminal (Tabla 5), el estudio de la paciente 9 reveló nulo para la parte COOH y deficiente para la parte NH₃ y el paciente 4 con una deficiencia primaria en disferlina en su

parte COOH y NH₃. El paciente 12 tiene 16 años y el paciente 4, 18 años, ambos son varones. En general la debilidad muscular de estos pacientes se observó en la cintura y en las extremidades proximales, característico de la LGMD 2B.

Sin embargo la paciente 9, una niña de 2 meses, con un diagnóstico de distrofia muscular, hipotonía muscular generalizada y aumento en el esfuerzo respiratorio, mostró también una inmunofluorescencia negativa para disferlina parte COOH y muy deficiente para la parte NH₃, no se ha reportado en la literatura un inicio de síntomas a tan temprana edad para el caso de alguna disferlinopatía, 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).

En el paciente 12 los resultados fueron inversos: negativo para la parte NH₂ y muy deficiente en la parte COOH terminal de disferlina.

En los pacientes que se encontraron nulos para Disferlina es posible que la mutación que originó esta deficiencia haya afectado el marco de lectura, generando así una proteína truncada que no es funcional por lo que no se observa en la Inmunohistoquímica. Se ha propuesto que Disferlina 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 los pacientes que muestran deficiencia o disminución de Disferlina, se propone que existen splicing alternativos debido a una mutación que genera una proteína más corta y parcialmente funcional.

El estudio de Calpaína 3 se realizó en pacientes que ya se habían estudiado anteriormente en el laboratorio de Genética Humana, y en cuyos resultados de Inmunohistoquímica no se detectó ninguna alteración en las proteínas analizadas tales como: Distrofina (parte COOH y NH₃), α-SG, β-SG, γ-SG, δ-SG, Disferlina

(parte COOH y NH₃), Merosina, Caveolina 3, Teletonina, Lamina A/C y Emerina. Varios estudios han mostrado que Calpaína 3 es una de las LGMDs más frecuentes (Vainzof M, *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.

Para realizar el estudio de Calpaína 3, se requirió de la técnica de Inmunoelectrotransferencia Indirecta puesto que Calpaína 3 es una proteasa que se localiza en citosol, su estudio a través de Inmunofluorescencia resulta difícil. La Inmunoelectrotransferencia, es una técnica que emplea anticuerpos para detectar el antígeno proteico de interés, la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo permite la detección de una única proteína dentro de una mezcla compleja de otras proteínas.

De las 12 biopsias analizadas por Inmunoelectrotransferencia, los pacientes: 22, 27, 24 y 28 mostraron una expresión normal de la proteína Calpaína 3. Los siguientes 5 pacientes: 12, 29, 30, 31 y 32, mostraron disminución en el porcentaje de expresión de Calpaína 3. De estos pacientes el 12 y 29 mostraron valores cercanos a los normales (97.33% y 96.18% respectivamente). Los siguientes pacientes: 30, 31 y 34 tuvieron menor expresión de Calpaína 3 (40.48%, 74.73% y 71.58%, respectivamente). Cabe mencionar que en los pacientes 23, 25 y 26, no hubo expresión de Calpaína 3.

Cabe mencionar que ene. Resultado final de Inmunoelectrotransferencia se observan 3 bandas, de 94, 60 y 55 kDa respectivamente (Fig. 18), pero el análisis se llevó a cabo refiriéndose principalmente a la banda de 94 kDa, esto con base a los artículos consultados de Calpaína 3, cuando no hay expresión de Calpaína 3 la banda de 94 kDa es la que se observa deficiente. En el caso del control las tres bandas de Calpaína 3 se observan, en los pacientes que resultaron con expresión normal de Calpaína 3 (22, 24, 27 y 28) también se observan las tres bandas de Calpaína 3, al igual que aquellos pacientes que mostraron valores cercanos al 100% de la expresión de Calpaína 3, tal es el caso del: 21 (97.33%), 29 (96.13%), en los cuales no se observa alteración en la Inmunoelectrotransferencia, no así en el momento del análisis.

En cuanto a los pacientes deficientes: el paciente 30 (Fig. 16) cuyo porcentaje de expresión de Calpaína 3 fue del 40.48% (Tabla 10), en el WB se observan las tres bandas, pero muy tenues, se trata de una paciente de 31 años, inició síntomas a los 19 años, presentando 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 gastronemios, EMG con degeneración activa, REM muestra pérdida del volumen muscular. La forma de presentación y distribución de la debilidad, hace considerar el problema como una distrofia muscular de cinturas y en este estudio se demuestra una deficiencia de Calpaína 3, que como consecuencia trae una LGMD de tipo 2A. Además la paciente tiene una hermana con dudoso cuadro clínico de distrofia muscular y complicaciones como insuficiencia cardiaca y hepatomegalia.

El paciente 31, de 52 años, también resultó deficiente, con un 74.73% de expresión de Calpaína 3 (Fig. 10), presenta debilidad muscular generalizada y progresiva, signo de Gowers positivo, dificultad para subir escaleras, levantarse de una silla e histológicamente la biopsia mostró alteraciones, aunque clínicamente no muestra un cuadro muy generalizado de distrofia muscular el paciente se diagnosticó con LGMD 2A, por su deficiencia en Calpaína 3.

Los pacientes negativos para la banda de 94 kDa (Fig. 20) (Tabla 10), de Calpaína 3 fueron: el paciente 23, 25 y 26. En el caso particular del paciente 23, la banda de 60 kDa se observa deficiente con respecto al control (Fig. 10). No así para los pacientes 25 y 26, en los cuales la banda de 60 kDa se observa normal y no presentan la banda de 55 kDa (Fig 20). Todos estos pacientes muestran un cuadro clínico de distrofia muscular con debilidad en extremidades superiores e inferiores, debilidad en la cintura escapular y pélvica y CPK anormal. Se considera por lo tanto que estos pacientes, presentan alteración en Calpaína 3, siendo así diagnosticados con LGMD de tipo 2A. En este estudio se tiene un porcentaje muy elevado de pacientes afectados, ya sea con deficiencia o ausencia de Calpaína 3, de un total de 12 biopsias analizadas en 8 (66.33%) de ellas

muestran alteración para Calpaína 3, estos resultados coinciden con otros estudios que se han reportado, en artículos consultados, 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.

17. CONCLUSIONES

- El análisis por Inmunofluorescencia Indirecta se llevó a cabo en 20 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 40% (8 pacientes), seguido de disferlina con un 20% (4 pacientes), y 8 pacientes no mostraron alteración en ninguna de las proteínas analizadas por Inmunofluorescencia Indirecta.
- Los sarcoglicanos se ven afectados por la deficiencia de distrofina, y en algunos casos también puede estar alterada la expresión de disferlina.
- El análisis de Calpaína 3 se llevo acabo por medio de Inmunolectrotransferencia, en 12 pacientes, que en estudios anteriores de Inmunofluorescencia Indirecta, no mostraron una alteración en las proteínas analizadas.
- En la determinación de Calpaína 3 por Inmunolectrotransferencia, 4 pacientes mostraron valores normales, 3 pacientes resultaron con ausencia y 5 pacientes con deficiencia de Calpaína 3, lo cual genera un alto porcentaje (66.33%) 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, así como en Inmunolectrotransferencia, siguen aun sin un diagnóstico, que nos permita identificar la proteína que se encuentra afectada.

18. BIBLIOGRAFÍA

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

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

Bonilla E, Fishbeck K, Schotland D. Freeze-fracture studies of muscle caveolae in human muscular dystrophy (1981). *Am J Pathol.* 104:167–173.

Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S, Becane HM, Hammouda EH, Merlini L, et al. Mutations in the gene encoding lamina A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy (1999). *Nature Genet.* 21: 285-8.

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

Bonne G, Mercuri E, Muchir A, Urtizbera A, Becane HM, Recan D, et al. Clinical and molecular genetic spectrum of autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy due to mutations of the lamina A/C gene (2000). *Ann Neurol.* 48: 170-80.

[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.

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

Bonnemann CG, [Noguchi S, McNally EM, Ben Othmane K, Hagiwara Y, Mizuno Y, Yoshida M, Yamamoto H, 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.

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.

[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.

Crosbie RH, Yamada H, Venzke DP, Lisanti MP, Campbell KP. Caveolin-3 is not an integral component of the dystrophin glycoprotein complex (1998). *FEBS Lett.* 427: 279–82.

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

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

Duclos F, Broux O, Bourg N, et al. Beta-sarcoglycan: genomic analysis and identification of a novel missense mutation in the LGMD2E Amish isolate (1998) *Neuromuscul Disord*. 8: 30-8.

Eiris-Puñal J, Pintos-Martínez E, Lasa A, Gallana P, Castro-Gago M. Distrofia muscular por déficit de γ sarcoglicano. Aportación de 3 pacientes con la mutación Δ 521T (2002). *Rev Neurol*. 34: 486-9.

Emery AEH. The muscular dystrophies (2002). *Lancet*. 2: 687-95.

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

Fairley EA, Kendrick-Jones J, Ellis JA. The Emery-Dreifuss muscular dystrophy phenotype arises from aberrant targeting and binding of emerin at the inner nuclear membrane (1999). *J Cell Sci*. 112: 3571-82.

Fardeau M, Eymard B, Mignard C, Tome FM, Richard I, Beckmann JS. Chromosome 15-linked limb-girdle muscular dystrophy: clinical phenotypes in Reunion Island and French metropolitan communities (1996). *Neuromuscul Disord*. 6: 447-53.

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.

Funakoshi M, Goto K, Arahata K. Epilepsy and mental retardation in a subset of early onset 4q35-facioscapulohumeral muscular dystrophy (1998). *Neurology*. 50: 1791-4.

Galbiati F, Volonté D, Chu JB, Li M, fine SW, Fu M, Bermudez J, Pedemonte M, W eidenheim KM, Pestell RG, Minetti C, Lisanti MP. Transgenic overexpression of caveolin-3 in skeletal muscle fibers induces a Duchenne-like muscular dystrophy phenotype (2000). 9689-9694.

Gilhuis HJ, Ten Donkelaar HJ, Tanke RB, Bingerotes DM, Zwarts MJ, Verrips A, et al. Nonmuscular involvement in merosin-negative congenital muscular dystrophy (2002). *Pediatr Neurol*. 26: 30-6.

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

Haravouri H, Vihola A, Straub V, Auranen M, Richard I, Marchad S. Secondary Calpain 3 deficiency in 2q-linked muscular dystrophy : titin is the candidate gene (2001). *Neurology*. 56: 869-77.

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.

Horowitz R, Kempner ES, Bisher ME, Podolsky RJ. A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle (1986). *Nature*. 323: 160–4.

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

Illarioshkin SN, Ivanova-Smolenskaya IA, Greenberg CR, Nylén 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.

Jung D, Duclos F, Apostol B, Straub V, Lee JC, Allamand V, Venzke DP, Sunada Y, Moomaw CR, Leveille CJ, Slaughter CA, Crawford TO, McPherson JD, Campbell KP Characterization of deltasarcoglycan a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy (1996). *J Biol Chem*. 271: 32321-32329.

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

Kramerova I, Kudryashova E, Venkatraman G and Spencer MJ. Calpain 3 participates in sarcomere remodeling by acting upstream of the ubiquitin-proteasome pathway (2005). *HUMAN Molecular Genetics*. 2125-2134.

Kramerova I, Kudryashova E, Venkatraman G and Spencer MJ. Calpain 3 participates in sarcomere remodeling by acting upstream of the ubiquitin-proteasome pathway (2005). *Human Molecular Genetics*. Vol 14, No. 15: 2125-2134.

Lim LE, Duclos F, Broux O, et al. Beta-sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12 (1995). *Nat Genet*. 11: 257-65.

Lin F, Worman HJ. Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C (1993). *J Biol Chem*. 268: 16321–6.

López de Munain A, Urtasun A, Poza JJ, Ruiz J, Sáenz A, Cobo AM, et al. Alteraciones en las proteínas funcionales (1999). Déficit de calpaína 3. *Rev Neurol*. 28: 154-8.

[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.

[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.

Matsuda C, Hayashi YK, Ogawa M. The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle (2001). *Hum Mol Genet.* 10: 1761– 6.

Mayans O, van der Ven PF, Wilm M. Structural basis for activation of the titin kinase domain during myofibrillogenesis (1998). *Nature.* 395: 863–9. Erratum in: *Nature* 397 (1999) 719].

[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

Mercuri E, Sewry C, Brown S, Muntoni F. Congenital muscular dystrophies (2002). *Semin Pediatr Neurol.* 9: 120-31.

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

Minetti C, Sotgia F, Bruno C, Scartezzini P, Broda P, Bado M, Masetti E, Mazzocco P, Egeo A, Donati M A, et al. Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy (1998). *Nat Genet.*18:365–368.

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 ES, Wiltshire TJ, Faulkner G. Limb-girdle muscular dystrophy type 2G is caused by mutations in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin (2000). *Nat Genet.* 24: 163–6.

Moreira ES, Wiltshire TJ, Faulkner G. Limb-girdle muscular dystrophy type 2G is caused by mutations in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin (2000). *Nat Genet.* 24:163–6.

Muchir A, Bonne G, van der Kooi AJ. Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B) (2000). *Hum Mol Genet.* 9: 1453– 9.

Muntoni F, Sewry C, Wilson L, et al. Prenatal diagnosis in congenital muscular dystrophy(1995). *Lancet.* 345: 591.

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.

[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.

Quan F, Janas J, Toth-Fejel S, Jhonson DB, Wolford JK, Popovich BW. Uniparental disomy of the entire X-chromosome in a female with Duchenne muscular dystrophy (1997). *Am J Hum Genet.* 60:160-5.

Raffaella-Di Barletta M, Ricci E, Galluzi G, Tonali P, Mora M, Morandi L, et al. Different mutations in the LMNA gene cause autosomal dominant and autosomal recessive Emery-Dreifuss muscular dystrophy (2000). *Am J Hum Genet.* 66: 1407-12.

Richard I, Breuguier L, Dincer P, Roudaut C, Bady B, Burgunder JM, et al. Multiple independent molecular etiology for LGMD2A patients from various geographical origins (1997). *Am J Hum Genet.* 60: 1128-38.

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.

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

Salmikangas P, van der Ven PF, Lalowski M. Myotilin, the limb-girdle muscular dystrophy 1A (LGMD1A) protein, cross-links actin filaments and controls sarcomere assembly (2003). *Hum Mol Genet.* 12: 189.

Selcen D, Stilling G, Engel AG. The earliest pathologic alterations in dysferlinopathy. (2001) *Neurology.* 56 (11): 1472-81.

Smeyers P. Distrofias musculares por alteración en el espacio extracelular: distrofia muscular congénita por déficit de merosina (1999). *Rev Neurol.* 28: 141-9.

Song K S, Scherer P E, Tang Z-L, Okamoto T, Li S, Chafel M, Chu C, Kohtz D S, Lisanti M P. Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins (1996). *J Biol Chem.* 271:15160-15165.

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.

Spencer MJ, Guyon JR, Sorimachi H, et al. Stable expression of calpain 3 from a muscle transgene in vivo: immature muscle in transgenic mice suggests a role for calpain 3 in muscle maturation (2002). *Proc Natl Acad Sci USA.* 99: 8874-9.

[Stuurman N, Heins S, Aebi U.](#) Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions (1998). *J Struct Biol.* 122(1-2):42-66.

Stuurmann N, Heins S, Aebi U. Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions(1998). *J Struct Biol.* 122:42–66.

Takada F, vander Woude DL, Tong HQ. Myozenin: an alpha-actinin-and gamma-filamin-binding protein of skeletal muscle Z lines (2001). *Proc Natl Acad Sci.* 98: 1595-600.

[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.

Tang Z-L, Scherer P E, Okamoto T, Song K, Chu C, Kohtz D S, Nishimoto I, Lodish H F, Lisanti M P. Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle (1996). *J Biol Chem.* 271: 2255–2261.

Thompson TG, Chan YM, Hack AA, et al. Filamin 2 (FLN2): a muscle-specific sarcoglycan interacting protein (2000). *J Cell Biol.* 148:115– 26.

Topaloglu H, Dincer P, Richard I. Calpain-3 deficiency causes a mild muscular dystrophy in childhood (1997). *Neuropediatrics.* 28:212– 6.

Tortora Grabowski. *Principios de Anatomía y Fisiología.* 9° Ed.OXFORD. México, 2005. pp.273-282.

Urtasun M, Poza JJ, Gallano P, Lasa A, Sáez A, Cobo AM, et al. Distrofia muscular por déficit de la sub unidad α -sarcoglicano del complejo de proteínas relacionadas con la distrofina (1998). *Med Clin.* 110: 538-42.

Vaghy P L, Fang J, Wu W, Vaghy L P. Increased caveolin-3 levels in mdx mouse muscles (1998). *FEBS Lett.*431:125–127.

Vainzof M, Anderson LVB, McNally EM, Davis DB, Faulkner G, Valle G, Moreira ES, Pavanello RCM, Passos-Bueno MR, Zatz M. Dysferlin Protein Analysis in Limb-Girdle Muscular Dystrophies (2000). *Journal of Molecular Neuroscience.* 17: 71-80.

Vainzof M, Moreira ES, Suzuki OT. Telethonin protein expression in neuromuscular disorders (2002). *Biochim Biophys Acta.* 1588: 33– 40.

Van der Kooi AJ, Ledderhof TM, de Voogt WG. A newly recognized autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with cardiac involvement (1996). *Ann Neurol.* 39:636.

Van der Kooi AJ, van Meegen M, Ledderhof TM, McNally EM, de Visser M, Bolhuis PA. Genetic localisation of a newly recognized autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy with cardiac involvement (LGMD1B) to chromosome 1q11–21 (1997). *Am J Hum Genet.* 60:891.

Wehnert MS, Bonne G. The nuclear muscular dystrophies (2002). *Semin Pediatr Neurol.* 9: 100-7.

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.

Williamson R.A., Henry MD, Daniels KJ., Hrstka RF, Lee JC, Sunada Y, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Campbell KP. Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in *Dag1*-null mice (1997). 6: 831-841.

Worton RG and Thompson MW. Genetics of the Duchenne Muscular Dystrophy (1988). *Annu. Rev. Genet.* 22:601-629.