



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

UMAE HOSPITAL DE PEDIATRIA

CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

UNIDAD DE INVESTIGACION MÉDICA EN GENÉTICA HUMANA



**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA**

ANÁLISIS POR INMUNOFLORESCENCIA EN BIOPSIAS MUSCULARES DE  
PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE DISTROFIA MUSCULAR DE  
DUCHENNE/BECKER Y  
DISTROFIA MUSCULAR DE CINTURAS TIPO 2B:  
UNA CORRELACIÓN CLÍNICA-INMUNOHISTOQUÍMICA.

**Tesista**

**Dr. Oliver de la Torre García**

**Tutor: Dra. Haydeé Rosas Vargas**

Investigador de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana

**Co-Tutor: Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez**

Jefe de Investigación de Medicina Genómica CMN 20 de Noviembre ISSSTE

**Asesor metodológico: Dr. Miguel Ángel Villasís Keever**

Investigador de la Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica

**Marzo de 2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

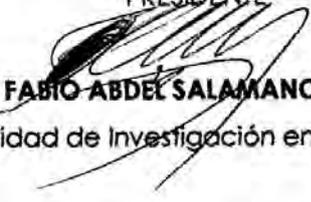
**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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.

# JURADO DEL EXAMEN

PRESIDENTE

  
**DR. FABIO ABDEL SALAMANCA GÓMEZ**

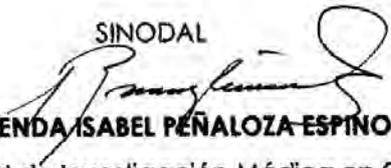
Jefe de la Unidad de Investigación en Genética Humana

SECRETARIA

  
**DRA. ANA CAROLINA SEPULVEDA VILDOSOLA**

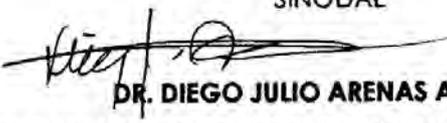
Encargada de la Dirección de Educación e Investigación en Salud

SINODAL

  
**DRA. ROSENDA ISABEL PEÑALOZA-ESPINOSA**

Investigador de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana

SINODAL

  
**DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA**

Investigador de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana

SINODAL

  
**DR. JUAN CARLOS HUICOCHEA MONTIEL**

Médico Adscrito del Servicio de Genética Clínica

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia: **Francisco, Yolanda, Christian, Rosario, Ricardo, Aramaund y Marian**, mi bastión, inspiración y fuerza.

A **Talia**, eres el ingrediente que hace de mi vida un ensueño.

Al **Dr. Carlos Yam**, amigo tu amistad es como un diamante, sólida y deslumbrante, juntos lograremos lo imposible.

A **Lalo y Rosy**, por su invaluable apoyo y consejos que permitieron la conclusión de este proyecto e inicio de otros más grandes.

A **Isabel Yam**, gracias por su inmensa amabilidad y buena disposición.

A **Arturo e Illiana**, todo es posible.

Al **Dr. Salamanca**, un ser humano admirable, maestro es un gran honor ser su pupilo. Gracias por enseñarme ha observar, analizar y comprender la expresión más maravillosa de este mundo, la vida.

Al **Dr. Coral**, gracias por la idea y dirección para este gran trabajo.

A todos mis maestros **Alicia, Juan Carlos, Ma. Antonieta, Diego, Rosenda, Roberto, Haydeé**, sus enseñanzas y ejemplo inspirador, hacen que todo sea más fácil de comprender.

A mis colegas y compañeros residentes **Edgar, Saúl, Carmen, Lilia, Adelina, Rosalba, Ramón y Alan**.

A **Deyanira y Alma** por su apoyo para la realización de esta tesis.

A mis pacientes.....

## ÍNDICE

Agradecimientos	2
Indice	3
Resumen	5
Antecedentes	6
Distrofia Muscular de Duchenne/Becker	8
Distrofia muscular de cinturas (LGMD2B)	10
Características moleculares de las Distrofias Musculares	13
Distrofina	13
Disferlina	16
Planteamiento del problema	20
Pregunta de Investigación	20
Hipótesis	21
Objetivo General	22
Objetivos específicos	22
Materiales y Métodos	23
Criterios de Selección	23
• Criterios de Inclusión	23
• Criterios de Exclusión	23
Tamaño de muestra	23
Variables	24
• Variables demográficas	24
• Variables Independientes	25
• Variables Dependientes	26
Metodología	34
• Selección e identificación de características de los pacientes	34
• Biopsias	34
• Técnica de Inmunofluorescencia	35
• Caracterización del cuadro clínico e inmunofenotipo	36
• Análisis de las preparaciones	37
Aspectos éticos	39
Factibilidad	40

Análisis estadístico	40
Cronograma de actividades	40
Resultados	41
• Características de los 12 pacientes con diagnóstico de distrofia muscular	41
• Hallazgos bioquímicos (inmunofluorescencia) de distrofina y disferlina	42
Tabla 2	44
• Características de los pacientes de acuerdo con el resultado del análisis de distrofina y disferlina	45
Tabla 3	47
Fotografía 1	48
Fotografía 2	49
Fotografía 3	50
Fotografía 4	51
Fotografía 5	52
Fotografía 6	53
Fotografía 7	54
Fotografía 8	55
Fotografía 9	56
Fotografía 10	57
Fotografía 11	58
Fotografía 12	59
Discusión	60
Conclusiones	64
Bibliografía	65
Anexo 1	71
Anexo 2	73

## RESUMEN ESTRUCTURADO

### **ANÁLISIS POR INMUNOFLORESCENCIA EN BIOPSIAS DE PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE Distrofia Muscular de Duchenne/Becker y Distrofia Muscular de Cinturas Tipo 2B: UNA CORRELACIÓN CLÍNICA-INMUNOHISTOQUÍMICA**

**Autores:** Oliver De la Torre García<sup>1-2</sup>, Haydeé Rosas Vargas<sup>1</sup>, Ramón Mauricio Coral Vázquez<sup>4</sup>, Miguel Ángel Villasís Kever<sup>3</sup>. 1. Unidad de Investigación Médica en Genética Humana. 2. Departamento de Genética Médica. 3. Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica. IMSS UMAE Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI. 4. Unidad de Investigación de Medicina Genómica CMN 20 de Noviembre, ISSSTE.

**Palabras clave:** Distrofia Muscular, Distrofina, Disferlina, Inmunohistoquímica, Fibra muscular.

**INTRODUCCIÓN:** Las Distrofias musculares agrupan a más de 30 enfermedades musculares. Su principal característica es que producen la degeneración y necrosis de la fibra muscular, por lo que presentan un curso clínico progresivo de debilitamiento muscular, comprometiendo principalmente la deambulación, función respiratoria y cardíaca. Distrofina es una proteína que se localiza en la membrana celular y funciona manteniendo la integridad estructural del citoesqueleto, su deficiencia provoca la Distrofia Muscular de Duchenne/Becker (DMD/DMB). Disferlina se encuentra en la membrana celular, en donde participa en procesos de reparación y su deficiencia produce DM de cinturas tipo 2B (LGMD2B).

**OBJETIVOS Y METODOLOGÍA:** Establecer una correlación entre la deficiencia primaria de distrofina ó de disferlina, y la deficiencia primaria de distrofina más la deficiencia secundaria de disferlina, con el cuadro clínico de los pacientes con DMD/DMB y LGMD2B. Se incluyeron pacientes con sospecha diagnóstica de DM, se les tomó biopsia de músculo para analizar por inmunohistoquímica las proteínas distrofina y disferlina con anticuerpos específicos, se describió en base al cuestionario general de miopatías las características clínicas de cada paciente. Se realizó correlación de variables ordinales con prueba Tau de Kendal tipo B. Valor de  $P < 0.05$  significativa.

**RESULTADOS:** El estudio fue integrado por 12 pacientes. Se diagnosticaron seis pacientes con DMD, cuatro con LGMD2B y dos con DMB. Con respecto al inmunofenotipo dos pacientes tuvieron deficiencia única de distrofina, cuatro con deficiencia exclusiva de disferlina y seis con deficiencia primaria de distrofina y secundaria de disferlina. Al comparar las características clínicas de acuerdo con el tipo específico de deficiencia proteica observamos que en los dos pacientes que tuvieron exclusivamente deficiencia de Distrofina, no tienen diferencias clínicas y de la expresión proteica significativas. En los pacientes con deficiencia primaria de Disferlina tienen relativa mayor deficiencia de la porción carboxilo, así como edad de presentación y tiempo de evolución diferente, pero con el mismo cuadro clínico grave. Los pacientes con deficiencia primaria de Distrofina y secundaria de Disferlina, encontramos una relación que a mayor deficiencia proteica de ambas proteínas, hay una edad de presentación más temprana y mayor deterioro motor, conduciendo a un cuadro clínico con una severidad muy importante.

**CONCLUSIONES:** La deficiencia primaria de distrofina asociada a la deficiencia secundaria de disferlina, si se asocia a un fenotipo más grave, esto porque hay una presentación a edades más tempranas, con un involucramiento motor importante. En nuestros pacientes con DMD/DMB la severidad de la enfermedad, se correlaciona tanto con el dominio mayormente deficiente como con el grado de deficiencia de distrofina, siendo más graves los casos en los que se observa menor expresión del dominio carboxilo. La expresión alterada de una proteína del sarcolema, conduce a la alteración de otras moléculas y desestabilización de la membrana plasmática, lo que explicaría la deficiencia secundaria de disferlina.

## **Antecedentes**

Las distrofias musculares (DM) son un grupo heterogéneo de miopatías degenerativas primarias determinadas genéticamente, cuya manifestación clínica principal en el individuo afectado es el debilitamiento muscular progresivo, secundario a una degeneración y necrosis del tejido músculo-esquelético (Davies y Nowak 2006; Vainzof y Zatz 2003).

La evolución clínica de los pacientes es altamente variable, desde formas congénitas graves con progresión acelerada, hasta formas moderadas de instauración tardía que tienen un curso más lento y condicionan a la pérdida de la deambulaci3n, dificultad para la respiraci3n y muerte prematura (Davies y Nowak 2006; Vainzof y Zatz 2003).

Las DM, se clasifican de acuerdo con el modelo de herencia y al defecto proteico, tal como se presenta en la Tabla 1, donde se muestran el nombre del padecimiento, el locus del gen mutado, así como los modelos de herencia y el producto proteico deficiente. Hasta la fecha, se han identificado más de 30 genes involucrados, cuyas mutaciones pueden ocasionar DM, lo cual esta ligado a una diversidad molecular subyacente de estas patologías (Glover y Brown, 2007).

La deficiencia de alguna de estas proteínas de la fibra muscular provoca diferentes tipos de DM. Algunas de ellas forman parte del complejo de glicoproteínas asociado a la distrofina (DGC), como es el caso de la distrofina que da nombre a este complejo y cuya deficiencia provoca la Distrofia Muscular de Duchenne/Becker (DMD/DMB). Otras proteínas se encuentran en la membrana del núcleo, en el sarcolema o en el sarcómero. Por ejemplo, la disferlina se encuentra en la membrana celular, en donde participa en procesos de reparaci3n, mientras que la calpaína se ubica en el citoplasma. No obstante

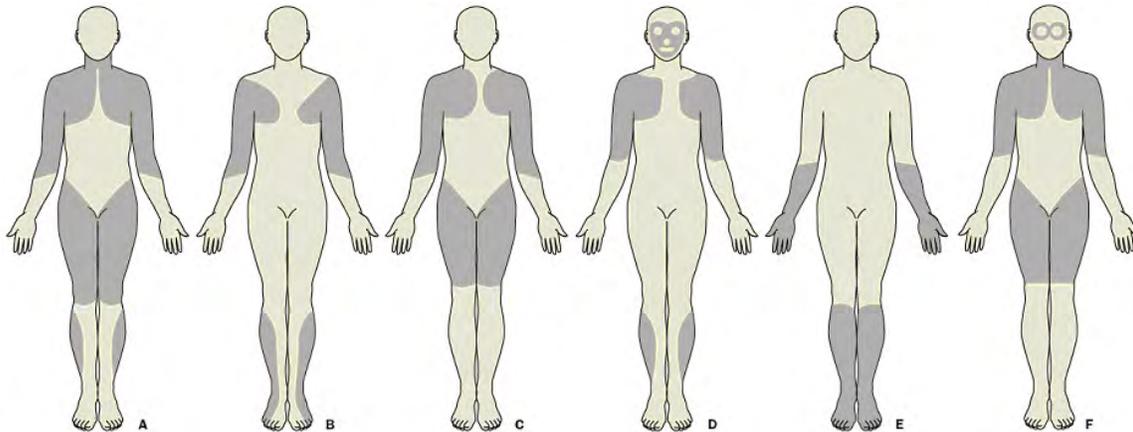
su diferente localización subcelular, ambas provocan distrofias de cinturas (LGMD) con un cuadro clínico semejante.

**TABLA 1.**  
**Loci de los Genes y Proteínas Mutadas, de las formas mas comunes de Distrofia Muscular \***

<b>Tipo de Distrofia Muscular</b>	<b>Locus</b>	<b>Proteína</b>
<b>Duchenne y Becker (XR)</b>	<b>Xp21</b>	<b>Distrofina</b>
Emery-Dreifuss	(XR) Xq28	Emerina
Emery-Dreifuss	(AD/AR) 1q	Lamina A/C
Distal	(AD) 14q, 2q	?
<b>Distrofia Muscular de Cinturas (AD) [LGMD AD]</b>		
1A.	5q	Miotilina
1B	1q	Lamina A/C
1C	3p	Caveolina 3
1D	6q	?
1E	7q	?
1F	2q	?
<b>Distrofia Muscular de Cinturas (AR) [LGMD AR]</b>		
2A	15q	Calpaina-3
<b>2B</b>	<b>2p</b>	<b>Disferlina</b>
2C	13q	$\gamma$ -sarcoglicano
2D	17q	$\alpha$ -sarcoglicano (adalina)
2E	4q	$\beta$ -sarcoglicano
2F	5q	$\delta$ -sarcoglicano
2G	17q	Teletonina
2H	9q	?
2I	19q	Relacionado a Fukutina
Modelos de herencia: AR=autosómico recesivo; AD=autosómico dominante; XR= recesivo ligado al cromosoma X; ?=Desconocido		

\*Modificado de Kanagawa y Toda, 2006.

Tomando en cuenta criterios puramente clínicos, las distrofias se han clasificado en: Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) y Becker (DMB), distrofia muscular de Emery-Dreifuss, distrofia miotónica, miopatías distales, afección facioescapulohumeral y escápulo-peroneal, distrofia oculofaríngea, distrofia muscular congénita y las LGMD (Emery, 2002). En la figura 1 se muestra la clasificación de las DM de acuerdo a las regiones musculares principalmente afectadas, mismas que se representan como áreas sombreadas.



**Figura 1:** Distribución de los grupos musculares, que se encuentran predominantemente afectados en diferentes tipos de distrofias: A, Tipo Duchenne/Becker; B, Emery-Dreifuss; C, distrofia de Cinturas; D, Facioescapulohumeral; E, distal; F, oculofaríngea. Áreas sombreadas=Afección (Tomado de Emery, 2002)

### ***Distrofia muscular de Duchenne/Becker.***

En el caso de la DMD la edad de inicio de los síntomas se hacen manifiestos durante los primeros seis años de vida, con dificultad para correr y posteriormente para subir escaleras. La debilidad en las rodillas y en el extensor de la cadera es evidente por la maniobra de Gowers. Algunos pacientes tienen cierto grado de retraso mental; es así que se calcula que hasta el 20% tiene un IQ menor a 70 puntos (Mehler, 2000). Muchos pacientes tienen pantorrillas con pseudohipertrofia, sin embargo, este signo clínico también se observa en otros tipos de DM, como en la DMB y algunas LGMD. La debilidad muscular es generalmente de predominio proximal y progresiva. Finalmente, la dependencia a la silla de ruedas se hace manifiesta en la mayoría de los casos alrededor de los 12 años de edad. La neumonía complicada con problemas cardiacos es la principal causa de muerte, lo que sucede en la segunda década de vida (Davies y Nowak, 2006; OMIM, 2007).

La DMD tiene una frecuencia de 1 en 3500 varones nacidos vivos, mientras que la DMB se presenta en 1 de 30,000 varones nacidos vivos. No existe un estudio

epidemiológico reciente que precise la incidencia de estas patologías, aunque algunas investigaciones han puesto de manifiesto que, además de las distrofinopatías, las distrofias musculares más frecuentes son las disferlinopatías, las sarcoglicanopatías, y las calpainopatías (Moore *et al*, 2006).

En el caso de la DMB, la distribución de la pérdida y debilidad muscular es muy similar a lo que ocurre en la DMD, pero la evolución de la enfermedad es más lenta, con una edad de inicio alrededor de los 12 años, aún cuando algunos pacientes presentan los síntomas en edades más tardías. La pérdida de la capacidad ambulatoria ocurre a partir de la adolescencia; mientras que los pacientes generalmente mueren en la cuarta o quinta década de la vida (Davies y Nowak, 2006).

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

### ***Distrofia muscular de cinturas tipo 2B (LGMD2B)***

En 1954, Walton y Nattrass establecieron que las LGMD, entre las patologías del músculo, son una entidad diferente de otras distrofias musculares. En estas enfermedades la debilidad se sitúa principalmente en los grupos musculares proximales de las extremidades. Es el grupo de distrofias en el que se presenta una mayor heterogeneidad clínica y genética. A la fecha se han descrito al menos 15 tipos diferentes, desde el punto de vista genético. Las formas autosómicas dominantes (Tipo 1) son raras y menos graves que las autosómicas recesivas (Tipo 2) (Bushby y Beckmann, 1995). Varios de estos desórdenes musculares se asocian con problemas cardiacos, como en la tipo 1B, 1D, 2C, 2E y 2F. En este tipo de distrofias, la edad de presentación habitual es entre los 15 y 25 años con progresión lenta; en un inicio se presenta debilidad muscular proximal, principalmente con afección en las extremidades inferiores. El involucramiento de las extremidades superiores ocurre posteriormente. Los síntomas más frecuentes son dificultad para subir escaleras, para correr y fatiga crónica; algunos pacientes pierden la independencia para moverse después de los 25 años, y algunos individuos heterocigotos pueden desarrollar sintomatología leve de instauración más tardía (OMIM, 2007).

### ***Características moleculares de las Distrofias Musculares***

El amplio espectro de las DM dificultó por mucho tiempo su estudio para determinar su fisiopatología; y fue hasta el advenimiento de las técnicas bioquímicas y moleculares que se hizo posible identificar varios genes y proteínas relacionados. Este avance permitió diseñar nuevos métodos diagnósticos y proponer una clasificación, la cual también toma en cuenta las distintas proteínas involucradas. El punto de partida lo estableció el descubrimiento en los años 80's del gen que codifica para la proteína distrofina (Monaco *et al*, 1985). A partir de estos estudios, se descubrió que la distrofina se encuentra asociada a diversas proteínas (DAP: proteínas asociadas a distrofina) formando

un complejo oligomérico llamado complejo distrofina-glicoproteínas (DGC) (Ervasti y Campbell, 1993; Yoshida y Ozawa, 1990). Dado que el DGC conecta a la matriz extracelular con el citoesqueleto (Ibraghimov-Beskrovnaya *et al*, 1992) y la deficiencia de algunas de sus proteínas afecta la estabilidad de la membrana plasmática, se piensa que el complejo protege a la célula muscular del daño inducido por el proceso mecánico de la contracción y relajación (Campbell, 1995). Aunado a esto, también se ha propuesto que dicho complejo puede participar en procesos de transducción de señales (Rando, 2001; Lapidus *et al*, 2004). Dentro de este gran complejo está incluido el subcomplejo sarcoglicano (SG); el cual está compuesto por las proteínas transmembranales homólogas  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -  $\delta$ -,  $\epsilon$ - y  $\zeta$ -SGs, (Ettinger *et al*, 1997; Matsumura *et al*, 1999; Wheeler *et al*, 2002). A través de diferentes estudios en pacientes y modelos animales se ha demostrado que las mutaciones en los SGs  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ - son causantes de las LGMDs 2D, 2E, 2C y 2F, respectivamente (Durbeej y Campbell, 2002; Hack *et al*, 2000; Ozawa *et al*, 2005); los SGs  $\epsilon$ - y  $\zeta$ - no se han asociado con algún tipo de DM.

Histológicamente, la ausencia de los SGs se refleja a través de dos características comunes de las DM: alteraciones en la permeabilidad de la membrana y necrosis (Hack *et al*, 2000). Por otra parte la expresión de la distrofina y los sarcoglicanos parece estar estrechamente relacionada, de tal forma que mutaciones en la distrofina conllevan a una reducción drástica de los SGs a nivel de proteínas, muy probablemente por la desestabilización del complejo (Matsumura *et al*, 1992).

En cuanto a las proteínas causantes de los diferentes tipos de LGMD, algunas pertenecen al sarcolema; tal es el caso de la disferlina que se ha asociado principalmente con la LGMD tipo 2B, pero también es causante de la miopatía distal de Miyoshi y la miopatía distal con afectación al compartimiento anterior, a las cuales en su conjunto se les denomina como disferlinopatías (Navarro y Teijeira, 2004).

La disferlina se acumula en sitios de ruptura de la membrana y participa en su reparación (Bansal *et al*, 2003; Hayashi, 2003). Cabe destacar que, en ocasiones, la misma mutación en el gen de disferlina puede causar distintos cuadros clínicos, aún en una misma familia (Kawabe *et al*, 2004), esto posiblemente es causado por factores genéticos y epigenéticos adicionales.

Como ya se mencionó, existen más proteínas asociadas a los diferentes tipos de DM, por lo que el diagnóstico únicamente por la clínica es difícil de establecer. En un estudio realizado en Brasil por el grupo de Vainzof *et al*, en 1999 determinó que el 68% de las LGMDs autosómico-recesivas es causado por mutaciones en los sarcoglicanos; los autores sugieren que esta alta incidencia puede deberse a la presencia de genes africanos y a un efecto fundador (Vainzof *et al*, 1999). Otro estudio del mismo grupo (Passos-Bueno *et al*, 1999) también puso en evidencia que las LGMDs más frecuentes en su población son las causadas por calpaina-3 y disferlina.

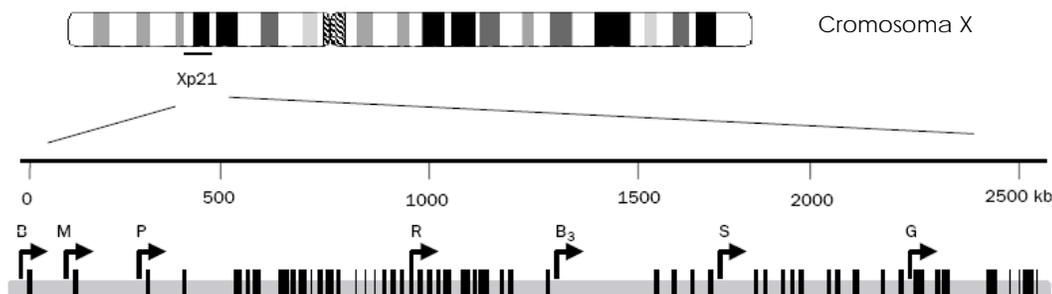
En un estudio multicéntrico en Estados Unidos de Norteamérica (EU) se analizaron por Western-blot y por inmunofluorescencia biopsias musculares de 337 pacientes con diagnóstico de LGMDs, de las cuales sólo se pudieron analizar bioquímicamente 266. Se determinó que el inmunofenotipo corresponde en un 12% a calpainopatías, 18% disferlinopatías, 15% sarcoglicanopatías, 15% distroglicanopatías y 1.5% caveolinopatías; el resto no está descrito, pero se enfatiza la diversidad étnica de la población de estudio y a estas entidades como las más frecuentes en los ciudadanos de EU. Con base en estos resultados, los autores sugieren que las LGMDs autosómico recesivas son más frecuentes que las autosómico dominantes (Moore *et al*, 2006)

## ***CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE LAS PROTEÍNAS DISTROFINA Y DISFERLINA***

### **Distrofina**

La distrofina es una proteína de 427 kDa que está ausente o reducida en pacientes con DMD/DMB; el gen que la codifica (*DMD*) se localiza en el brazo corto del cromosoma X (Xp21.2). Este gen contiene más de 2Mb y un total de 79 exones, codifica para un RNA mensajero (mRNA) de 141 kb y otros transcritos a partir de 7 promotores diferentes, a lo cual se suma la heterogeneidad derivada de un procesamiento alternativo. El mRNA de distrofina corresponde al 0.01% - 0.001% del músculo esquelético, y se expresa en otros tejidos como retina, cerebro, células de Schwann, y Purkinje (Fig 2).

El gen *DMD* es el más grande que se ha identificado hasta el momento en el humano, lo cual explica la tasa de mutación tan alta que presenta si lo comparamos con otros genes cuyo tamaño promedio se encuentra alrededor de 350kb (OMIM, 2007; Emery, 2002).



**Figura 2.** Organización genómica del gen de distrofina, localizado en Xp21. Las líneas negras verticales representan los 79 exones del gen distribuidos en 2.5MB. Las flechas indican los diferentes promotores: en particular son cerebro (B), músculo (M), Purkinje (P), Retina (R), cerebro (B<sub>3</sub>), células de Schwann (S), y general (G). (Modificado de Muntoni *et al*, 2003).

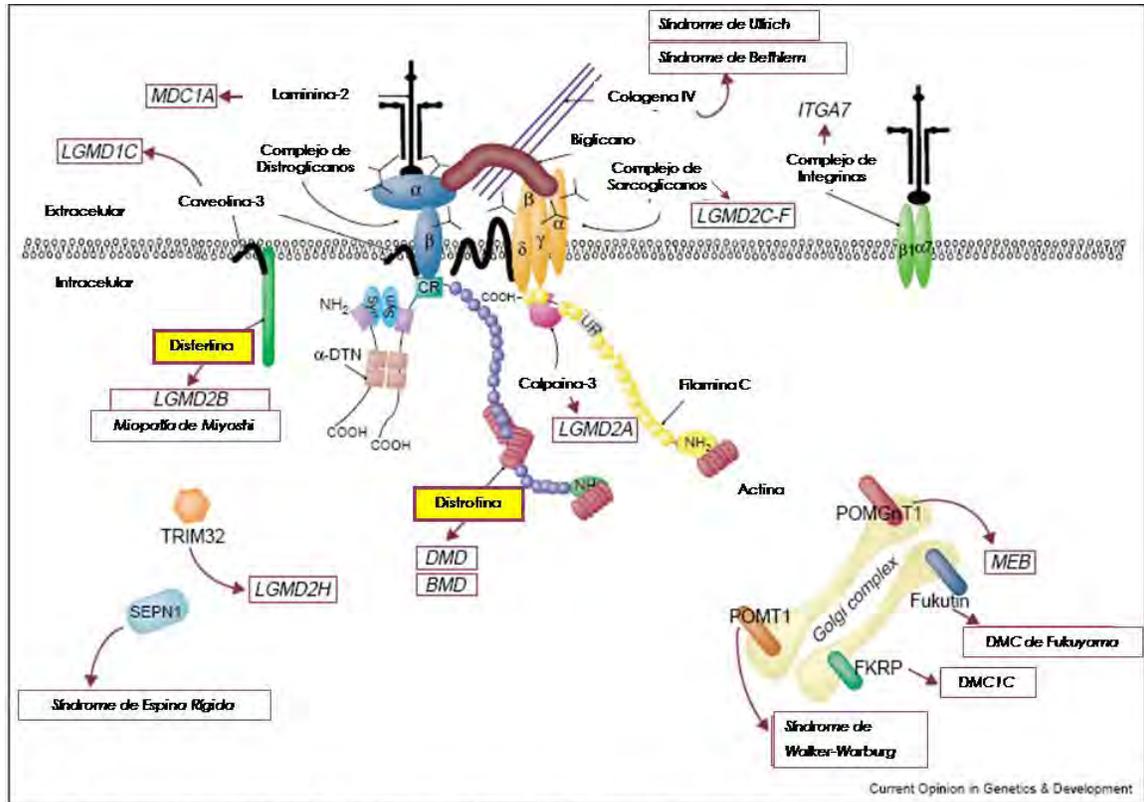
La estructura de la proteína producida por el gen *DMD* se ha deducido de la secuencia completa del cDNA de humano y codifica una proteína formada por 3,685 aminoácidos dispuestos en 4 dominios. Los tres primeros dominios se relacionan con porciones análogas de la proteína actinina, la cual se encuentra en el citoesqueleto de varios tipos celulares en diversos organismos. El dominio amino-terminal se compone por 240 aminoácidos y muestra una gran homología con el dominio de unión actina de la

actinina. El segundo dominio que comprende los aminoácidos 278 al 3080 presenta un patrón de repetición similar a los repetidos encontrados en actinina y espectrina. El tercer dominio con más de 140 aminoácidos es rico en cisteína y contiene sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ . El último dominio correspondiente a la región carboxilo-terminal agrupa 420 aminoácidos y no presenta analogía con alguna secuencia conocida (Rando, 2001).

La distrofina es una proteína del músculo esquelético de la familia de las espectrinas que se localiza en la membrana celular y funciona manteniendo la integridad estructural del citoesqueleto, así como para establecer conexión entre esta y la matriz extracelular. En condiciones normales la distrofina se expresa en el músculo esquelético del embrión y del adulto, en el músculo cardíaco, visceral, vascular liso y en el cerebro. Tiene una participación mecánica y estructural que permite mantener la distribución espacial del complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina lo cual permite mantener la integridad de la fibra muscular (Muntoni *et al*, 2003).

El análisis de DNA de pacientes con DMD/DMB ha mostrado que en el 50-70% de los casos con estos cuadros clínicos son ocasionados por eliminaciones localizadas principalmente en las regiones proximal y distal del gen *DMD*, mismas que se reconocen como “punto caliente” menor (exones 1-20) y “punto caliente” mayor (exones 44-52) de mutación, respectivamente (Muntoni *et al*, 2003; Baumbach *et al*, 1989). En uno de los primeros estudios realizados en pacientes mexicanos con DMD/DMB se determinó que aproximadamente el 53% presentaba eliminaciones y, de éstas, el 87% se agrupaba en el “punto caliente” mayor (Coral-Vazquez *et al*, 1997).

La Figura 3 muestra la localización de las proteínas en la fibra muscular, cuando están mutadas producen un tipo de DM, este tipo específico de padecimientos se menciona en los cuadros, resalta distrofina (DMD/DMB) y disferlina (LGMD2B).



**Figura 3.** El esquema muestra la localización de varias proteínas musculares asociadas con distrofias musculares. Las enfermedades ocasionadas por mutaciones en estas, se muestran en los recuadros (modificado de Dalčić, 2003)

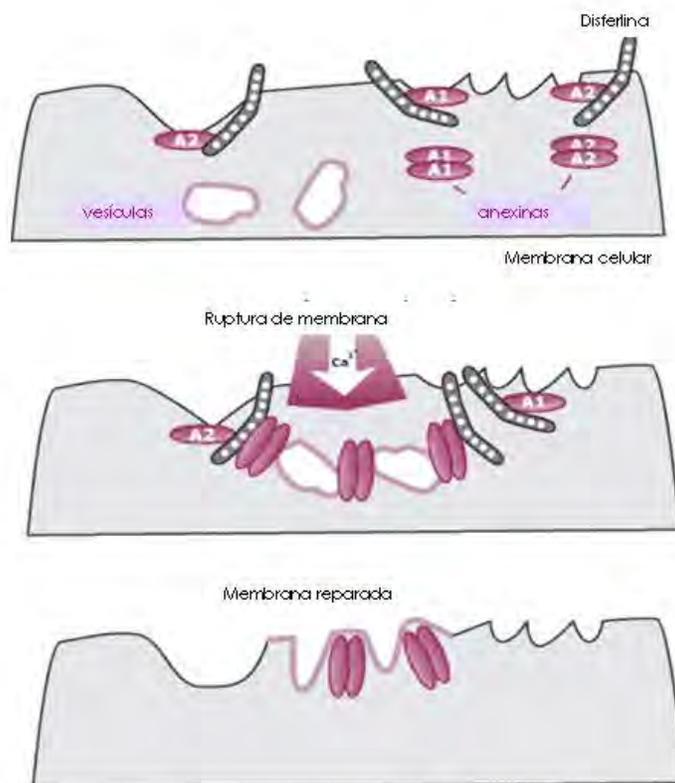
## **Disferlina**

Los pacientes con LGMD tipo 2B y miopatía de Miyoshi (MM) presentan mutaciones en un gen que codifica para una proteína similar al factor de espermatogénesis de *Caenorhabditis elegans* fer-1 (Bashir, 1998; Liu *et al*, 1998).

La disferlina es una proteína de 230 kDa, es codificada por el gen *DYSF*, que se localiza en el brazo corto del cromosoma 2 (2p13.3-p13.1) (Glover y Brown, 2007). Es una proteína de la membrana plasmática con una distribución ubicua, pero se expresa principalmente en el músculo esquelético (localizada en el sarcolema y vesículas citoplasmáticas), corazón y riñón. Es miembro de la familia Ferlina, una gran familia de proteínas con una estructura conservada caracterizada por la presencia de un solo dominio transmembranal C-terminal y múltiples dominios C2 los cuales los cuales están presentes en diversas proteínas asociadas a la membrana, y de los cuales se ha demostrado que intervienen en la unión de calcio, fosfolípidos y proteínas (Davis *et al*, 2002)

La disferlina es el primer miembro identificado de la maquinaria de reparación de la membrana en músculo esquelético. Los primeros estudios demostraron que la reparación requiere la acumulación y fusión de vesículas cerca del sitio de rompimiento de la membrana, un proceso que es esencial para evitar la degeneración de las fibras. La disferlina facilita el acoplamiento de la vesícula y la fusión con la membrana plasmática por la interacción con otras moléculas de disferlina y con proteínas desconocidas. Se ha demostrado recientemente que la disferlina co-localiza e interactúa con anexina A1 y A2, dos proteínas de unión a fosfolípidos ampliamente expresadas, las cuales al unirse facilitan la fusión de vesículas durante la reparación de la membrana mediada por disferlina.

En la figura 4 se muestra de manera esquemática a la disferlina y al complejo de reparación de la membrana del músculo esquelético, dando estabilidad al sarcolema.



**Figura 4.** Complejo de reparación y funcionamiento de la disferlina. Normalmente cuando la membrana celular es dañada, las vesículas intracelulares viajan a él sitio de lesión, se unen a las anexinas y finalmente a la disferlina, donde forman un complejo proteico semejante a un parche. [Modificado de Lennon, 2003]

Aunque la disferlina no es un componente integral del DGC, su distribución se altera en las DM asociadas al DGC, en la que su expresión está reducida en la membrana plasmática e incrementada en las vesículas citoplásmicas. Esto sugiere que una asociación funcional entre la disferlina y el DGC puede ser posible. Por el contrario se demostró, que existe en las fibras musculares de pacientes con disferlinopatía un sarcolema estructuralmente estable y una expresión normal del DGC en las fibras musculares. Existen tres cuadros clínicos diferentes, que difieren en la distribución e instauración de la debilidad muscular, que se asocian con mutaciones en el gen que codifica disferlina: LGMD tipo 2B (LGMD2B), miopatía de Miyoshi (MM) y miopatía del

compartimento distal anterior (DMAT). La primera es una enfermedad relativamente leve con inicio en la segunda o tercera década de vida y un involucramiento predominantemente proximal lentamente progresivo de las cinturas musculares pélvicas y escapulares, mientras que MM y DMAT se presentan con un patrón predominantemente de los grupos musculares distales (Guglieri *et al*, 2005; Glover y Brown, 2007).

Mediante estudios de genética molecular se ha observado que dentro de una familia, la misma mutación puede dar origen a dos cuadros clínicos diferentes (Liu *et al*, 1998). Esto sugiere que la diferencia entre estos dos cuadros clínicos requiere de la identificación de factores adicionales, como podrían ser genes modificadores. Inicialmente se postulo que un posible mecanismo patogénico en la disferlinopatías podría estar relacionado con el tráfico de vesículas en la fibra muscular (Achanzar y Ward, 1997), ahora se sabe que es un mecanismo más complejo en el cual están involucrados el calcio, anexinas, calpainas, caveolinas, y otras moléculas, pero sin poder dilucidarse claramente como funciona hasta el momento; lo que si es claro es que, la inestabilidad del sarcolema y la incapacidad para reparar la membrana son dos mecanismos patológicos diferentes . De esta forma la ausencia de disferlina causa alteraciones en el sellado y reparación de las fibras musculares dañadas propiciando, en consecuencia, el desarrollo de modificaciones distróficas en el músculo esquelético (Glover y Brown, 2007).

En la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Centro Médico Nacional Siglo XXI se han estudiado individuos con diagnóstico de DM desde hace aproximadamente 10 años. A partir del análisis de 268 biopsias musculares de pacientes con estas enfermedades, se ha determinado que la mayoría de las DM estudiadas son causadas por la deficiencia primaria de distrofina ( $\approx$  39%), disferlina ( $\approx$  13%), calpaina ( $\approx$  10%) y los sarcoglicanos ( $\approx$  1%) y del resto no ha sido posible determinar la etiología (Manuscrito en preparación). En este estudio, también se observó que la deficiencia

primaria de distrofina o calpaina, produce una deficiencia secundaria de disferlina. En contraste, las disferlinopatías no parecen afectar secundariamente a distrofina y calpaina.

## **Planteamiento del problema**

Los métodos de diagnóstico en el estudio de pacientes con DMD/DMB (distrofina) y LGMD2B (disferlina), en nuestro medio, es mediante un abordaje clínico completo con un estudio de genealogía estrictamente dirigido, así como la determinación de la CPK. Sin embargo, en muchos casos las características clínicas de los pacientes con una enfermedad miopática debida a la deficiencia de las proteínas distrofina o disferlina pueden sobreponerse principalmente en los primeros años de vida, lo que no permite diferenciar la etiología. Por lo anterior, es posible que al evaluar la expresión fenotípica de estas proteínas en el tejido muscular mediante inmunohistoquímica, se pueda establecer el diagnóstico específico. Hasta el momento no se han realizado estudios donde se haya evaluado la posible relación que pueda existir entre las características clínicas de los pacientes con la expresión fenotípica de las proteínas; por esta razón surge la siguiente:

## **Pregunta de investigación**

1. ¿Existen diferencias en el cuadro clínico de los pacientes con DM por deficiencia de distrofina, con respecto al cuadro clínico de pacientes con deficiencia primaria distrofina y con deficiencia secundaria de disferlina?
2. En los pacientes con LGMD2B ¿El grado de expresión de disferlina está relacionada con la gravedad del cuadro clínico?

## **Objetivo general**

1. Establecer si existe una correlación entre la deficiencia de distrofina y de disferlina, o ambas y el cuadro clínico de los pacientes con DM.

## **Objetivos específicos**

1. Describir las características clínicas de los pacientes con DMD/DMB, ó LGMD2B.
2. Comparar el cuadro clínico de los pacientes con DM que presentan deficiencia primaria de distrofina y deficiencia secundaria de disferlina, con el de los pacientes que solamente presentan deficiencia primaria de distrofina o disferlina.
3. Establecer la relación entre el cuadro clínico de los pacientes con LGMD2B y la expresión de la disferlina.

## **Hipótesis**

1. En los pacientes con DM que presentan deficiencia primaria de distrofina y deficiencia secundaria de disferlina, el cuadro clínico es más grave que los pacientes que solamente tienen deficiencia de distrofina.
2. En los pacientes con LGMD2B, existe una correlación entre el grado de deficiencia de disferlina y la severidad del cuadro clínico.

## **Materiales y métodos**

**Lugar de realización.** El presente estudio se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana (UIMGM) de la Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social. Esta Unidad es un centro de referencia para el estudio de miopatías de pacientes de toda la República Mexicana.

**Diseño del estudio.** Se trata de un estudio transversal y descriptivo.

**Universo.** Pacientes con sospecha de DM, enviados a la UIMGM, con biopsia muscular, a fin de establecer la etiología por inmunohistoquímica.

### **Criterios de selección**

- ***Criterios de inclusión***

1. Pacientes del sexo masculino y femenino.
2. Pacientes con debilidad muscular o diagnóstico de enfermedad miopática.
3. Con diagnóstico presuntivo desde el punto de vista clínico de DMB/DMD, y LGMD.
4. Con biopsia muscular en condiciones para su análisis.

- ***Criterios de eliminación***

1. Pacientes que no cuenten con información suficiente en el cuestionario general de miopatías.
2. Pacientes que la muestra de biopsia no pueda ser procesada o analizada.

### **Tamaño de muestra**

Se incluyeron a todos los sujetos que cumplieron los criterios de selección en el periodo comprendido de Febrero a Noviembre de 2008.

## **VARIABLES**

### **VARIABLES DEMOGRÁFICAS**

**Antecedentes perinatales anormales.** Son las complicaciones medicas durante el desarrollo de la gestación, que afecten el crecimiento y desarrollo del producto, condicionando alteraciones en el estado de salud del binomio y que repercuten en la morfogénesis, tales como: amenaza de aborto, parto prematuro, retraso en el crecimiento intrauterino, hipomotilidad fetal, oligohidramnios, enfermedad materna, etc. Se considerará lo reportado en el Cuestionario General de Miopatías (Anexo 2), en el apartado de antecedentes personales.

Escala de medición. Cualitativa nominal

Unidades o categorías: Presente, ausente.

**Consanguinidad:** Los individuos son consanguíneos si comparten un ancestro común. Se considerará en lo referente a la consanguinidad o al árbol genealógico, cuando se describa que hay el antecedente de un ancestro común a los progenitores del propositus, de acuerdo a lo descrito en el cuestionario general de miopatías.

Escala de medición. Cualitativa nominal

Unidades o categorías: presente, ausente.

**Historia familiar de miopatías.** Miopatía significa enfermedad muscular, se reportarán aquellos casos cuando existe el antecedente en algún familiar de DMD/DMB y LGMD. De acuerdo con lo descrito en el Cuestionario general de miopatías.

Escala de medición. Cualitativa nominal

Unidades o categorías: presente, ausente.

**Hipotonía al nacimiento.** Es la disminución del tono muscular, es un signo que puede sugerir la presencia de una disfunción del sistema nervioso central, trastornos musculares o genéticos. Se reportaran los casos cuando existan datos, de acuerdo con lo descrito en el cuestionario general de miopatías.

Escala de medición. Cualitativa nominal

Unidades o categorías: presente, ausente.

**Desarrollo psicomotor.** El desarrollo psicomotor, o la progresiva adquisición de habilidades en el niño, es la manifestación externa de la maduración del Sistema Nervioso Central (SNC). La maduración del SNC tiene un orden preestablecido y por esto el desarrollo tiene una secuencia clara y predecible: el progreso es en sentido céfalocaudal y de proximal a distal. Se reportaran los casos cuando existan datos en base a la escala de Denver, de retraso en el sostén cefálico, y retraso para caminar. De acuerdo con lo descrito en el cuestionario general de miopatías,

Escala de medición. Cualitativa nominal

Unidades o categorías: presente, ausente.

## **VARIABLES INDEPENDIENTES**

**Deficiencia de distrofina.** De acuerdo con el resultado de la inmunofluorescencia de la biopsia de músculo del paciente; a menor fluorescencia menor expresión.

Escala de medición. Cualitativa ordinal.

Categorías: expresión normal (+++), deficiencia moderada (++), muy deficiente (+), negativo (-).

**Deficiencia de disferlina.** De acuerdo con el resultado de la inmunofluorescencia de la biopsia de músculo del paciente; a menor fluorescencia menor expresión.

Escala de medición. Cualitativa ordinal.

Categorías: expresión normal (+++), deficiencia moderada (++), muy deficiente (+) y negativo (-).

**Deficiencia primaria de distrofina y secundaria de disferlina.** De acuerdo con el resultado de la inmunofluorescencia de la biopsia de músculo del paciente cuando existe tanto deficiencia (moderada, muy deficiente o negativo) de distrofina como de disferlina.

Escala de medición. Cualitativa nominal.

Categorías: presente/ ausente.

## **VARIABLES DEPENDIENTES**

**Severidad del cuadro clínico en la DMD/DMB.** De acuerdo a los datos clínicos recabados del cuestionario general de miopatías.

Escala de medición. Cualitativa ordinal.

Categorías. Leve: Edad de inicio igual o mayor a 12 años (DMB) y Grave: Edad de inicio menor o igual a 4 años (DMD).

**Severidad del cuadro clínico de la LGMD2B.** De acuerdo a los datos clínicos recabados del cuestionario general de miopatías.

Escala de medición. Cualitativa ordinal.

Categorías. Leve: edad de inicio de síntomas igual o mayor a 25 años; Grave: inicio de síntomas antes de los 25 años.

**Dificultad para subir escaleras.** Se considera dificultad para subir escaleras, cuando el paciente requiera de asistencia, apoyo o existan alteraciones motoras que le impidan o dificulten subir escaleras. De acuerdo a los datos clínicos recabados del cuestionario general de miopatías.

Escala de medición. Cualitativa nominal.

Categorías. Presente o ausente.

**Dificultad para levantarse de una silla.** Se considera dificultad para levantarse de una silla, cuando el paciente requiera de asistencia, apoyo o existan alteraciones motoras que le impidan o dificulten levantarse de la posición sentado a la posición de bipedestación. De acuerdo a los datos clínicos recabados del cuestionario general de miopatías.

Escala de medición. Cualitativa nominal

Unidades o categorías. Presente o ausente.

**Dificultad para levantarse de decúbito dorsal.** Se considera dificultad para levantarse de decúbito dorsal, cuando el paciente requiera de asistencia, apoyo o existan alteraciones motoras que le impidan o dificulten levantarse de la posición de decúbito dorsal a la posición de sentado. De acuerdo a los datos clínicos recabados del cuestionario general de miopatías.

Escala de medición. Cualitativa nominal.

Categorías. Presente o ausente.

**Maniobra de Gowers.** Consiste en observar cómo pasa el niño de la posición de sentado en el suelo a la posición de bipedestación, explora músculos de la cintura pelviana, si el

paciente presenta dificultad para realizarlo se considera positiva. De acuerdo con los datos clínicos recabados del cuestionario general de miopatías.

Escala de medición. Cualitativa nominal.

Categorías. Presente o ausente.

**Dificultad para pararse con las puntas de los pies.** Se considera dificultad para pararse con las puntas de los pies, cuando el paciente requiera de asistencia, apoyo o existan alteraciones motoras que le impidan o dificulten ponerse en posición de bipedestación sobre la punta de los pies. De acuerdo con los datos clínicos recabados del cuestionario general de miopatías.

Escala de medición. Cualitativa nominal

Categorías. Presente o ausente.

**Caídas fáciles.** Se considera como caídas fáciles, cuando el paciente presenta caídas a la marcha o en bipedestación, sin causa aparente que lo condicionen. De acuerdo a los datos clínicos recabados del cuestionario general de miopatías.

Escala de medición. Cualitativa nominal.

Categorías. Presente o ausente.

**Debilidad muscular** Se considera a la disminución de la resistencia y coordinación muscular. De acuerdo con los datos clínicos recabados del cuestionario general de miopatías.

Escala de medición. Cualitativa nominal.

Unidades o categorías. Presente o ausente.

**Limitación del perímetro de la marcha.** Se considera limitación del perímetro de la marcha, cuando debido a debilidad muscular, incoordinación de movimientos y fatigabilidad, el paciente disminuye la distancia o recorrido de caminata. De acuerdo con los datos clínicos recabados del cuestionario general de miopatías.

Escala de medición. Cualitativa nominal

Categorías. Presente o ausente.

**Dificultad para levantar los brazos.** Se considera dificultad para levantar los brazos, cuando el paciente requiera de asistencia, apoyo o existan alteraciones motoras que le

impidan o dificulten levantar los brazos por encima de los hombros. De acuerdo a los datos clínicos recabados del cuestionario general de miopatías.

Escala de medición. Cualitativa nominal.

Unidades o categorías. Presente o ausente.

**Dificultad para cargar pesos con los brazos.** Se considera dificultad para cargar pesos con los brazos, cuando el paciente requiera de asistencia, apoyo o existan alteraciones motoras que le impidan o dificulten cargar pesos con los brazos, tales como levantar un baso con agua, etc. De acuerdo con los datos clínicos recabados del cuestionario general de miopatías.

Escala de medición. Cualitativa nominal.

Categorías. Presente o ausente.

**Dificultad para la flexión de los brazos.** La flexión es el movimiento por el cual los huesos u otras partes del cuerpo se aproximan entre sí en dirección anteroposterior, paralela al plano sagital. La flexión es consecuencia de la contracción de uno o más músculos flexores. Se considera dificultad para la flexión de los brazos, cuando el paciente requiera de asistencia, apoyo o existan alteraciones motoras que le impidan o dificulten la flexión de los brazos. De acuerdo con los datos clínicos recabados del cuestionario general de miopatías.

Escala de medición. Cualitativa Nominal

Categorías. Presente o ausente.

**Dificultad para la extensión de los brazos.** La extensión es un movimiento de separación entre huesos o partes del cuerpo, en dirección anteroposterior. Es lo opuesto a la flexión. Se considera dificultad para la extensión de los brazos, cuando el paciente requiera de asistencia, apoyo o existan alteraciones motoras que le impidan o dificulten la extensión de los brazos. De acuerdo con los datos clínicos recabados del cuestionario general de miopatías.

Escala de medición. Cualitativa nominal

Categorías. Presente o ausente.

**Dificultad para cerrar o abrir manos.** Se considera cuando exista dificultad para la flexión y extensión de las manos, cuando el paciente requiera de asistencia, apoyo o existan

alteraciones motoras que le impidan o dificulten la flexión y extensión de las manos. De acuerdo con los datos clínicos recabados del cuestionario general de miopatías.

Escala de medición. Cualitativa nominal.

Categorías. Presente o ausente.

**Dificultad para abrir frascos o botellas.** Se considera cuando exista debilidad o disminución de la fuerza muscular de las manos, le impidan o dificulten al paciente abrir por si mismo frascos o botellas. De acuerdo con los datos clínicos recabados del cuestionario general de miopatías

Escala de medición. Cualitativa nominal.

Categorías. Presente o ausente.

**Debilidad en cuello.** Se considera cuando exista debilidad o disminución de la fuerza muscular de los músculos del cuello, que le impidan o dificulten al paciente realizar movimientos del cuello. De acuerdo con los datos clínicos recabados del cuestionario general de miopatías.

Escala de medición. Cualitativa nominal.

Categorías. Presente o ausente.

**Diplopía.** La diplopía es el término que se aplica a la visión doble, la percepción de dos imágenes de un único objeto. La imagen puede ser horizontal, vertical o diagonal. De acuerdo con los datos clínicos recabados del cuestionario general de miopatías.

Escala de medición. Cualitativa nominal.

Categorías. Presente o ausente.

**Alteración de movimientos faciales.** Se considera cuando debido a la disminución de la resistencia y coordinación muscular, al paciente se le dificulta realizar movimientos de los músculos faciales, tales como masticar, silbar, sonreír, gesticular, etc. De acuerdo con los datos clínicos recabados del cuestionario general de miopatías; esta la alteración es secundaria a contracturas o atrofia muscular.

Escala de medición. Cualitativa nominal.

Categorías. Presente o ausente.

**Disfagia.** Disfagia es el síntoma consistente en dificultad para la deglución (problemas para tragar). Esta dificultad suele ir acompañada de dolores, a veces lancinantes (disfagia dolorosa u odinofagia). De acuerdo con los datos clínicos recabados del cuestionario general de miopatías.

Escala de medición. Cualitativa nominal.

Categorías. Presente o ausente.

**Disartria.** La disartria es un trastorno del habla, se distingue de una afasia motora en que no es un trastorno del lenguaje, sino del habla; es decir, el paciente manifiesta dificultades asociadas con la articulación de fonemas. Entre los síntomas destaca: emisiones más automáticas, contexto conversacional, voz forzada, disfónica, respiración irregular y poco coordinada, articulación de fonemas defectuosa. De acuerdo con los datos clínicos recabados del cuestionario general de miopatías.

Escala de medición. Cualitativa nominal.

Categorías. Presente o ausente.

**Disnea.** La disnea es de dificultad respiratoria o falta de aire, es una experiencia subjetiva de malestar ocasionado por la respiración que engloba sensaciones cualitativas distintas que varían en intensidad. De acuerdo con los datos clínicos recabados del cuestionario general de miopatías.

Escala de medición. Cualitativa nominal.

Categorías. Presente o ausente.

**Mialgias.** Es un síntoma común de las distrofias musculares y significa dolor muscular. De acuerdo con los datos clínicos recabados del cuestionario general de miopatías

Escala de medición. Cualitativa nominal.

Unidades o categorías. Presente o ausente.

**Calambres.** Es una contracción súbita y dolorosa de un músculo o de un grupo de ellos, puede ser a causa de una insuficiente oxigenación de los músculos o por la pérdida de líquidos y sales minerales, como consecuencia de un esfuerzo prolongado, movimientos bruscos o frío. De acuerdo con los datos clínicos recabados del cuestionario general de miopatías.

Escala de medición. Cualitativa nominal.

Categorías. Presente o ausente.

**Atrofia muscular.** La atrofia muscular se define como una disminución en la masa del músculo. Cuando hay atrofia muscular, el músculo se vuelve más débil, ya que la capacidad de ejercer fuerza está relacionada con la masa. De acuerdo con los datos clínicos recabados del cuestionario general de miopatías.

Escala de medición. Cualitativa nominal.

Categorías. Presente o ausente.

**Miotonía.** Miotonía es un síntoma caracterizado por la lentitud de la relajación de los músculos después de la contracción voluntaria o la estimulación eléctrica, las personas con este trastorno pueden tener problemas para soltar objetos o pueden tener dificultades para pasar de una posición sentada a bipedestación y dificultad para andar. De acuerdo a los datos clínicos recabados del cuestionario general de miopatías.

Escala de medición. Cualitativa nominal.

Categorías. Presente o ausente.

**Disminución de reflejos osteotendinosos.** El reflejo osteotendinoso es una contracción muscular inmediata e involuntaria, producto del arco reflejo y como respuesta a un estímulo que sobrepasa un umbral. En la clínica los explorados con más frecuencia son el bicipital, tricipital, supinador rotuliano y aquileo. De acuerdo a los datos clínicos recabados del cuestionario general de miopatías.

Escala de medición. Cualitativa nominal.

Unidades o categorías. Presente o ausente.

**Respuesta plantar disminuida.** Se considera cuando debido a la disminución de la resistencia y coordinación muscular, el paciente presenta dificultad o impedimento para la extensión plantar. De acuerdo con los datos clínicos recabados del cuestionario general de miopatías.

Escala de medición. Cualitativa nominal.

Unidades o categorías. Presente o ausente.

**Alteración de los movimientos oculares.** Se considera cuando debido a la disminución de la resistencia y coordinación muscular, al paciente se le dificulta realizar movimientos oculares, tales como los movimientos de seguimiento o persecución lenta, de fijación, y

compensatorios. De acuerdo con los datos clínicos recabados del cuestionario general de miopatías; esta la alteración es secundaria a contracturas o atrofia muscular.

Escala de medición. Cualitativa nominal.

Categorías. Presente o ausente.

**Ptosis.** Ptosis es una posición anormalmente baja (caída) del párpado superior. De acuerdo con los datos clínicos recabados del cuestionario general de miopatías.

Escala de medición. Cualitativa nominal.

Unidades o categorías. Presente o ausente.

**Patrón de electromiografía.** Se considera el resultado del estudio electromiográfico: Normal, patrón neuropático, patrón miopático. Para efectos del estudio la descripción de un patrón electromiográfico miopático. De acuerdo con los datos del cuestionario general de miopatías.

Escala de medición. Cualitativa nominal.

Categorías. Presente o ausente.

**Niveles de Creatina Fosfocinasa (CPK).** Valores sericos de Creatina Fosfocinasa. Niveles normales: < 200 UI/L; anormal: > 200 UI/L. Para efectos del estudio solo se consideran los valores anormales. De acuerdo con los datos del cuestionario general de miopatías.

Escala de medición. Cualitativa nominal.

Categorías. Presente, ausente.

## **METODOLOGÍA**

### **SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES**

A la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana se enviaron las biopsias de pacientes con sospecha de enfermedad miopática, junto con el Cuestionario General de Miopatías (Anexo 2). Los pacientes fueron procedentes del Instituto Mexicano del Seguro Social, así como de otras instituciones como el Instituto Nacional de Rehabilitación, entre otros. El cuestionario lo aplicó el médico tratante que refiere la biopsia y en ocasiones se le contactó para verificar y complementar la información. El cuestionario incluye diferentes características clínicas que son evaluadas en base a una serie de habilidades motoras que permiten a un individuo sano realizar las actividades diarias, como son caminar, sentarse, pararse, tomar objetos, levantarlos, y otros signos clínicos como la pérdida de la masa muscular, contracturas, y debilidad muscular. Estas habilidades motoras en caso de existir alteraciones son evaluadas y consignadas como presentes o ausentes, así como la edad de inicio del signo o síntoma. Además, el cuestionario incluye los datos de estudios de laboratorio y gabinete como niveles de CPK, y los reportes de los hallazgos de electromiografía. Para este estudio los datos clínicos fueron tomados del cuestionario general de miopatías (Anexo 2).

### **BIOPSIAS**

- A. Las muestras de biopsias de músculo de 0.5 cm<sup>2</sup> tomadas del gastrocnemio llegaron con gasa humedecida en solución salina y preservada en hielo para su traslado.
- B. Para iniciar su procesamiento las biopsias se fijaron sobre corcho, donde la orientación de las fibras musculares se orientó en forma perpendicular para que los cortes se pudieran realizar transversales. Se fijaron con medio de congelamiento Tissue-Tek (Jung, Nussloch, Germany), congelándose en isopentano enfriado con nitrógeno líquido y se almacenaron en refrigeración a -80 °C hasta su uso y el sobrante fue también almacenado en refrigeración a -80 °C de forma codificada para su resguardo.
- C. Las biopsias se cortaron a un grosor de 20 micras en un criótomo, y posteriormente se fijaron en laminillas, previamente tratadas con poli-lisina. Una vez fijadas se realizó el procedimiento de inmunofluorescencia por duplicado para cada grupo de muestras y se empleó como control positivo, biopsias de músculo esquelético normal junto con la biopsia del paciente.

D. Para el estudio inmunohistoquímico, se realizó un procesamiento de las biopsias basándonos en una técnica estandarizada en la UIMGH, utilizando diferentes anticuerpos y fluoróforos acoplados mediante un proceso sistematizado como se describe a continuación:

### **Técnica de Inmunofluorescencia**

1. Se adicionó agua destilada a la caja metálica para inmunohistoquímicas
2. Adicionamos 1ml de Solución bloqueadora (BSA) al 5% a cada laminilla durante 30 minutos.
3. Realizamos el inmunomarcaje de las criosecciones en serie, etiquetando cada laminilla y una de ellas por cada proteína a analizar, de la siguiente forma:

#### **Detección de distrofina**

Se utilizaron anticuerpos primarios monoclonales de ratón para Distrofina (Dys) con reactividad cruzada a humanos: Dystrophin N-terminus [con etiqueta denominada: Dys2-carboxilo] y Dystrophin C-terminus [con etiqueta denominada: Dys3-amino]; ambos de laboratorios Vector.

#### **Detección de disferlina**

Se utilizaron anticuerpos primarios monoclonales de ratón para Disferlina (H): NCL-Hamlet (C-terminus) [con etiqueta denominada: H1-carboxilo] y NCL-Hamlet (N-terminus) [con etiqueta denominada H2-amino] ambos de Novocastra laboratorios Ltd. UK.

Se diluyeron los anticuerpos (Ab) primarios:

- a. Dys2 y Dys3 a una dilución de 1:200 de amortiguador fosfato salino (PBS)
  - b. H1 y H2 a una dilución de 1:100 de BSA
4. Adicionamos aproximadamente 300 µl de la dilución de cada anticuerpo a la laminilla correspondiente y PBS a la muestra del control negativo.
  5. Después de la incubación en cuarto frío de 12-18 hrs con el anticuerpo primario, se retiró con lavados de PBS a una dilución 1x con 300 µl: 2 lavados de 10 minutos cada uno y un último de 15 minutos
  6. Posteriormente las laminillas se incubaron a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario Cy3™-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch laboratories, Inc.), el cual fue preparado diluyéndolo

- 1:250 en solución PBS, y se adicionaron 200 µl a cada laminilla dejándose incubar por 2 hrs.
7. Se retiró el anticuerpo secundario con lavados de PBS: un lavado rápido, dos de 5 minutos cada uno y un último de 15 minutos
  8. Finalmente las muestras se montaron con VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories, CA, U.S.A.) aproximadamente 20 µl por laminilla. Se colocaron cubreobjetos y se sellaron con esmalte; para finalmente observarlas al microscopio de fluorescencia.

### **CARACTERIZACIÓN DEL CUADRO CLINICO E INMUNOFENOTIPO.**

Una vez evaluadas las biopsias y el cuestionario general de miopatías, establecimos una relación con base en el defecto proteico subyacente, las características clínicas preponderantes, y la edad de inicio de los signos y síntomas con los hallazgos inmunohistoquímicos para poder probar la hipótesis. Analizamos las variables que corresponden al interrogatorio dirigido para la identificación de DM de inicio posterior al nacimiento, eliminando las relacionadas a miopatías con búsqueda para determinar la etiología de otras miopatías (mitocondriales) que son evaluadas en el cuestionario general de miopatías, que corresponden a las miopatías congénitas o mitocondriales; las variables que consideramos son aquellas como la edad de inicio de signos y síntomas, sexo, de acuerdo a los parámetros de la exploración física descrita dentro del mismo cuestionario la afección del paciente, por ejemplo la capacidad para subir escaleras, así como la historia natural de la enfermedad de acuerdo a la evolución del paciente. También se tomaron los datos de la exploración física, tales como: maniobra de Gowers, disnea, levantarse de una silla, caminar de puntitas, uso de ortesis, complicaciones ortopédicas, etc. Además de las características de laboratorio y gabinete.

## **Análisis de las preparaciones**

En el presente estudio, la inmunohistoquímica es la herramienta fundamental para establecer el diagnóstico de DMD/DMB (Deficiencia de Distrofina) y LGMD2B (Deficiencia de Disferlina); se emplea para identificar y localizar a proteínas específicas en un tejido. El principio está basado en la afinidad específica de un anticuerpo por su antígeno (Vainzof y Zatz, 2003). La inmunohistoquímica muestra como la reacción específica antígeno-anticuerpo (anticuerpo marcado), permite la tinción fluorescente y su identificación posterior por microscopía fluorescente estándar.

La evaluación de las biopsias por inmunofluorescencia es un método empírico, el cual se realiza comparando las biopsias de un paciente sin enfermedad muscular versus el caso a estudiar, así como de las características morfológicas y de tinción de las principales estructuras celulares de la fibra muscular como son:

- Disposición intracelular: organización de las fibras, forma, tamaño, y distribución de tejido subcutáneo.
- Membrana celular: forma, tamaño, y espesor.
- Tinción de citoplasma
- Núcleos: forma, número y disposición espacial intracelular.

Estas estructuras se pueden observar modificadas o alteradas, debido a la deficiencia de distrofina, disferlina o ambas.

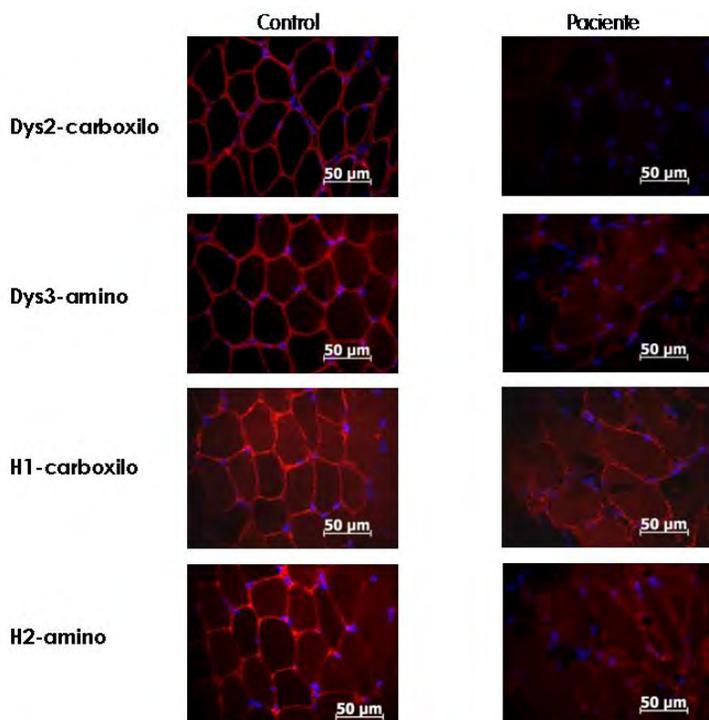
Establecimos el inmunofenotipo en base a una escala de patrón de fluorescencia, que definió al paciente como normal (+++), deficiente (++) , muy deficiente (+) y negativo (-) para la proteína estudiada.

De esta forma, una muestra control con patrón normal de fluorescencia (+++) para distrofina y disferlina, se encuentra una distribución intracelular bien definida con una organización en mosaico, con poca o nula presencia de tejido subcutáneo intracelular; a nivel de la membrana celular, se observa estructuralmente íntegra y de igual forma la fluorescencia tiene un patrón de tinción de distribución homogénea; los núcleos, comparándolos, se observaron de tamaño homogéneo y localizados principalmente en la periferia con respecto al centro o cercanos a la región interna de la membrana.

Para efectos de este estudio, las biopsias de los pacientes se clasificaron y se estableció con diagnóstico de distrofinopatía si la muestra analizada para esta proteína, presentada menor fluorescencia: moderada (++) , muy deficiente (+) o fluorescencia

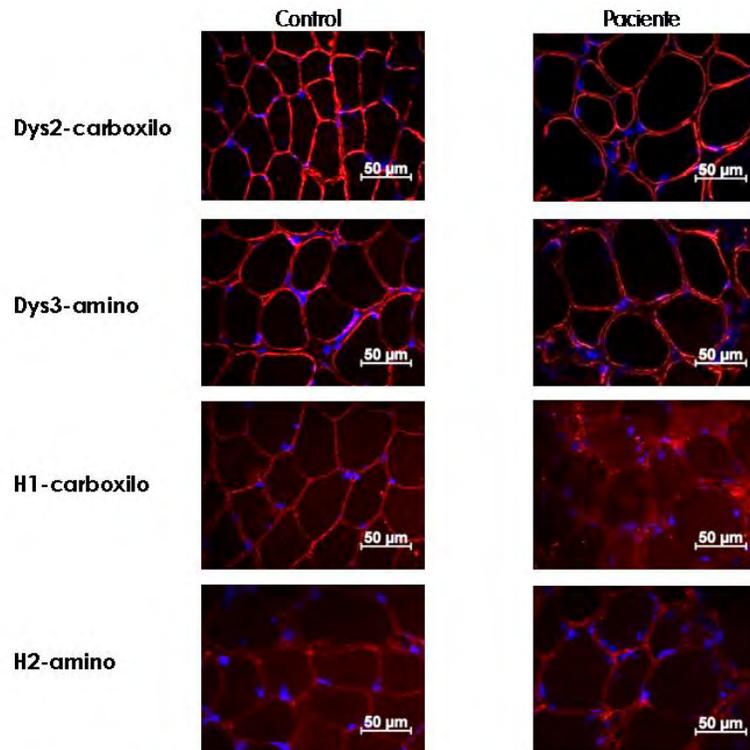
negativa (-); y con diagnóstico de disferlinopatía, solamente si la muestra analizada para esta proteína presentaba menor fluorescencia: moderada (++), muy deficiente (+), ó negativa (-), de ésta.

En la figura 5 se muestra la fotografía de las biopsias analizadas de un individuo control (C) y de un paciente (P) con resultado de inmunofenotipo correspondiente a deficiencia primaria de Distrofina y secundaria de disferlina debido a una expresión deficiente, de la proteína distrofina porción carboxilo (Dys2-carboxilo) (-) y muy deficiente para la porción amino Dys3-amino (+), la proteína disferlina porción carboxilo (H1-carboxilo) con deficiencia moderada y muy deficiente de la porción amino (H2-amino) (+).



**Figura 5.** Estudio de Inmunofluorescencia del paciente, que se muestra negativo para Dys2-carboxilo (-), muy deficiente para Dys3-amino (+), deficiente para H1-carboxilo (++) y muy deficiente para H2-amino (+) . (Modificado de Escalante, 2009)

En la figura 6 se muestra la fotografía de las biopsias analizadas de un individuo control (C) y de un paciente (P) con resultado de inmunofenotipo de disferlinopatía debido a una fluorescencia deficiente (++) de la proteína disferlina porción carboxilo (H1-carboxilo) y muy deficiente (+) de la porción amino (H2-amino).



**Figura 6.** Estudio de inmunofluorescencia del paciente, se observa deficiente para H1-carboxilo (++) y muy deficiente para H2-amino (+). (Modificado de Escalante, 2009)

Una vez recabada la información del análisis de las muestras de tejido de cada uno de los pacientes que cumplieron los criterios de selección y de acuerdo con los datos del cuestionario general de miopatías, cada una de las características clínicas se describen por cada una de las miopatías detectadas por inmunohistoquímica, y se comparan entre los grupos de acuerdo con la deficiencia de disferlina o distrofina.

### **Aspectos éticos**

Con fundamento en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, descrito en el Título segundo. De los aspectos éticos de la investigación en seres humanos, Artículo 17, se considera que es un estudio sin riesgo. Ya que solamente se utilizó la información clínica del cuestionario general de miopatía y se analizaron biopsias musculares enviadas de los hospitales donde habitualmente son tratados estos pacientes. En nuestro estudio guardamos la debida confidencialidad de la información obtenida, ya que los datos personales de los pacientes se codificaron. Los resultados del estudio inmunohistoquímico se enviaron a los médicos que derivaron las muestras.

Este estudio forma parte del proyecto de investigación titulado: "Optimización del diagnóstico de las Distrofias Musculares más comunes por Western Blot Múltiple" que fue registrado ante la Comisión Nacional de Investigación, con el número **2003-718-0024**.

### **Factibilidad**

En la UIMGH aplicamos pruebas de inmunofluorescencia para identificar los casos de DM. Todos los participantes tienen experiencia en las técnicas empleadas y se cuenta con el material básico necesario.

Los pacientes fueron provenientes de diferentes unidades del IMSS y del servicio de Distrofia Muscular del Instituto Nacional de Rehabilitación así como de otras instituciones, siempre y cuando cubrieran los criterios de inclusión del presente estudio.

Los recursos financieros fueron asignados del Protocolo evaluado y autorizado por la Comisión Nacional de Investigación Científica con **número de registro 2003-718-0024**.

### **Análisis estadístico**

Se presentan los datos de manera cualitativa debido al número de sujetos incluidos.

Se realizó correlación de variables ordinales con prueba Tau de Kendal tipo B. Valor de  $P < 0.05$  fue significativa.

### **Cronograma de actividades**

Noviembre Diciembre 2007	Enero 2008	Febrero a Noviembre 2008	Diciembre 2008	Enero 2008
Búsqueda y revisión de bibliografía.	Redacción del protocolo de Investigación	Análisis de casos de pacientes, recolección de datos, análisis de muestras.	Compilación de datos, y resultados	Escritura de la Tesis

## RESULTADOS

Durante el periodo comprendido desde febrero hasta noviembre de 2008 se analizaron 38 casos con sospecha de distrofia muscular, los cuales fueron referidos de ocho centros hospitalarios de tercer nivel de atención de la ciudad de México; la edad varió desde los cuatro meses hasta 56 años, correspondiendo 12 individuos al sexo femenino y 26 al masculino.

De los 38 casos, 26 fueron eliminados del presente estudio ya que 14 muestras presentaron resultados normales para las proteínas estudiadas (distrofina y disferlina), por lo que se descartó Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), Distrofia Muscular de Becker (DMB) o Distrofia de Cinturas tipo 2B (LGMD2B). En nueve pacientes su biopsia no fue posible analizarla ya que no se identificaron fibras musculares y, en otros tres casos, que también fueron excluidos, se trató de pacientes que fueron referidos con diagnóstico inicial de DM congénita (dos con sospecha de deficiencia de Merosina). Estos pacientes presentaron deficiencias en las proteínas distrofina y disferlina, pero debido a que no se realizó análisis inmunohistoquímico con el anticuerpo específico, aunque clínicamente correspondieron al grupo de las DM congénitas, su resultado no pudo ser diferenciado de Distrofia Muscular Congénita 1A (MDC1A) o de DMD/DMB. De esta forma el estudio se integró con 12 casos que resultaron con deficiencia en las proteínas Distrofina, Disferlina o de ambas.

### *Características de los 12 pacientes con diagnóstico de distrofia muscular*

Como se muestra en la Tabla 2, el rango de edad de los 12 pacientes del estudio estuvieron comprendidas dentro de los 3 a los 37 años; diez fueron masculinos y dos femeninos. Hubo siete diferentes diagnósticos clínicos antes de analizar las muestras de músculo; los más frecuentes fueron probable DM (n=4) y DMD (n=3). Mientras que después del estudio bioquímico, se identificaron seis pacientes con DMD, cuatro con LGMD2B y dos con DMB. Conviene destacar que solamente en cuatro pacientes (casos 6, 7, 10 y 12) el diagnóstico de sospecha desde el punto de vista clínico, correspondió con el diagnóstico final.

Por otro lado, como se describe en la Tabla 3, con respecto a los antecedentes perinatales, sólo en dos pacientes se detectó alguno de importancia: un paciente con

oligohidramnios (caso 2) y el otro con hipomotilidad fetal (caso 8). En ningún caso de reportó consanguinidad, antecedentes familiares de miopatías o de hipotonía al nacimiento.

Desde el punto de vista de las características clínicas, cuatro pacientes (casos 1, 2, 5 y 7) presentaron retraso en el desarrollo motor, de los cuales, tres (casos 1, 2 y 7) tienen un cuadro clínico grave para DMD y uno (caso 5) con cuadro clínico grave para LGMD2B. Con respecto a los signos patológicos de los miembros inferiores, prácticamente todos los pacientes presentaron los ocho signos evaluados, con excepción de caídas fáciles que no se presentó en los casos 4, 5, 6 y 9. En contraste, los signos patológicos en los miembros superiores fueron menos frecuentes y hubo tres pacientes (casos 4, 8 y 9) que no tuvieron alguno de los considerados; en este grupo, el problema más frecuente fue la dificultad para cargar pesos (n=8), seguido de la dificultad para levantar los brazos (n=7), mientras que solamente dos pacientes (caso 3 y 6) presentaron con debilidad del cuello.

También los signos anormales de cabeza, cuello y tórax fueron poco frecuentes; en cinco casos no hubo registro de alguno de los signos (caso 6, 7, 8, 10 y 11), pero el caso 9 con deficiencia de distrofina y disferlina presentó cuatro de los siete evaluados. En los siete pacientes que presentaron alguno de estos signos, los principales fueron la disnea y las alteraciones de los movimientos faciales. Conviene mencionar que aún cuando no está descrito en la Tabla 3, en ningún caso se registró alteración de los movimientos oculares, ptosis o disartria.

Por último, del grupo denominado como signos clínicos a la exploración física, cuatro pacientes (caso 3, 10, 11 y 12) presentaron mialgias, calambres, atrofia muscular, miotonía, disminución de los reflejos tendinosos y repuesta plantar disminuida. El resto tuvo de uno a cuatro de estos signos presentes. Además que en 11/12 pacientes que se realizó EMG, en todos el resultado fue presentar un perfil miopático; con respecto a CPK los 12 pacientes tuvieron cifras anormales, siendo hasta más de 10 veces mayores a lo normal (>200 UI/l).

#### *Hallazgos bioquímicos (inmunofluorescencia) de distrofina y disferlina*

En la Tabla 2 y en las fotografías 1 a la 12 se muestran los hallazgos de las alteraciones detectadas en los 12 pacientes desde el punto de vista bioquímico sobre la expresión de distrofina y disferlina. Dos pacientes tuvieron deficiencia única de distrofina (caso 1 y 2), cuatro

con deficiencia exclusiva de disferlina (casos del 3 a 6) y seis (casos del 7 al 12) con deficiencia primaria de distrofina y secundaria de disferlina.

Se detectaron alteraciones tanto en la porción carboxilo, como en la porción amino de disferlina o distrofina. En cuanto a los ocho casos con alteración de distrofina hubo deficiencia de las dos porciones, con excepción del caso 12 en el cual no hubo alteración de la porción amino. Destaca el caso 7 ya que no hubo expresión de la proteína en ninguna de sus porciones, así como el 9 y 10 en los cuales la expresión fue muy deficiente.

En cuanto a disferlina, en los cuatro pacientes con LGMD2B hubo deficiencia moderada en la porción carboxilo; mientras que en dos hubo además deficiencia moderada de la porción amino (caso 4 y 6).

En los seis casos donde se asoció la deficiencia de distrofina con disferlina, también hubo variación en la expresión de las porciones carboxilo o amino. La expresión de la porción carboxilo de distrofina fue nula en el caso 7; muy deficiente en los casos 9 y 10, y en los tres restantes deficiencia moderada. Con respecto a la porción amino, expresión nula en el caso 7, tres casos con expresión muy deficiente (caso 9, 10 y 11) y uno con deficiencia moderada (caso 8) y uno con expresión normal (caso 12). Para disferlina, en un caso la expresión de la porción carboxilo fue nula (caso 7), un caso con expresión muy deficiente (caso 10) y los cuatro restantes, con expresión moderada. Con respecto a la porción amino, dos casos con expresión muy deficiente (casos 7 y 11), y los otros cuatro con deficiencia moderada.

**Tabla 2. DESCRIPCIÓN DE LOS CASOS DE Distrofia Muscular con el análisis de Distrofina y Disferlina por medio de Inmunofluorescencia.**

CASO	EDAD (años)	SEXO	DIAGNÓSTICO DE ENVÍO	INMUNOFENOTIPO (Inmunofluorescencia)				CUADRO CLÍNICO +	DIAGNOSTICO FINAL
1	4	M	DM en estudio *	DISTROFINA	Dys2-carboxilo (++)	Dys3-amino (++)	H1-carboxilo (+++) H2-amino (+++)	GRAVE	DUCHENNE
2	7	M	Probable DM*	DISTROFINA	Dys2-carboxilo (++)	Dys3-amino (++)	H1-carboxilo (+++) H2-amino (+++)	GRAVE	DUCHENNE
3	6	M	Probable DM*	DISFERLINA	Dys2-carboxilo (+++)	Dys3-amino (+++)	H1-carboxilo (++) H2-amino (+++)	GRAVE	LGMD2B
4	9	M	Miopatía	DISFERLINA	Dys2-carboxilo (+++)	Dys3-amino (+++)	H1-carboxilo (++) H2-amino (++)	GRAVE	LGMD2B
5	16	F	Probable LGMD**	DISFERLINA	Dys2-carboxilo (+++)	Dys3-amino (+++)	H1-carboxilo (++) H2-amino (+++)	GRAVE	LGMD2B
6	22	F	Disferlinopatía	DISFERLINA	Dys2-carboxilo (+++)	Dys3-amino (+++)	H1-carboxilo (++) H2-amino (++)	GRAVE	LGMD2B
7	3	M	Duchenne	DYS/DYSF	Dys2-carboxilo (-)	Dys3-amino (-)	H1-carboxilo (-) H2-amino (+)	GRAVE	DUCHENNE
8	7	M	Duchenne	DYS/DYSF	Dys2-carboxilo (++)	Dys3-amino (++)	H1-carboxilo (++) H2-amino (++)	GRAVE	DUCHENNE
9	9	M	FEH***	DYS/DYSF	Dys2-carboxilo (+)	Dys3-amino (+)	H1-carboxilo (++) H2-amino (++)	GRAVE	DUCHENNE
10	9	M	Probable DMD****	DYS/DYSF	Dys2-carboxilo (+)	Dys3-amino (+)	H1-carboxilo (+) H2-amino (++)	GRAVE	DUCHENNE
11	23	M	Probable Disferlinopatía	DYS/DYSF	Dys2-carboxilo (++)	Dys3-amino (+)	H1-carboxilo (++) H2-amino (+)	LEVE	BECKER
12	37	M	Probable DM*	DYS/DYSF	Dys2-carboxilo (++)	Dys3-amino (+++)	H1-carboxilo (++) H2-amino (++)	LEVE	BECKER

\* DM (distrofia muscular)

\*\* LGMD (Distrofia de cinturas)

\*\*\*\* DMD (Distrofia muscular de Duchenne)

\*\*\* FEH (Distrofia Facio-Escapulo-Humeral)

DYS = Distrofina    DYSF = Disferlina

+ Cuadro clínico DMD/DMB Leve >12 años; Grave <4 años;

+ Cuadro clínico LGMD2B Leve >25 años; Grave <25 años.

*Características de los pacientes de acuerdo con el resultado del análisis de distrofina y disferlina.*

El diagnóstico final de acuerdo con el resultado obtenido de la inmunohistoquímica, lo definimos basándonos en las características clínicas y el inmunofenotipo. De esta forma se pudo clasificar el cuadro clínico de acuerdo con la edad de presentación; así, hubo seis pacientes con DMD con cuadro clínico grave, dos con DMB y cuadro clínico leve, y cuatro con diagnóstico de LGMD2B considerados con cuadro clínico grave (Tabla 2).

Al comparar las características clínicas de acuerdo con el tipo específico de deficiencia proteica observamos que hubo contrastes (Tabla 2): en los dos pacientes que tuvieron exclusivamente deficiencia de Distrofina (caso 1 y 2), a pesar de no haber diferencia desde el punto de vista de la expresión proteica, existen algunas diferencias clínicas. Por ejemplo, en comparación con el paciente de 7 años (caso 2) el de 4 años tiene disnea lo que refleja una mayor gravedad del cuadro clínico.

En los pacientes con deficiencia primaria de disferlina existe una diferencia notoria en el cuadro clínico, lo cual al parecer no está relacionada exclusivamente con el resultado de la inmunohistoquímica, ya que el paciente de menor edad (caso 3) con tan solo deficiencia moderada en la porción carboxilo, tiene un mayor involucramiento en todas las áreas evaluadas, mientras que los casos 4 y 6 tuvieron deficiencia moderada de la porción carboxilo y además deficiencia moderada de la porción amino, pero con un cuadro clínico con relativamente menor afectación en los miembros superiores, cabeza, cuello y tórax. También es de comentar que en estos dos últimos casos, el cuadro clínico de la paciente de 22 años (caso 6), tiene una evolución longitudinal mayor, en comparación al paciente de 9 años (caso 4), y sin notarse diferencias en cuanto al sexo.

En lo referente a los pacientes con deficiencia primaria de Distrofina y secundaria de Disferlina, encontramos:

El paciente de 3 años (caso 7) es el que no tiene expresión de distrofina y solo presenta expresión muy deficiente de la porción amino de la disferlina, por lo tanto es el que tiene mayor deficiencia de ambas proteínas, pero desde el punto de vista clínico, tomando en consideración los signos patológicos presentes al momento de la evaluación, su cuadro clínico es menos grave en comparación con el resto de los casos con deficiencia combinada

de ambas proteínas. En contraste, la expresión de las proteínas del caso 12 es moderadamente deficiente; sin embargo, en lo referente al cuadro clínico tiene un mayor espectro de afectación e involucramiento, pero hay que considerar que tiene 37 años de edad, lo que indica una evolución prolongada con mayor progresión del deterioro muscular.

En cuanto a los dos pacientes con 9 años (casos 9 y 10) los cuales tuvieron una expresión deficiente de ambas proteínas pero con resultado semejante, llama la atención que el comportamiento clínico es diferente. El caso 9 presenta mayor afección en cara, cuello y tórax que correspondería clínicamente a un cuadro franco de distrofia facio-escapulo-humeral, mientras que en el caso 10 la mayor afección se presentó en los signos de los miembros superiores, pero en conjunto, su comportamiento clínico sería de una DMD.

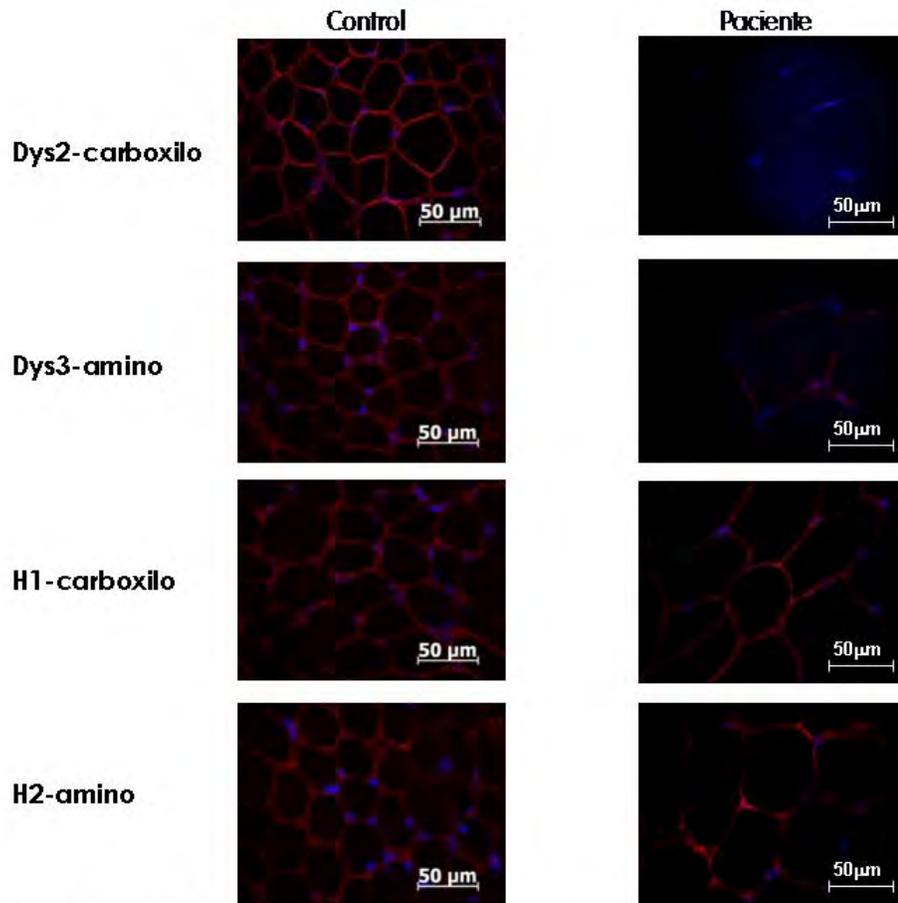
Finalmente, al comparar el cuadro clínico de los dos casos de deficiencia única de distrofina (caso 1 y 2) con los seis de la deficiencia de distrofina y disferlina, se identificó que se presenta a edades más tempranas y con un involucramiento clínico más amplio, incluso al comparar con los dos pacientes (caso 7 y 8) con edades similares.

La correlación estadística de datos entre: la severidad del cuadro clínico leve y grave, con la deficiencia única de distrofina y la deficiencia primaria de distrofina más la deficiencia secundaria de disferlina, tuvimos como resultado  $\tau = -.333$ ,  $p = 0.15$ .

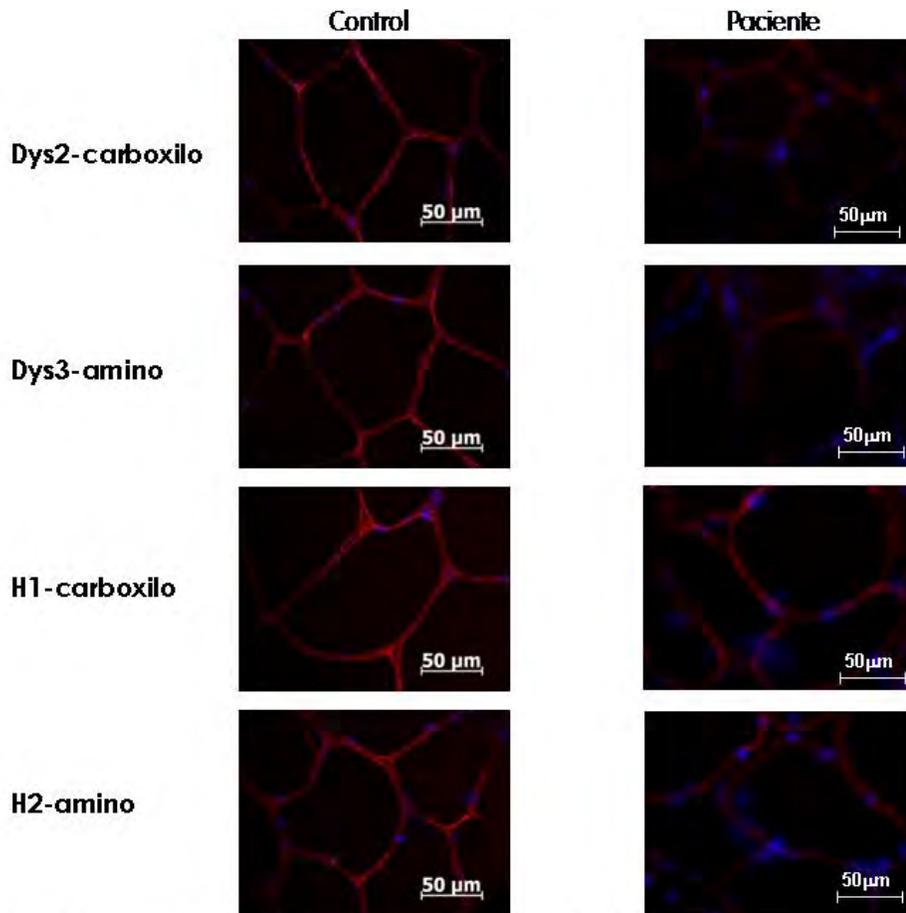
**Tabla 3.** COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON DISTROFIA MUSCULAR ACUERDO CON LA DEFICIENCIA DE DISFERLINA O DISTRIFINA.

DATOS CLINICOS	Distrofina		Disferlina				Distrofina/Disferlina						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Edad	4a	7a	6a	9a	16a	22a	3a	7a	9a	9a	23a	37a	
Antecedentes Perinatales Patológicos	ND	*	ND	ND	ND	ND	ND	*	ND	ND	ND	ND	
Desarrollo Psicomotor Retrasado	*	*			*		*						
SIGNOS CLÍNICOS MIEMBROS INFERIORES	Dificultad para subir escaleras.	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
	Dificultad para levantarse de una silla.	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
	Dificultad para levantarse de decúbito dorsal.	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
	Maniobra de Gowers.	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
	Dificultad para pararse con las puntas de los pies.	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
	Caídas fáciles	*	*	*				*	*		*	*	*
	Debilidad muscular	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Limitación del perímetro de la marcha.	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
SIGNOS CLÍNICOS MIEMBROS SUPERIORES	Dificultad para levantar los brazos.	*	*	*	*	*					*	*	
	Dificultad para cargar pesos con los brazos.	*	*	*	*	*				*	*	*	
	Dificultad para la flexión de los brazos		*	*		*					*	*	
	Dificultad para la extensión de los brazos.	*	*	*						*		*	
	Dificultad para cerrar o abrir manos.			*						*		*	
	Dificultad para abrir frascos o botellas.	*					*			*		*	
Debilidad en cuello.			*			*							
SIGNOS CLÍNICOS DE CABEZA, CUELLO Y TÓRAX	Diplopiá.							*					
	Alteración de movimientos faciales.	*	*		*				*				
	Disfagia.		*						*				
	Disnea.	*		*	*				*			*	
SIGNOS CLÍNICOS A LA EXPLORACIÓN FÍSICA	Mialgias.		*	*	*	*		*		*	*	*	
	Calambres.	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	
	Atrofia muscular.	*	*	*	*	*			*	*	*	*	
	Miotonía.			*	*					*		*	
	Disminución de reflejos osteotendinosos.	*	*	*	*		*	*		*	*	*	
	Respuesta plantar disminuida.			*		*	*			*	*	*	
ESTUDIOS DE GABINETE	Patrón de electromiografía.	ND	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
	Niveles de Creatina Fosfoquinasa (CPK).	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Diagnóstico final	Duchenne	Duchenne	LGMD2B	LGMD2B	LGMD2B	LGMD2B	Duchenne	Duchenne	Duchenne	Duchenne	Becker	Becker	

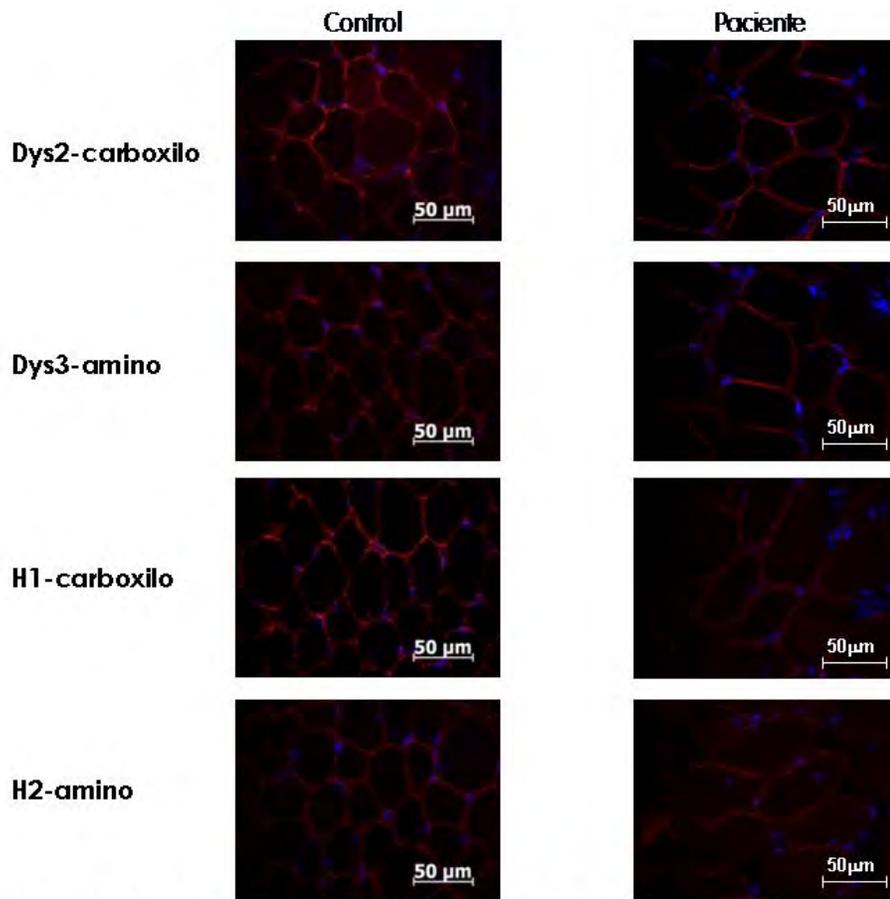
\* = signo presente      espacio en blanco= signo ausente      ND = signo no descrito      a = años



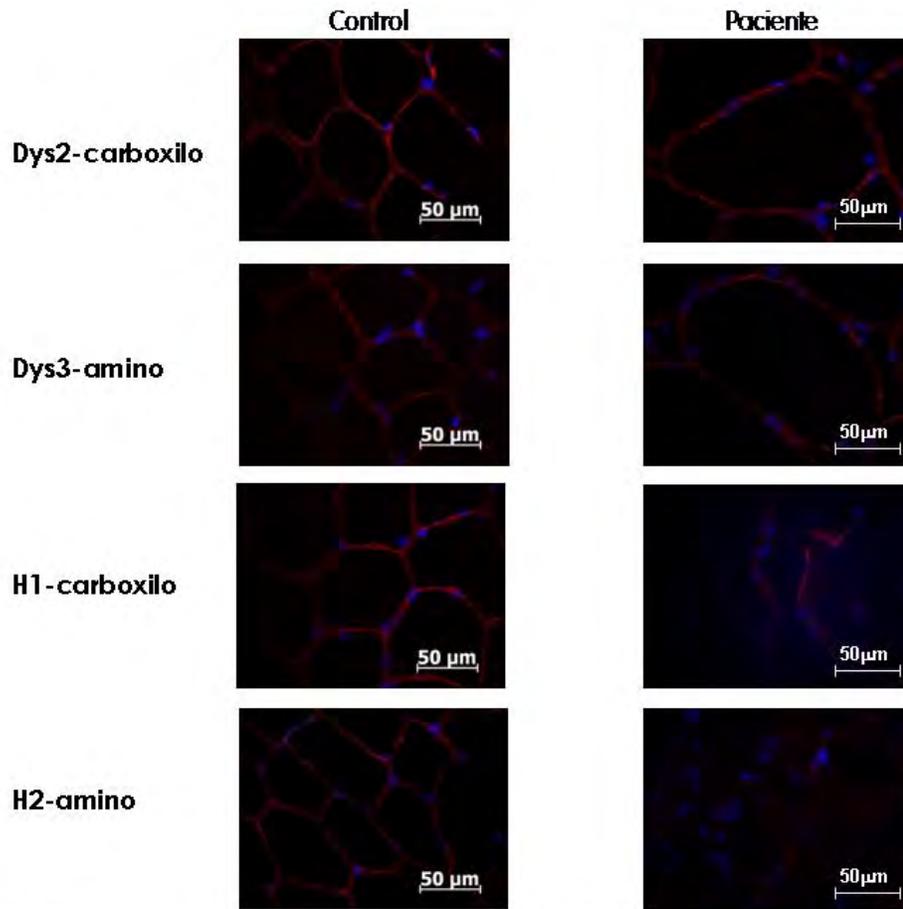
**Fotografía 1.** Estudio de inmunofluorescencia del caso 1, en distrofina se observa deficiencia moderada en la porción Dys2-carboxilo (++) y porción Dys3-amino (++); disferlina con fluorescencia normal en la porción H1-carboxilo (+++) y porción H2-amino (+++).



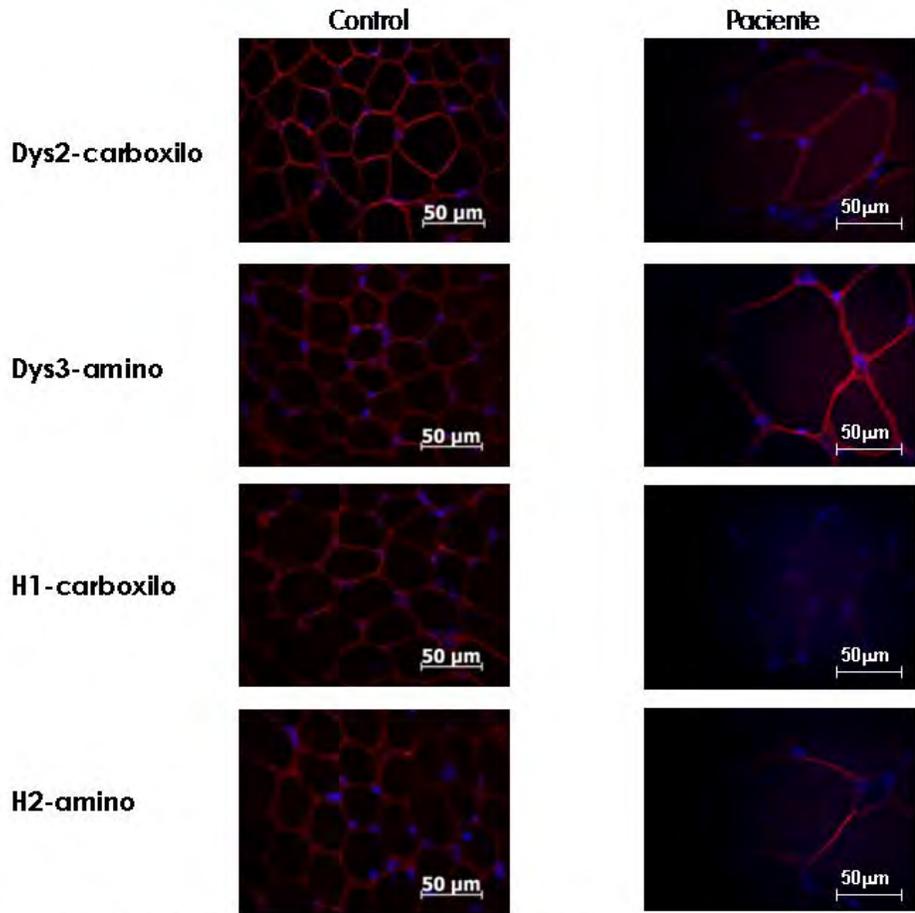
**Fotografía 2.** Estudio de inmunofluorescencia del caso 2, en distrofina la inmunofluorescencia se observa con deficiencia moderada en la porción Dys2-carboxilo (++) y Dys3-amino (++); en disferlina la fluorescencia es normal en las porciones H1-carboxilo (+++) y H2-amino (+++).



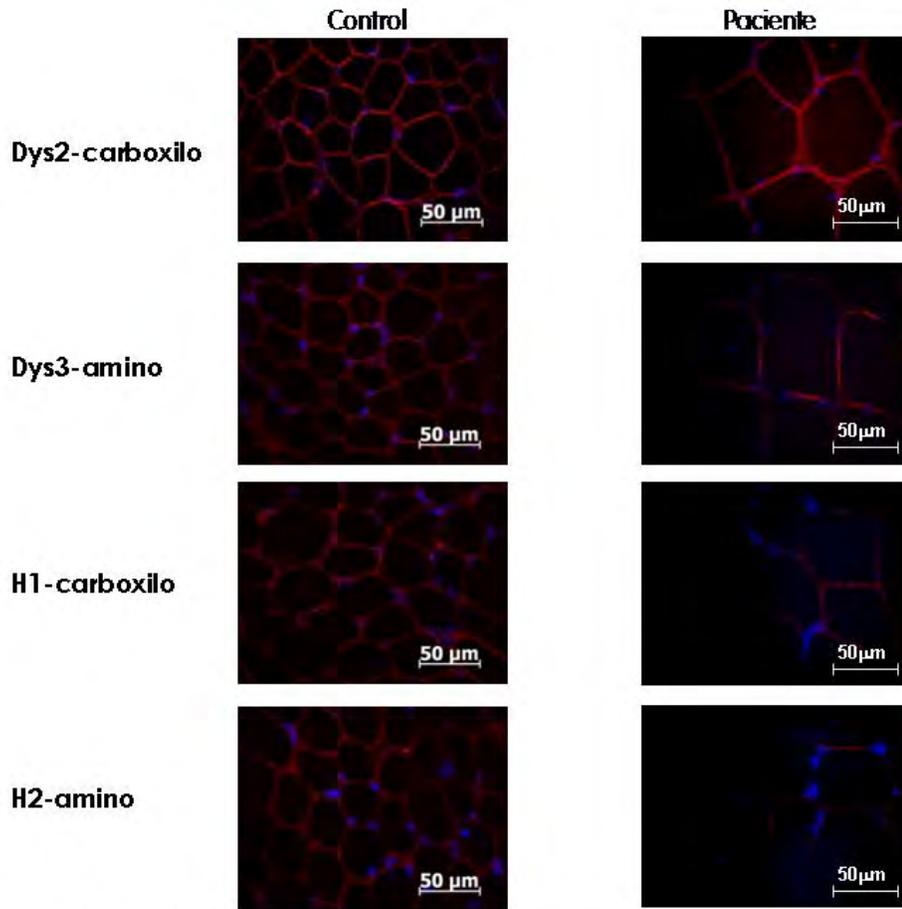
**Fotografía 3.** Estudio de inmunofluorescencia del caso 3, en distrofina la inmunofluorescencia se observa normal en la porción Dys2-carboxilo (+++) y la porción Dys3-amino (+++); en disferlina la fluorescencia con deficiencia moderada en la porción H1-carboxilo (++) y normal en la porción H2-amino (+++).



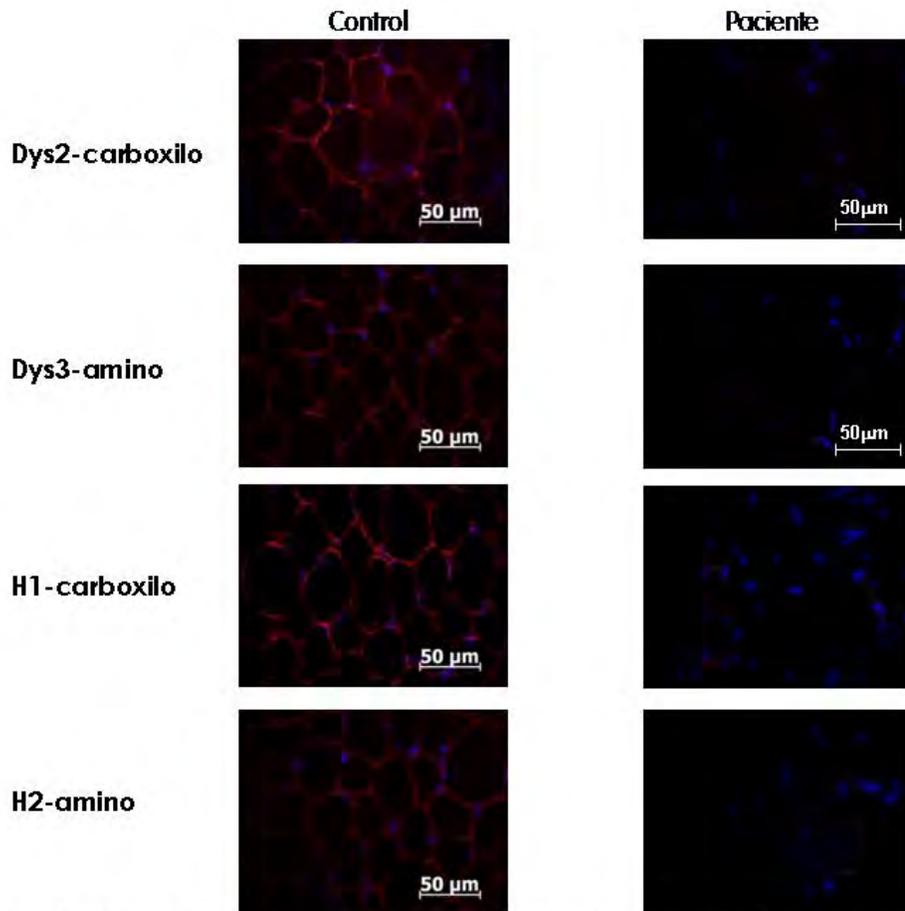
**Fotografía 4.** Estudio de inmunofluorescencia del caso 4, en distrofina la fluorescencia es normal en la porción Dys2-carboxilo (+++) y la porción Dys3-amino (+++); en disferlina la fluorescencia con deficiencia moderada en la porción H1-carboxilo (++) y la porción H2-amino (++)



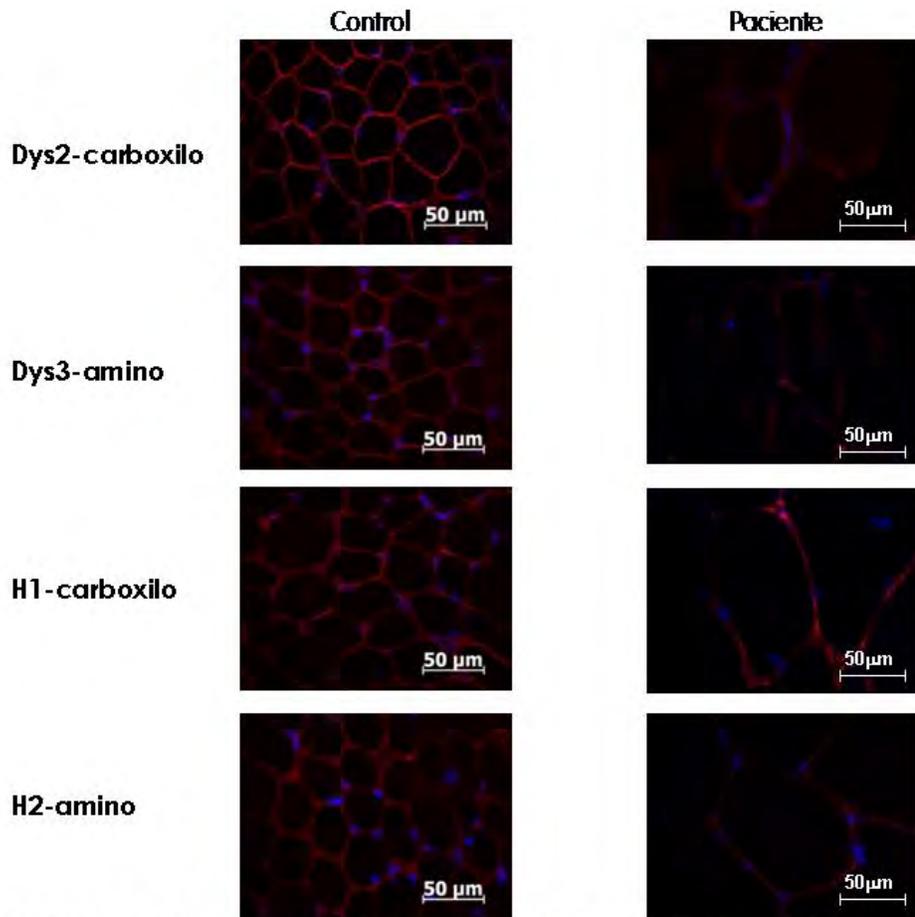
**Fotografía 5.** Estudio de inmunofluorescencia del caso 5, en distrofina la fluorescencia se observa normal en la porción Dys2-carboxilo (+++) y porción Dys3-amino (+++); en disferlina la fluorescencia con deficiencia moderada en la porción H1-carboxilo (++) y fluorescencia normal en la porción H2-amino (+++).



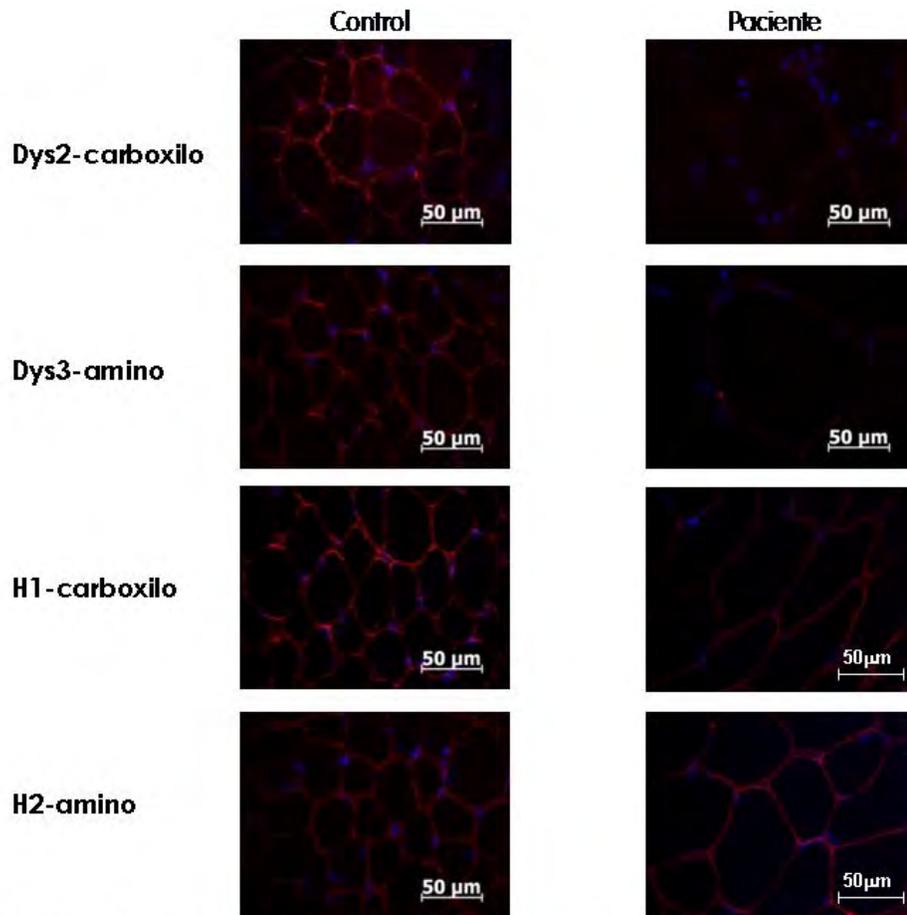
**Fotografía 6 Estudio de** inmunofluorescencia del caso 6, en distrofina se observa la fluorescencia normal en la porción Dys2-carboxilo (+++) y la porción Dys3-amino (+++); en disferlina la fluorescencia con deficiencia moderada en la porción H1-carboxilo (++) y porción H2-amino (++)



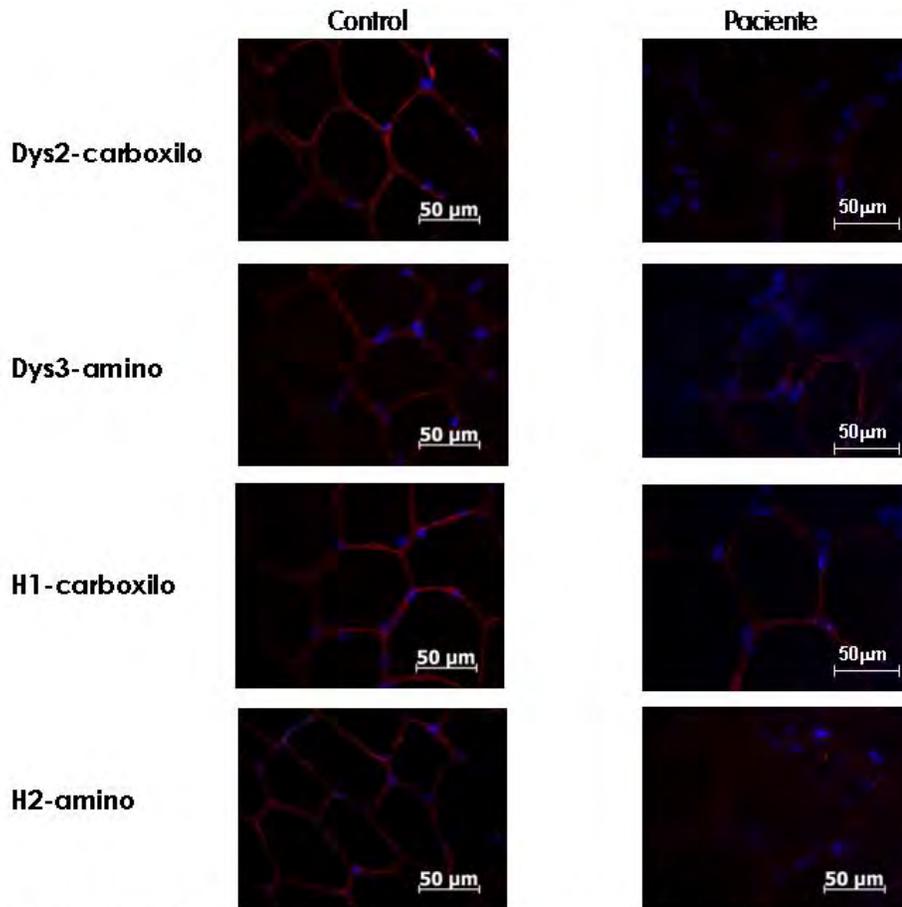
**Fotografía 7.** Estudio de inmunofluorescencia del caso 7, en distrofina se observa la fluorescencia negativa en las porciones Dys2-carboxilo (-) y Dys3-amino (-); en disferlina la fluorescencia es negativa en la porción H1-carboxilo (-) y fluorescencia muy deficiente en la porción H2-amino (+).



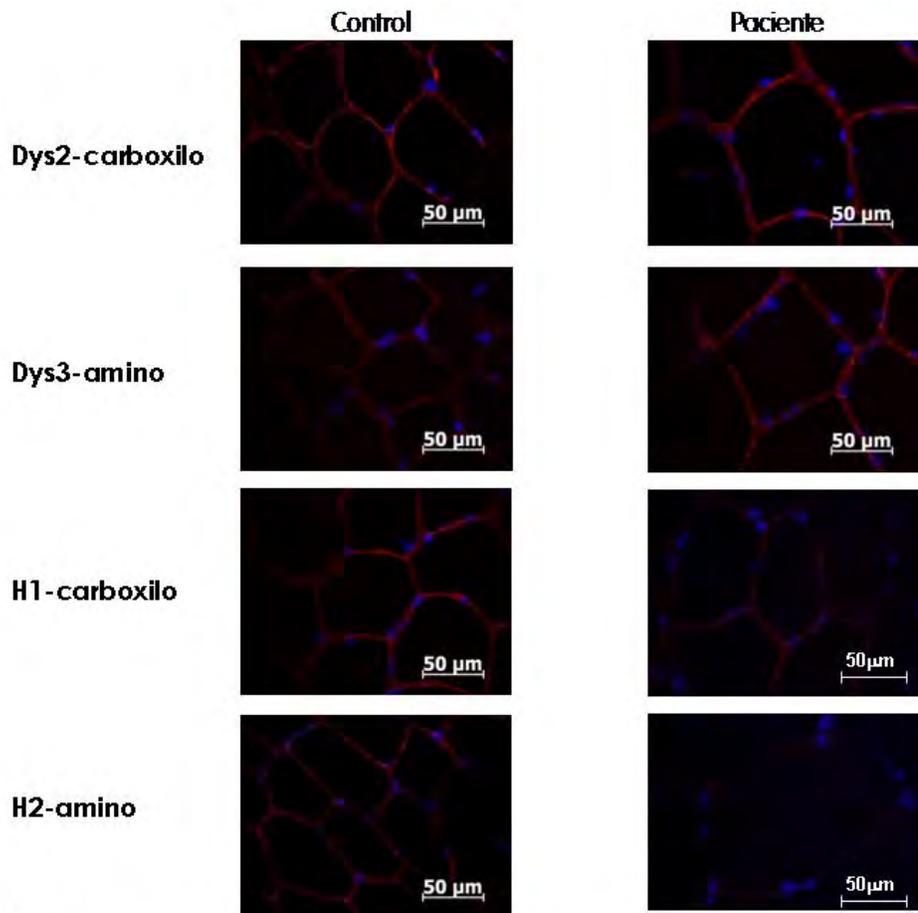
**Fotografía 8.** Estudio de inmunofluorescencia del caso 8, en distrofina se observa la fluorescencia con deficiencia moderada en las porciones Dys2-carboxilo (++) y Dys3-amino (++); en disferlina la fluorescencia se observa con deficiencia moderada en las porciones H1-carboxilo(++) y H2-amino (++)



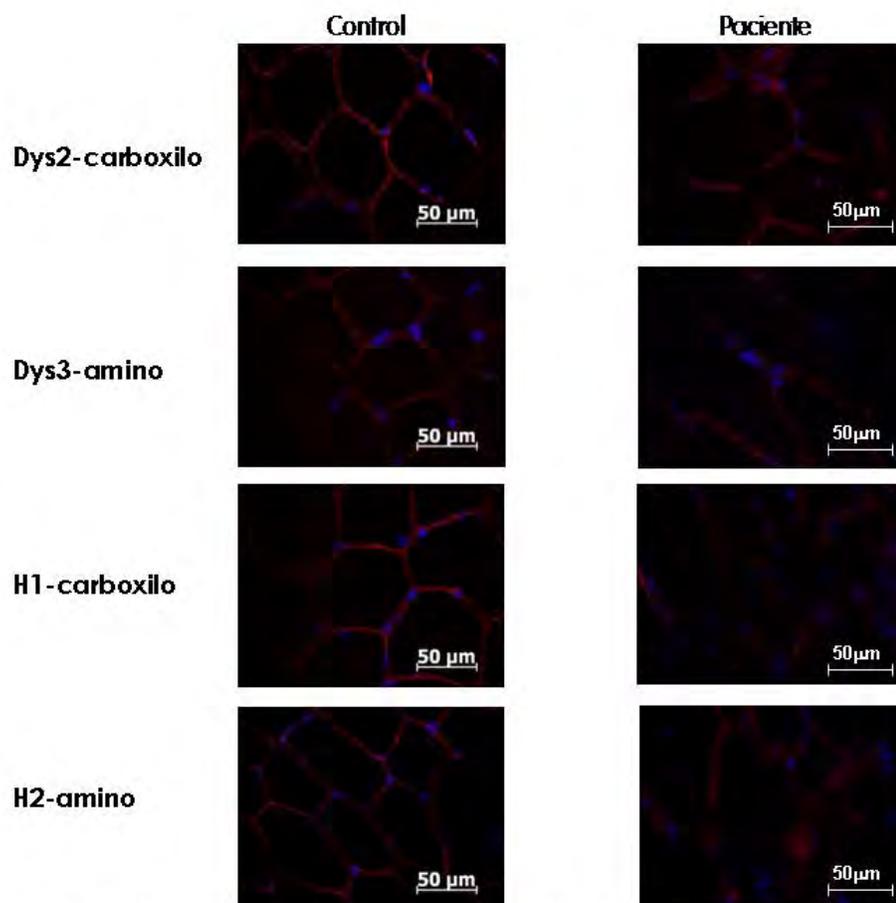
**Fotografía 9.** Estudio de inmunofluorescencia del caso 9, en distrofina se observa la fluorescencia muy deficiente en las porciones Dys2-carboxilo (+), y Dys3-amino (+); en disferlina la fluorescencia con deficiencia moderada en las porciones H1-carboxilo (++) y H2-amino (++)



**Fotografía 10.** Estudio de inmunofluorescencia del caso 10, se observa distrofina con fluorescencia muy deficiente en la porción Dys2-carboxilo (+) y muy deficiente para la porción Dys3-amino (+); disferlina con fluorescencia muy deficiente para la porción H1-carboxilo (+) y moderada para la porción H2-amino (++)



**Fotografía 11.** Estudio de inmunofluorescencia del caso 11, se observa distrofina con deficiencia moderada para la porción Dys2-carboxilo (++) y Dys3-amino (++); disferlina con deficiencia moderada para la porción H1-carboxilo (++) y muy deficiente para la porción H2-amino (+).



**Fotografía 12.** Estudio de inmunofluorescencia del caso 12, en distrofina se observa fluorescencia con deficiencia moderada en la porción Dys2-amino (++) y normal en la porción Dys3-carboxilo (+++); en disferlina la fluorescencia con deficiencia moderada en la porción H1-amino y la porción H2-amino (++)

## **DISCUSIÓN**

El diagnóstico de las distrofias musculares es complejo debido a diferentes factores, entre los que destaca su comportamiento clínico debido a que se sobreponen signos entre una y otra entidad; así como la baja especificidad de los estudios de laboratorio y gabinete, que no permite diferenciarlas entre ellas; además de que se requiere de un entrenamiento especializado para poder identificar, estudiar y asesorar a pacientes con padecimientos musculares.

Dada su especificidad, el estudio de inmunohistoquímica ha demostrado ser una herramienta sumamente útil en la determinación de la etiología de las DM (Norwood *et al*, 2007; Vainzof y Zatz, 2003; Sewry, 2000). Ello ha quedado demostrado nuevamente en el presente estudio en el que el análisis de 12 pacientes con DM (tabla 2) este método nos permitió determinar la etiología y diagnóstico definitivo en todos los casos, y en algunos de ellos se estableció un diagnóstico que no había sido considerado cuando se enviaron las muestras a esta unidad; lo cual resalta la importancia de tener disponible esta herramienta en lugares de referencia donde se atienden pacientes con problemas neuromusculares.

En estudios previos, tanto de nuestro grupo de trabajo, como de otros autores se han descrito las características moleculares y bioquímicas de distrofina y disferlina, pero hasta el momento no se ha podido establecer claramente una relación genotipo-fenotipo (Norwood, 2007; Moore *et al*, 2006; Vainzof y Zatz, 2003). Por esta razón, el objetivo de este estudio fue determinar el comportamiento clínico en los pacientes con deficiencia de distrofina, con deficiencia de disferlina o con deficiencia de ambas, así como definir si existe correlación entre la expresión deficiente de estas y el comportamiento clínico de cada individuo.

A la luz de los hallazgos en los 12 pacientes estudiados se evidencia el hecho de que existe una relación entre el grado de expresión proteica y el cuadro clínico. Al respecto los pacientes con diagnóstico de DMD/DMB, identificados con una deficiencia combinada de distrofina y disferlina, presentan un cuadro clínico de inicio temprano y progresión más rápida con mucho mayor involucramiento muscular (tabla 3), en comparación con aquellos que tienen una deficiencia proteica única (distrofina o disferlina)

Al verificar los resultados de la inmunofluorescencia se observaron dos casos contrastantes que son, el caso 7 (3 años) y el caso 12 (37 años). Mientras que en el primero las manifestaciones con cuadro clínico ya descrito como severo, se detectó una ausencia total de distrofina y disferlina, en el segundo caso, aún cuando también tuvo deficiencia de ambas proteínas el cuadro clínico fue leve (ya que inició después de los 12 años), pero con manifestaciones más floridas del cuadro clínico. Esta observación implica que, en los pacientes con DMD/DMB a mayor edad existe mayor daño muscular (Durbeej y Campbell, 2002; Muntoni *et al*, 2003; Kanagawa y Toda, 2006; Deconinck y Bernard, 2007), resulta insuficiente como criterio de clasificación de la gravedad de la DM, pues en ambos casos se observa un deterioro muscular que compromete su capacidad muscular motora, y en consecuencia su calidad de vida. Además de que el grado de expresión proteica está directamente relacionada con la gravedad del cuadro clínico, por lo que los individuos con una menor expresión manifiestan un cuadro clínico más severo y con una edad de presentación más temprana.

Desde el punto de vista de la expresión proteica, se ha observado que existe una relación entre el dominio mutado dentro de la región codificante del gen DMD, y el cuadro clínico. Específicamente se ha observado en diversos estudios, que los

pacientes con DMD con cuadros más graves presentan mutaciones en el extremo carboxilo, región que interactúa con el complejo DAPC (Dystrophin-Associated Protein Complex) en el sarcolema y que resulta fundamental para su estabilidad. Por el contrario, aquellos pacientes en los que la distrofina se encuentra mutada en la porción amino pero conserva el extremo carboxilo suelen corresponder a casos de DMB o en general a cuadro con presentación clínica menos severa de presentación tardía (Vainzof y Zatz, 2003; Glover y Brown, 2007). Esto es algo que también observamos en nuestros pacientes con DMD en los que se detecta una menor expresión a través de la porción carboxilo comparado con la porción amino, y que presentan una mayor severidad del cuadro clínico y de igual forma en nuestros pacientes con LGMD2B, lo que coincide con la observación del grupo de Vainzof.

En cuanto a la mayor gravedad expresada por la doble deficiencia, observamos que en realidad resulta determinante el tipo de alteración de la distrofina, por lo que la severidad se determina en etapas tempranas y se agrava con la edad, tal y como se ha descrito anteriormente en los pacientes con DMD, quienes sufren un proceso de degeneración progresiva e irreversible (Davies y Nowak, 2006; Guglieri *et al*, 2005; Durbeej y Campbell, 2002; Muntoni *et al*, 2003; Kanagawa y Toda, 2006)). Es así que la deficiencia de disferlina resulta ser una característica secundaria en algunos pacientes; es decir, no se trata de una segunda mutación en el mismo individuo, sino que la expresión de la proteína se pierde a la par de otros componentes del sarcolema y de la membrana, ocasionada por la desestabilidad conferida por la deficiencia de distrofina (Kanagawa y Toda, 2006; Batchelor y Winder, 2006; Deconinck y Dan, 2007; Petrof, 2002; Ehmsen *et al*, 2002). Con base en lo anterior podemos postular, en relación a la deficiencia secundaria de

disferlina, que el daño muscular conduce a degeneración y necrosis del tejido (fibra muscular), por lo tanto no puede reparar lo que ya no existe.

Así confirmamos que el sarcolema como unidad estructural de la fibra muscular, es un complejo proteico multimérico cuya estructura se altera a raíz de la ausencia o deficiencia de una de las moléculas que lo integran, lo cual conduce a la desestabilización de la membrana plasmática, la expresión proteica o función de otras proteínas y enzimas y promueve el desarrollo de la distrofia muscular, como ya ha descrito en sus trabajos Norwood y cols. (2007), Moore y cols. (2006), Vainzof y cols. (2003), Guglieri y cols. (2005), así como Davies y Nowak (2006). Aún establecida esta correlación que explica la generalidad de los cuadros clínicos analizados, existen diferencias entre los individuos que se pueden explicar con base en los mecanismos en los que participan genes compensadores, modificaciones postraduccionales, etc. y que hasta el momento no están dilucidados del todo (Grounds, 2008).

Con el número de individuos del estudio no fue posible establecer una correlación estadística. Por lo tanto es importante ampliar los estudios de este tipo, así como el estudio de los mecanismos de daño y reparación de la fibra muscular, lo que ayudara a comprender mejor su funcionamiento y establecer medidas terapéuticas para el manejo de estos pacientes.

## CONCLUSIONES

- En los pacientes con DMD/DMB hay una relación del grado de deficiencia de distrofina con la severidad de la enfermedad, esto se explica por una deficiencia más notable de la porción carboxilo.
- La expresión alterada de una proteína del sarcolema, conduce a la alteración de otras moléculas y desestabilización de la membrana plasmática, lo que explicaría la deficiencia secundaria de disferlina.
- La deficiencia primaria de distrofina asociada a la deficiencia secundaria de disferlina, sí se asocia a un cuadro clínico más grave, esto porque hay una presentación a edades más tempranas, con un involucramiento motor importante.
- Clasificar el cuadro clínico de un paciente como grave o leve es insuficiente, ya que la severidad de las características clínicas no solo son resultado de la edad de inicio de signos y síntomas.
- Para clasificar clínicamente a un paciente de forma adecuada, es necesario considerar las características que son consecuencia del daño muscular como, la velocidad de progresión del daño que conduce a pérdida de la función muscular, los grupos musculares afectados, edad de inicio cada uno de los signos y síntomas, así como relacionarlo con las características bioquímicas de la expresión proteica.



## **BIBLIOGRAFIA**

Achanzar WE, Ward S. A nematode gene required for sperm vesicle fusion. *J Cell Sci.* 1997 May;110 ( Pt 9):1073-81.

Bashir R, Britton S, Strachan T, Keers S, Vafiadaki E, Lako M, Richard I, Marchand S, Bourg N, Argov Z, Sadeh M, Mahjneh I, Marconi G, Passos-Bueno MR, Moreira Ede S, Zatz M, Beckmann JS, Bushby K. A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet.* 1998 Sep; 20(1): 37-42.

Bansal D, Miyake K, Vogel SS, Groh S, Chen CC, Williamson R, McNeil PL, Campbell KP. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature.* 2003 May 8; 423(6936):168-72.

Batchelor CL, Winder SJ. Sparks, signals and shock absorbers: how dystrophin loss causes muscular dystrophy. *Trends Cell Biol.* 2006 Apr; 16(4):198-205.

Baumbach LL, Chamberlain JS, Ward PA, Farwell NJ, Caskey CT. Molecular and clinical correlations of deletions leading to Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Neurology.* 1989 Apr;39(4):465-74.

Bushby KM, Beckmann JS. The limb girdle muscular dystrophies: proposal for a new nomenclature. *Neuromuscul Disord.* 1995 Jul; 5 (4): 337-43.

Campbell KP. Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell.* 1995 Mar 10;80(5):675-9.

Coral-Vazquez R, Arenas D, Cisneros B, Peñaloza L, Salamanca F, Kofman S, Mercado R, Montañez C. Pattern of deletions of the dystrophin gene in Mexican Duchenne/Becker muscular dystrophy patients: the use of new designed primers for the analysis of the major deletion "hot spot" region. *Am J Med Genet.* 1997 Jun 13;70(3):240-6.

Dalkilic I, Kunkel LM. Muscular dystrophies: genes to pathogenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 2003 Jun;13(3):231-8.

Davis DB, Doherty KR, Delmonte AJ, McNally EM. Calcium-sensitive phospholipid binding properties of normal and mutant ferlin C2 domains. *J Biol Chem.* 2002 Jun 21;277(25):22883-8.

Davies KE, Nowak KJ. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Oct; 7 (10): 762-73.

Deconinck N, Dan B. Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatr Neurol.* 2007 Jan; 36(1):1-7.

Durbeej M, Campbell KP. Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models. *Curr Opin Genet Dev.* 2002 Jun;12(3):349-61.

Ehmsen J, Poon E, Davies K. The dystrophin-associated protein complex. *J Cell Sci.* 2002 Jul 15; 115(Pt 14):2801-3.

Emery AE. The muscular dystrophies. *Lancet.* 2002 Feb 23;359(9307):687-95.

Ervasti JM, Campbell KP. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol.* 1993 Aug;122(4):809-23.

Escalante Bautista Llasnely Deyanira. Tesis para obtener el título de Biólogo: Análisis por inmunodetección de ocho proteínas asociadas a distrofia muscular en pacientes diagnosticados con esta enfermedad. Facultad de estudios superiores Iztalaca, UNAM. 2009

Ettinger AJ, Feng G, Sanes JR. Epsilon-sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutate in limb-girdle muscular dystrophy 2D. *J Biol Chem.* 1997 Dec 19;272(51):32534-8.

Glover L, Brown RH Jr. Dysferlin in membrane trafficking and patch repair. *Traffic*. 2007 Jul;8(7):785-94.

Grain L, Cortina-Borja M, Forfar C, Hilton-Jones D, Hopkin J, Burch M. Cardiac abnormalities and skeletal muscle weakness in carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophies and controls. *Neuromuscul Disord*. 2001 Mar;11(2):186-91.

Grounds MD. Two-tiered hypotheses for Duchenne muscular dystrophy. *Cell Mol Life Sci*. 2008 Jun;65(11):1621-5.

Guglieri M, Magri F, Comi GP. Molecular etiopathogenesis of limb girdle muscular and congenital muscular dystrophies: boundaries and contiguities. *Clin Chim Acta*. 2005 Nov;361(1-2):54-79.

Hack AA, Groh ME, McNally EM. Sarcoglycans in muscular dystrophy. *Microsc Res Tech*. 2000 Feb 1-15;48(3-4):167-80.

Hayashi YK. Membrane-repair machinery and muscular dystrophy. *Lancet*. 2003 Sep 13; 362 (9387): 843-4.

Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature*. 1992 Feb 20;355(6362):696-702.

Kanagawa M, Toda T. The genetic and molecular basis of muscular dystrophy: roles of cell-matrix linkage in the pathogenesis. *J Hum Genet*. 2006;51(11):915-26.

Kawabe K, Goto K, Nishino I, Angelini C, Hayashi YK. Dysferlin mutation analysis in a group of Italian patients with limb-girdle muscular dystrophy and Miyoshi myopathy. *Eur J Neurol*. 2004 Oct;11(10):657-61.

Lapidos KA, Kakkar R, McNally EM. The Dystrophin Glycoprotein Complex: Signaling Strength and Integrity for the Sarcolemma. *Circ Res*. 2004 Apr 30;94(8):1023-31.

Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C, Serrano C, Urtizbera JA, Hentati F, Hamida MB, Bohlega S, Culper EJ, Amato AA, Bossie K, Oeltjen J, Bejaoui K, McKenna-Yasek D, Hosler BA, Schurr E, Arahata K, de Jong PJ, Brown RH Jr. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet.* 1998 Sep; 20(1):31-6.

Lennon NJ, Kho A, Bacskai BJ, Perlmutter SL, Hyman BT, Brown RH Jr. Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. *J Biol Chem.* 2003 Dec 12; 278(50):50466-73.

Matsumura K, Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, Campbell KP. Association of dystrophin-related protein with dystrophin-associated proteins in mdx mouse muscle. *Nature.* 1992 Dec 10;360(6404):588-91.

Matsumura K, Saito F, Yamada H, Hase A, Sunada Y, Shimizu T. Sarcoglycan complex; a muscular supporter of dystroglycan-dystrophin interplay?. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 1999 Sep; 45(6):751-62.

Mehler MF. Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000 Apr;32(1):277-307.

Monaco AP, Bertelson CJ, Middlesworth W, Colletti CA, Aldridge J, Fischbeck KH, Bartlett R, Pericak-Vance MA, Roses AD, Kunkel LM. Detection of deletions spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA segment. *Nature.* 1985 Aug 29-Sep 4; 316(6031):842-5.

Moore SA, Shilling CJ, Westra S, Wall C, Wicklund MP, Stolle C, Brown CA, Michele DE, Piccolo F, Winder TL, Stence A, Barresi R, King N, King W, Florence J, Campbell KP, Fenichel GM, Stedman HH, Kissel JT, Griggs RC, Pandya S, Mathews KD, Pestronk A, Serrano C, Darvish D, Mendell JR. Limb-girdle muscular dystrophy in the United States. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006 Oct;65(10):995-1003.

Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.* 2003 Dec;2(12):731-40.

Navarro C, Teijeira S. Myopathology. New concept, New laboratory. *Neurologia*. 2004 May; 19(4):168-82.

Norwood F, de Visser M, Eymard B, Lochmüller H, Bushby K; EFNS Guideline Task Force. EFNS guideline on diagnosis and management of limb girdle muscular dystrophies. *Eur J Neurol*. 2007 Dec;14(12):1305-12.

Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). Johns Hopkins University, Baltimore, MD. World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>

Ozawa E, Mizuno Y, Hagiwara Y, Sasaoka T, Yoshida M. Molecular and cell biology of the sarcoglycan complex. *Muscle Nerve*. 2005 Nov;32(5):563-76.

Passos-Bueno MR, Vainzof M, Moreira ES, Zatz M. Seven autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies in the Brazilian population: from LGMD2A to LGMD2G. *Am J Med Genet*. 1999 Feb 19;82(5):392-8.

Petrof BJ. Molecular pathophysiology of myofiber injury in deficiencies of the dystrophin-glycoprotein complex. *Am J Phys Med Rehabil*. 2002 Nov;81(11 Suppl):S162-74.

Rando TA. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve*. 2001 Dec;24(12):1575-94.

Sewry CA. Immunocytochemical analysis of human muscular dystrophy. *Microsc Res Tech*. 2000 Feb 1-15;48(3-4):142-54.

Thompson MW, Ray PN, Belfall B, Duff C, Logan C, Oss I, Worton RG. Linkage analysis of polymorphisms within the DNA fragment XJ cloned from the breakpoint of an (X;21) translocation associated with X linked muscular dystrophy. *J Med Genet*. 1986 Dec;23(6):548-55.

Vainzof M, Zatz M. Protein defects in neuromuscular diseases. *Braz J Med Biol Res.* 2003 May;36(5):543-55.

Vainzof M, Passos-Bueno MR, Pavanello RC, Marie SK, Oliveira AS, Zatz M. Sarcoglycanopathies are responsible for 68% of severe autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in the Brazilian population. *J Neurol Sci.* 1999 Mar 15;164(1):44-9.

Walton JN, Nattrass FJ. On the classification, natural history and treatment of the myopathies. *Brain.* 1954;77(2):169-231.

Wheeler MT, Zarnegar S, McNally EM. Zeta-sarcoglycan, a novel component of the sarcoglycan complex, is reduced in muscular dystrophy *Hum Mol Genet.* 2002 Sep 1;11(18):2147-54.

Yoshida M, Ozawa E. Glycoprotein complex anchoring dystrophin to the sarcolemma. *J Biochem.* 1990 Nov;108(5):748-52.

Anexo 1

**HOJA DE CAPTACION DE DATOS**

Nombre: \_\_\_\_\_

No de cédula: \_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_

Domicilio: \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_

Edad de la madre: \_\_\_\_\_ Edad del Padre: \_\_\_\_\_

Consanguinidad: \_\_\_\_\_ Endogamia: \_\_\_\_\_

Otros familiares afectados: \_\_\_\_\_

Edad de inicio de primeros signos: \_\_\_\_\_

Afección inicial: cintura pélvica \_\_\_\_\_ cintura escapular \_\_\_\_\_

Tiempo de extensión de signos: \_\_\_\_\_

Con afección a: \_\_\_\_\_

Valoración cardiológica: \_\_\_\_\_

A la fecha del estudio: marcha independiente \_\_\_\_\_ uso silla de ruedas \_\_\_\_\_

Inicio y evolución similar a DMD: \_\_\_\_\_

Enzimas: \_\_\_\_\_

Datos de EMG: \_\_\_\_\_

Datos de biopsia muscular: \_\_\_\_\_

Estudio inmunohistoquímico: \_\_\_\_\_

Estudio genético molecular: \_\_\_\_\_

## Anexo 2

### CUESTIONARIO GENERAL DE MIOPATÍAS.

INSTITUCION.- \_\_\_\_\_  
 FECHA.- \_\_\_\_\_  
 REGISTRO.- \_\_\_\_\_

Nombre.- \_\_\_\_\_  
 Edad.- \_\_\_\_\_  
 Fecha de nacimiento.- \_\_\_\_\_  
 Lugar de origen.- \_\_\_\_\_  
 Lugar de residencia.- \_\_\_\_\_  
 Dirección.- \_\_\_\_\_  
 Teléfono.- \_\_\_\_\_

Origen de padres.- \_\_\_\_\_

Consanguinidad.- (no) (si) \_\_\_\_\_  
 Historia familiar.- (no) (si) especificar \_\_\_\_\_

Antecedentes perinatales.- (no) (si) especificar \_\_\_\_\_  
 Hipotonía al nacer.- (no) (si) evolución \_\_\_\_\_  
 Desarrollo psicomotor.- (normal) (anormal) Sostén cefálico \_\_\_\_\_

Edad de caminar \_\_\_\_\_  
 Hablar \_\_\_\_\_  
 Desempeño escolar.- (bueno) (regular) (malo) evolución: \_\_\_\_\_

Edad de inicio.- \_\_\_\_\_

Primer síntoma.- \_\_\_\_\_

Miembros inferiores (edad).- dificultad para subir escaleras \_\_\_\_\_

Levantarse de una silla \_\_\_\_\_  
 Levantarse del decúbito dorsal \_\_\_\_\_  
 Levantarse de cuclillas (Gowers) \_\_\_\_\_  
 Pararse de puntas \_\_\_\_\_  
 Caídas fáciles \_\_\_\_\_  
 Limitación del perímetro de marcha \_\_\_\_\_

Miembros superiores (edad).- dificultad para levantarlos \_\_\_\_\_

Cargar pesos \_\_\_\_\_  
 Doblarlos (flexión) \_\_\_\_\_  
 Extenderlos (extensión) \_\_\_\_\_  
 Cerrar o abrir manos \_\_\_\_\_  
 Abrir frascos o botellas \_\_\_\_\_

Debilidad de cuello.- (no) (si), inicio \_\_\_\_\_

Visión doble (diplopía).- (no) (si), inicio \_\_\_\_\_

Alteración de movimientos faciales.- (no) (si), inicio \_\_\_\_\_

Dificultad para deglutir (disfagia).- (no) (si), inicio \_\_\_\_\_

Dificultad para hablar (disartria) .- (no) (si), inicio \_\_\_\_\_

Falta de aire (disnea).- (no) (si), inicio \_\_\_\_\_

Pérdida de masa muscular (atrofia).- (no) (si), inicio y localización \_\_\_\_\_

Dolor muscular (mialgias).- (no) (si), inicio y localización \_\_\_\_\_

Mioglobinuria (orina roja asociada o no a mialgias).- (no) (si), inicio/describir \_\_\_\_\_

Calambres.- (no) (si), inicio/localización \_\_\_\_\_

Problema visual.- (no) (si), inicio \_\_\_\_\_

Problema auditivo.- (no) (si), inicio \_\_\_\_\_

Miotonia.- (no) (si), inicio/especificar \_\_\_\_\_

### EXPLORACIÓN.-

Debilidad (distribución y grado).- \_\_\_\_\_  
Reflejos.- (normales) (anormales), especificar \_\_\_\_\_  
Respuesta plantar.- (normal) (anormal), especificar \_\_\_\_\_  
Sensibilidad.- (normal) (anormal), especificar \_\_\_\_\_  
Movimientos oculares.- (normal) (anormal), especificar \_\_\_\_\_  
Ptosis.- (no) (unilateral) (bilateral)  
Afección facial.- (no) (si)  
Alteraciones ortopédicas.- (no) (si), especificar \_\_\_\_\_  
Otros hallazgos.- \_\_\_\_\_

EMG.- (no realizada) (normal) (Miopática) (Neuropática)  
VCN.- (no realizadas) (normales) (anormales)  
CPK.- (no realizada) (normal) (anormal), \_\_\_\_\_

Biopsia Muscular (no realizada) (normal) (anormal) Fecha \_\_\_\_\_  
Músculo \_\_\_\_\_  
Institución \_\_\_\_\_  
No. de biopsia \_\_\_\_\_

Tratamiento (no) (si), especificar \_\_\_\_\_

Rehabilitación.- (no) (si) \_\_\_\_\_

Primer servicio que atendió al paciente.- \_\_\_\_\_

Árbol genealógico: