

BASES MOLECULARS DE LES DISTRÒFIES MUSCULARS PROGRESSIVES

PIA GALLANO, ADRIANA LASA, CARLES DE DIEGO, ORLAND DÍEZ I MONTSERRAT BAIGET

Servei de Genètica. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

INTRODUCCIÓ

Les distròfies musculars progressives constitueixen un grup de malalties d'etiologia diversa i de diferent gravetat, la naturalesa hereditària de les quals es coneix des de fa temps. Són malalties caracteritzades per una degeneració progressiva de les fibres musculars amb una necrosi-regeneració característica, la qual cosa comporta una hiperplàsia del teixit connectiu. L'afectació és essencialment esquelètica i poden estar igualment afectats, encara que no sempre, el teixit miocàrdic i el múscul lliu. L'edat d'inici del procés és difícil de determinar, ja que l'afectació histològica pot precedir durant força temps les primeres manifestacions clíniques, tal i com posen en evidència els casos descoberts fortuïtament en l'infantesa sobre la base d'una elevació massiva de la concentració de creatina quinasa.

El procés distròfic es manifesta per un dèficit de força muscular i una atròfia de les masses musculars, aquesta darrera a vega-

des emmascarada per una hipertròfia conjuntivo-adiposa. Inicialment, es veu afectada la musculatura de les cintures i de les regions proximals dels membres. El procés evoluciona progressivament i afecta les extremitats distals en un estadi tardà. Les principals fonts de minusvalidesa són la pèrdua progressiva de capacitat deambulatòria, el compromís de l'estàtica raquidiàna amb desenvolupament de cifoescoliosi, les retraccions tendinoses i, finalment, la insuficiència respiratòria. Aquest esquema evolutiu varia considerablement, tant en l'edat d'inici com en el ritme de progressió.

CLASSIFICACIÓ DE LES DISTRÒFIES MUSCULARS PROGRESSIVES

L'any 1884 Erb va ser el primer a reagrupar les seves observacions i les realitzades per Duchenne, Landouzy i Déjerine sota el terme general de *distròfia muscular*. Va ser necessari esperar gairebé un segle perquè la

renovació de la patologia muscular, originada per l'arribada de noves tècniques (histoquímica, microscòpia electrònica, entre d'altres), portés a una nova classificació d'aquestes distròfies, realitzada l'any 1954 per Walton i Natrass. Per primera vegada, a més dels elements histològics i clínics, es tenien en compte els diferents tipus de transmissió hereditària. D'aquesta manera va ser possible distingir les *formes recessives lligades al sexe* (distròfia muscular de Duchenne, distròfia muscular de Becker) (Emery, 1993), les *formes de transmissió autosòmica dominant* (distròfia muscular de Landouzy-Déjerine o facioescapulohumeral) (Landouzy i Déjerine, 1885) i les *formes autosòmiques recessives* (forma descrita per Erb) (Erb, 1884). De mica en mica, altres entitats varen anar enriquint aquesta classificació, com ara la distròfia d'Emery-Dreyfuss en 1996 (distròfia muscular recessiva lligada al sexe amb afectació cardíaca i retracció de colzes) (Emery i Dreyfuss, 1966) i, posteriorment, la distròfia muscular autosòmica recessiva greu del nen, anomenada també SCARMD (*severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy*) descrita inicialment a Tunísia

els anys vuitanta (Ben Hamida *et al.*, 1983).

El descobriment dels gens implicats i de la seva patologia ha completat aquesta classificació (els diferents gens implicats en les distròfies musculars progressives figuren en la taula 1). La història de la recerca d'aquests gens il·lustra la importància del descobriment de la primera anella de la cadena, la distrofina, i la convergència de la bioquímica, la genètica i la clínica vers la medicina molecular.

LA DISTROFINA

La distrofina és la proteïna deficitària de les miopaties de Duchenne i de Becker. Va ser descoberta en 1987 mitjançant una estratègia anomenada en aquell moment «genètica inversa», és a dir, mitjançant la recerca prèvia del gen en el *locus* mòrbid corresponent (*locus* DMD en Xp21.2) i la deducció de la seqüència codificadora (Monaco i Kunkel, 1988). L'estudi de la proteïna, de la seva patologia i de les seves conseqüències mòrbides (distròfies musculars de tipus Duchenne, Becker o altres manifestacions rea-

TAULA I. Gens de les distròfies musculars identificats durant els darrers deu anys.

Malaltia	Locus	Gen/Proteïna	Localització cel·lular
Duchenne/Becker	DMD (Xp21)	Distrofina	Subsarcolemma (citoesquelet)
Distròfia de cintures greu	LGMD2C (13q12)	γ -sarcoglican	Sarcolemma
	LGMD2D (17q21)	Adhalina	"
	LGMD2E (4q12)	β -sarcoglican	"
	LGMD2F (17q21)	α -sarcoglican (adhalina)	"
Distròfica de cintures Emery-Dreyfuss	LGMD2F (5q3)	δ -sarcoglican	"
	LGMD2A (15q EMD (Xq28))	Calpaïna 3 Emerina	Citosol (enzim proteolític) Membrana nuclear
Distròfia muscular congènita	LAMN (6q2)	Merosina (α 2-laminina)	Matriu Extracel·lular
Miopatia de Bethlem	COL6A1, COL6A2 (21q22)	Col·lagen tipus IV (α 1 i α 2)	Extracel·lular
Distròfia muscular tardana amb epidermòlisi	MD-EBS (8q24)	Plectina	Citosol (filaments intermediaris)

grupades sota el nom de «distrofinopaties») (Monaco i Kunkel, 1988; Hoffman i Kunkel, 1989; Ahn i Kunkel, 1993) no és l'objectiu d'aquest article. Això no obstant, atès que la posterior identificació dels gens responsables d'un cert nombre de distròfies musculars autosòmiques emana directament del descobriment de la distrofina, és convenient recordar certes nocions que li pertoqueu.

Esquemàticament, l'absència de distrofina és l'origen del quadre greu de la distròfia muscular de Duchenne (DMD). La DMD resulta de mutacions sense sentit (origenen una proteïna truncada) en el gen de la distrofina (un gen gegant de 2,3 Mb). Aquestes mutacions són generalment delecions de talla variable que comporten un decalatge del marc de lectura de la proteïna (65 % dels casos). Les mutacions puntuals, de tipus *missense* (origenen un canvi d'aminoàcid) o que pertorben l'*splicing* (eliminació d'introns), són molt menys freqüents. Les formes menys greus, reagrupades sota la denominació de distròfia muscular de Becker (DMB), es deuen a una disminució més o menys gran de la distrofina, generalment associada a una delecio d'un o més exons amb manteniment del marc de lectura. La distrofina és una proteïna de 427 kDa, expressada en el múscul i les neurones (Ahn i Kunkel, 1993). Està emparentada amb proteïnes del citoesquelet per dos dels quatre dominis que posseeix: el domini N-terminal, que recorda l' α -actina, i el domini central, molt pròxim per la seva configuració a l'espectrina. En el múscul, la distrofina es localitza sota el sarcolemma (Zubrycka-Gaarn *et al.*, 1988; Arahata *et al.*, 1988).

LES PROTEÏNES ASSOCIADES A LA DISTROFINA

El descobriment de l'estreta associació de la distrofina amb una proteïna integral de la membrana sarcolèmica (Campbell i

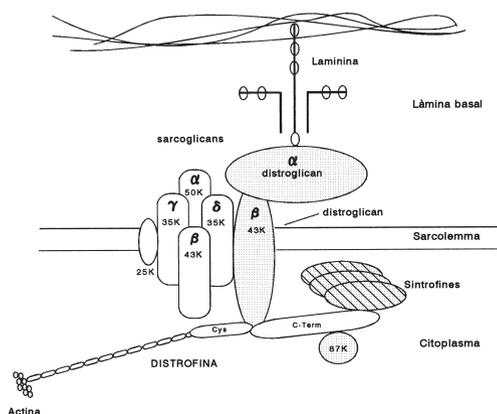


FIGURA 1. Complex distrofina-proteïnes associades (DAG).

Kahl, 1989) ha permès de postular un model bioquímic en el qual la distrofina s'uniria a l'actina del citoesquelet a través del seu extrem N-terminal, i a les proteïnes del sarcolemma a través del seu extrem C-terminal (Campbell i Kahl, 1989; Ervasti i Campbell, 1991) (figura 1). Al llarg de l'extracció de les proteïnes del sarcolemma, la distrofina copurifica amb diverses glicoproteïnes transmembràniques, prova bioquímica de l'existència d'un complex anomenat DAG (*dystrophin-associated glycoproteins*). Els múltiples components d'aquest complex han estat progressivament identificats gràcies als treballs concurrents de dos equips, el de Campbell als Estats Units i el d'Ozawa al Japó (Campbell, 1995; Ozawa *et al.*, 1995).

Les proteïnes del sarcolemma s'agrupen en tres complexos, segons la classificació proposada per Ozawa (figura 1): 1) el *complex distroglican* (DG), amb dues unitats, l' α -DG (156 kDa), totalment extracel·lular, i el β -DG (43 kDa) transmembrànic (ambdós derivats d'un mateix gen situat sobre el cromosoma 3); 2) el *complex sarcoglican* (SG), integrat pel cap baix per quatre glicoproteïnes transmembràniques: α -SG (50 kDa), β -SG (43 kDa), γ -SG (35 kDa) i δ -SG (35 kDa) i una proteïna de 25 kDa no glicosilada; 3) el *com-*

plex de les sintrofines (intracitoesquelètic). D'aquesta manera es dibuixa una cadena contínua entre el citoesquelet intracel·lular i la matriu extracel·lular, on la localització de la distrofina suggereix una funció mecànica d'estabilització al llarg de la contracció muscular (Campbell, 1995; Petrof *et al.*, 1993).

L'observació en 1991 d'una disminució dels DAG – més precisament, dels components 156 DAG, 43 DAG, 50 DAG i 35 DAG – en el múscul dels malalts afectats de la malaltia de Duchenne atribuïa a la distrofina, per primera vegada, un paper en el manteniment de la cohesió del complex i proporcionava aclariment sobre la fisiopatologia de les distròfies musculars progressives. Aquesta troballa ha constituït un veritable fil conductor de l'etiologia molecular d'algunes distròfies musculars autosòmiques recessives (Ervasti *et al.*, 1990; Matsumura *et al.*, 1993a, 1993b).

En efecte, era temptador imaginar que aquestes distròfies musculars, algunes de les quals només es distingeixen de les miopaties de Duchenne o de Becker perquè afecten els dos sexes, podrien correspondre a una anomalia d'alguna de les glicoproteïnes associades a la distrofina. Aquesta hipòtesi es recolzava en l'anàlisi immunohistoquímica de biòpsies musculars que mostraven un descens de la proteïna 50 DAG, que contrastava amb la conservació de la distrofina (Matsumura *et al.*, 1992). Aquesta reducció

es va detectar inicialment en pacients magrebins i libanesos, els quals presentaven un quadre de SCARMD (Matsumura *et al.*, 1992; Azibi *et al.*, 1993; El Kerch *et al.*, 1994). L'aparent especificitat etnogeogràfica va fer batejar la proteïna 50 DAG com «adhalina» («adhal» significa múscul en àrab) (Roberds *et al.*, 1993). De fet, casos de SCARMD varen ser descrits a continuació a Europa, Brasil i Japó (Fardeau *et al.*, 1993; Passos-Bueno *et al.*, 1993a). Restava per demostrar que l'anomalia observada en els SCARMD resultava d'un defecte primari en el gen corresponent. Les anàlisis de les famílies afectades demostraren posteriorment l'heterogeneïtat genètica de les distròfies musculars autosòmiques recessives amb dèficit d'adhalina (Passos-Bueno *et al.*, 1993a).

HETEROGENEÏTAT GENÈTICA DE LES DISTRÒFIES MUSCULARS AUTOSÒMIQUES RECESSIVES

L'any 1995 es va proposar una nova nomenclatura per a les distròfies musculars autosòmiques recessives (Bushby i Beckmann, 1995). Aquesta classificació reagrupa totes les entitats clíniques sota les sigles generals de LGMD (*limb-girdle muscular dystrophy*), sense tenir en compte ni les diferències fenotípiques ni la classificació nosològica clàssica. La nova nomenclatura genètica, presentada en la taula II, només té en consideració el caràcter dominant (categoria LGMD1) o recessiu (categoria LGMD2), i queden identificats per lletres els diferents *loci* definits per anàlisi de lligament. Aquesta nomenclatura purament genètica a vegades és una font de confusió per als clínics, però està plenament justificada des d'una perspectiva de genètica inversa, en la qual els gens són directament identificats sobre el genoma i les proteïnes específiques deduïdes de les seqüències

TAULA II. Nomenclatura de les distròfies de cintures.

Grup	Subgrup	Locus	Gen	Nomenclatura anterior
LGMD1 (dominant)	LGMD1A	5q22-34	?	LGMD1
	LGMD1B	1q11-21	?	
	LGMD1C	3p25	<i>Calveolina3</i>	
LGMD2 (recessiva)	LGMD2A	15q15-21	<i>Calpaina3</i>	LGMD2
	LGMD2B	2p13-16	?	LGMD3
	LGMD2C	13q12	γ -SG	SCARMD1
	LGMD2D	1712-21	α -SG	SCARMD2
	LGMD2E	4q12	β -SG	
	LGMD2F	5q33	δ -SG	

codificadores dels esmentats gens. D'altra banda, avui sabem que una malaltia aparentment monomorfa pot ser deguda a l'afectació alternativa de diversos gens (heterogeneïtat genètica) i que, inversament, diferents mutacions en un mateix gen poden induir malalties fenotípicament desiguals (heterogeneïtat clínica).

El caràcter operatiu d'aquesta nomenclatura ha estat plenament demostrat amb la individualització de les «amb dèficit d'adhalina». Aquestes anomalies s'han localitzat primerament sobre el cromosoma 13 i han definit un primer *locus* denominat LGMD2C (Azibi *et al.*, 1993; Ben Othmane *et al.*, 1992). Això no obstant, altres famílies no presentaven lligament amb el cromosoma 13 (Passos-Bueno *et al.*, 1993a). La clonació del gen de l'adhalina (Roberds *et al.*, 1994) va permetre identificar-ne el *locus* en 17q21, i va indicar que l'absència d'adhalina dels SCARMD lligats al cromosoma 13 era necessàriament un fenomen secundari.

A continuació, es varen identificar altres gens de LGMD seguint la mateixa cadena dels DAG: 35 DAG per al *locus* LGMD2C (Noguchi *et al.*, 1995), 43 DAG per al *locus* sobre el cromosoma 4 (LGMD2E; Lim *et al.*, 1995; Bönnemann *et al.*, 1995; Bönnemann *et al.*, 1996) i una altra proteïna de 35 kDa en el *locus* LGMD2F (5q33) (Nigro *et al.*, 1996a). Les proteïnes corresponents a aquests quatre *loci* formen part del *complex sarcoglican* (SG) i, en conseqüència, han estat rebatejades: α -SG, (per l'adhalina) en el *locus* LGMD2D, β -SG en el *locus* LGMD2E, γ -SG en el *locus* LGMD2C i δ -SG en el *locus* LGMD2F. El mot adhalina ha quedat substituït definitivament pel d' α -sarcoglican.

Les calpaïnopaties: LGMD2A

El *locus* de la LGMD2A va ser inicialment localitzat en una població endogàmica

de l'Illa de la Reunió. Els malalts presentaven una forma de cintures clínicament semblant al quadre descrit per Erb (Fardeau *et al.*, 1996) i, per tant, diferent del de les SCARMD. El quadre clínic està marcat, almenys a l'inici, per una afectació muscular simètrica i selectiva; implica sobretot la part posterior de les natges i dels braços, sense macroglòssia ni hipertròfia del tou de la cama. L'espectre evolutiu és molt ampli. L'edat d'inici dels trastorns se situa cap a la segona dècada de vida i l'edat de pèrdua de deambulació, per regla general, prop dels trenta anys. L'anàlisi de lligament en famílies d'aquesta població va mostrar lligament amb marcadors del braç llarg del cromosoma 15 (Beckmann *et al.*, 1991). Aquesta localització es va confirmar posteriorment en famílies d'altres poblacions diferents (Young *et al.*, 1992; Passos-Bueno *et al.*, 1993b). La genotipificació de nous marcadors del cromosoma 15 va permetre d'enquadrar el *locus* LGMD2A en l'interval 15q15.1 i 15q21.1. L'establiment d'un mapa de transcrits d'aquesta regió va fer possible la detecció de dues seqüències expressades específicament en el múscul esquelètic, una de les quals codificava una proteasa intracel·lular: la calpaïna 3 (CANP3) (Fougerousse *et al.*, 1994; Allamand *et al.*, 1995; Sorimachi *et al.*, 1989). Un estudi sistemàtic de les famílies afectades va permetre evidenciar mutacions en pacients LGMD2A, i va validar així el gen d'aquesta calpaïna 3 com a responsable de la malaltia (Richard *et al.*, 1995).

Sobre els cinc gens de distròfia muscular autosòmica recessiva recentment clonats, quatre codifiquen proteïnes d'estructura del sarcolemma, mentre que el gen de la calpaïna 3 correspon a un enzim proteolític. Les calpaïnes són proteases no lisosòmiques que tenen una suposada funció reguladora (Wang *et al.*, 1989; Croall i Demartino, 1991). Comprenen dues proteïnes

TAULA III. Gens de les distròfies de cintures autosòmiques recessives.

Gen / Locus	Mida	Núm. exons	Proteïna	Localització	Poblacions
α -Sarcoglican LGMD2D / 17q	~10 kb	10	50 kDa 387 aa	Sarcolemma transmembranari	Europa, Àfrica del nord, Líban, Turquia, Brasil, EUA, Japó
β -Sarcoglican	13,5 kb	6	43kDa 318 aa	''	Amish del Sud, Brasil, EUA
γ -Aarcoglican	>100 kb	8	35 kDa	''	Àfrica del nord, Líban, Gitanos europeus, Turquia, Pakistà, Japó, Brasil
δ -Sarcoglican	~100 kb	8	35 kDa 290 aa	''	Brasil
Calpaïna 3	45 kb	24	95 kDa 821 aa	?	Illa de la Reunió, Brasil, Amish del nord, Europa, Brasil, Turquia, Japó

ubiquïes, els isoenzims CANP1 i CANP2, dues proteïnes específiques de l'estómac, i la CANP3, pròpia del múscul esquelètic (Sorimachi *et al.*, 1994). Contràriament a les calpaïnes ubiquïes, la calpaïna 3 és activa a concentracions intracel·lulars fisiològiques de Ca^{2+} .

GEN DE LA CALPAÏNA

El gen humà *CANP3* està constituït per vint-i-quatre exons que recobreixen almenys 45 kb de DNA genòmic (Richard *et al.*, 1995) (taula III). Fins a l'actualitat s'han identificat més de seixanta mutacions *CANP3* repartides al llarg del gen. Les mutacions recurrents representen menys d'un 25 % i la majoria semblen, per tant, mutacions úniques (Richard *et al.*, 1997). S'han observat tots els tipus de mutacions, llevat de grans delecions, insercions, duplicacions o mutacions en el promotor. Aquesta gran heterogeneïtat de defectes moleculars del gen *CANP3* s'ha observat en les famílies estudiades de diferents països: Espanya, França, Brasil, Israel, Itàlia, Japó, Líban, Suïssa, Turquia i Estats Units, incloses algu-

nes poblacions genèticament tancades (població Amish, basca i de l'Illa de la Reunió) (Richard *et al.*, 1997).

La manca d'anticossos capaços de reconèixer específicament la calpaïna 3 i l'absència d'un mètode específic de mesura enzimàtica han impedit fins ara l'estudi de l'impacte d'aquestes mutacions en la proteïna.

LES SARCOGLICANOPATIES

Les sarcoglicanopaties es deuen a mutacions recessives en un dels quatre gens ja clonats (taula III) del complex sarcoglican. Atès que els anticossos dirigits contra l' α -SG (Matsumura *et al.*, 1992) varen ser els primers a obtenir-se i durant molt de temps els únics utilitzats, la majoria dels casos s'ha identificat sobre la base d'un α -SG significativament disminuït, que contrasta amb una distrofina normal.

El defecte primari d'un gen del complex SG origina un dèficit marcat de la corresponent proteïna, dèficit que repercuteix secundàriament sobre la quantitat de les altres tres proteïnes associades al complex SG,

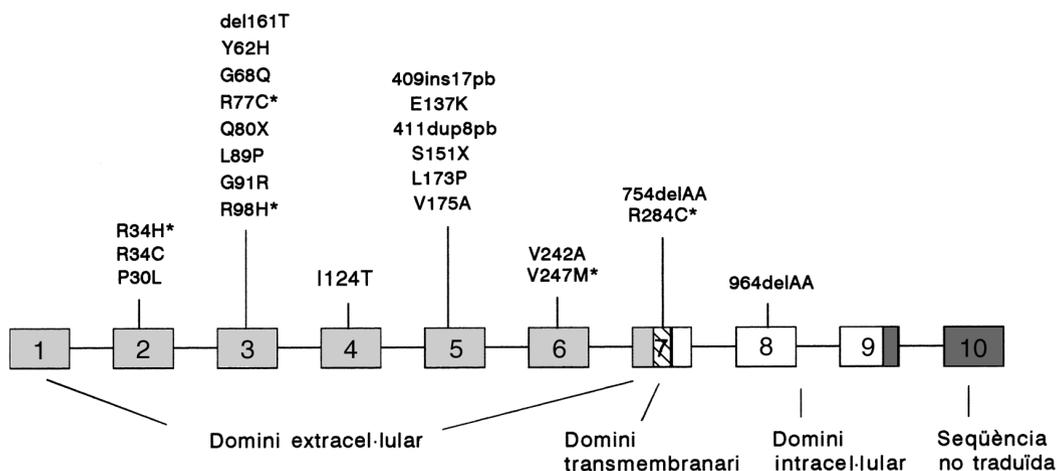


FIGURA 2. Mutacions en el gen α -sarcoglican. Els exons estan representats per rectangles. El puntejat representa la seqüència corresponent al domini extramembranari de la proteïna; en ratllat, la corresponent al transmembranari; en blanc, la corresponent al domini intracel·lular i en fosc, la seqüència no traduïda. Les mutacions recurrents estan indicades per un asterisc.

sense disminució ni dels distroglicans ni de la distrofina. La patologia genètica confirma així la realitat biològica del complex SG, bioquímicament individualitzat per l'equip d'Ozawa (Ozawa *et al.*, 1995). Es tracta d'un exemple típic del que podríem anomenar una «patologia dòmino»: l'absència d'una de les peces pertorba el conjunt del complex, n'altera l'estabilitat o bé n'impedeix la formació. Encara existeixen pocs exemples d'aquest tipus de patologia, els primers casos de la qual han estat aportats per les anomalies de l'aparell citoesquelètic eritrocitari (Alloisio *et al.*, 1993).

MUTACIONS DELS GENS DEL COMPLEX SARCOGLICAN

Les mutacions del gen α -SG són les més ben conegudes, ja que aquest gen ha estat el primer en ser identificat (Piccolo *et al.*, 1995; Carrié *et al.*, 1997; Ljunggren *et al.*, 1995; Kawai *et al.*, 1995; Passos-Bueno *et al.*, 1996) (figura 2). Es tracta de mutacions puntuals que afecten, preferentment, els exons 3 i 5. Po-

den subdividir-se en mutacions *nonsense* i mutacions *missense*. Com és d'esperar, les mutacions *nonsense* impedeixen qualsevol producció de proteïna. En els casos amb mutacions *missense* també hi ha un clar efecte quantitatiu, però en una anàlisi mitjançant Western blot, són visibles traces d' α -SG. El mateix succeeix amb alguns exemples de mutacions *missense* dels altres gens del complex sarcoglican, fet que reforça la hipòtesi d'una patologia d'interaccions.

Algunes mutacions, com ara la mutació α -R77C, són particularment freqüents. El fet que s'hagin trobat haplotips diversos i en diferents poblacions indica que es tracta d'una mutació recurrent (Carrié *et al.*, 1997).

En el gen γ -SG (figura 3), han estat posades en evidència dues mutacions amb efecte fundador en dues poblacions fortament consanguínies. Una és la mutació γ -SG Δ 521-T, prevalent a l'Àfrica del nord i també trobada al Brasil (McNally *et al.*, 1996), en associació amb un al·lel rar del marcador intragènic D13S232 (Ben Othmane *et al.*, 1995). L'altra mutació, γ -SGC283Y, associada a un altre al·lel del marcador D13S232, és

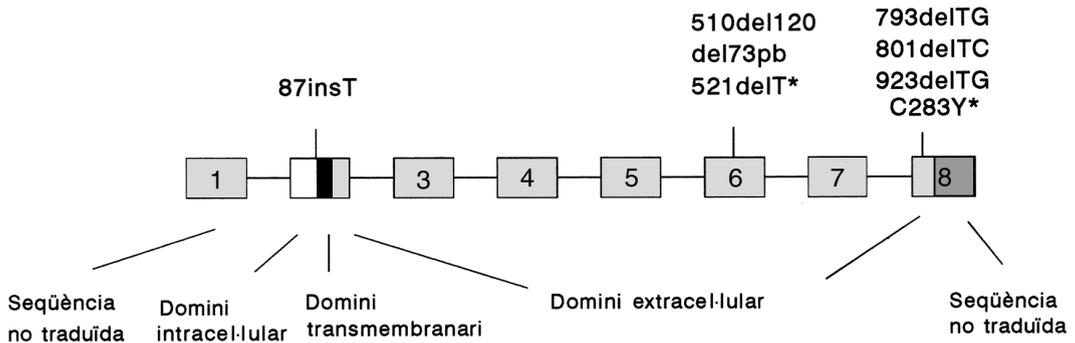


FIGURA 3. Mutacions en gen γ -sarcoglican. Els exons estan representats per rectangles. En fosc, apareix la seqüència no traduïda; en blanc, la seqüència corresponent al domini intracel·lular de la proteïna; en negre, la corresponent al domini transmembranari, i en puntejat, la corresponent al domini extracel·lular. Les mutacions recurrents estan indicades per un asterisc.

pròpia dels gitans de l'Europa occidental (Piccolo *et al.*, 1996). En aquest darrer cas, la reconstitució d'un haplotip ancestral ha permès datar la mutació més enllà de seixanta generacions, és a dir, abans de la data presumida de la migració històrica dels gitans fora de l'Índia (Piccolo *et al.*, 1996).

ELS PROBLEMES EPIDEMIOLÒGICS

La individualització recent de les sarcoglicanopaties en el si de les malalties autosòmiques recessives ha suscitat un cert nombre d'interrogants. Una de les primeres qüestions que se'ns planteja és quantificar aquestes distròfies de cintures, recessives dins de les distròfies musculars progressives. No és fàcil respondre a aquesta qüestió mentre el diagnòstic molecular de les distròfies musculars no hagi entrat en la pràctica mèdica. Tractant-se de malalties autosòmiques recessives, hem d'esperar-ne una major freqüència en el si de les poblacions endogàmiques.

Una altra qüestió que també se'ns plan-

teja és la responsabilitat dels diferents gens del complex sarcoglican dins les sarcoglicanopaties. És evident que la proporció pot diferir segons les diferents poblacions. En general, les γ -sarcoglicanopaties són més freqüents a l'Àfrica del nord, mentre que a l'Europa occidental, llevat del cas particular dels gitans, no trobem pràcticament més que α -sarcoglicanopaties. Quant a la distribució de les calpaïnopaties, sembla ubíqua; entre les famílies estudiades fins a l'actualitat, aquesta anomalia s'acosta al 50 % (Richard *et al.*, 1997). Si aquestes dades es confirmen, les calpaïnopaties podrien representar una fracció majoritària dins les distròfies autosòmiques recessives progressives.

EL DIAGNÒSTIC MOLECULAR DIFERENCIAL

La figura 4 il·lustra l'estratègia diagnòstica més lògica a seguir, fundada en una primera instància sobre l'anàlisi de les proteïnes musculars en les biòpsies musculars

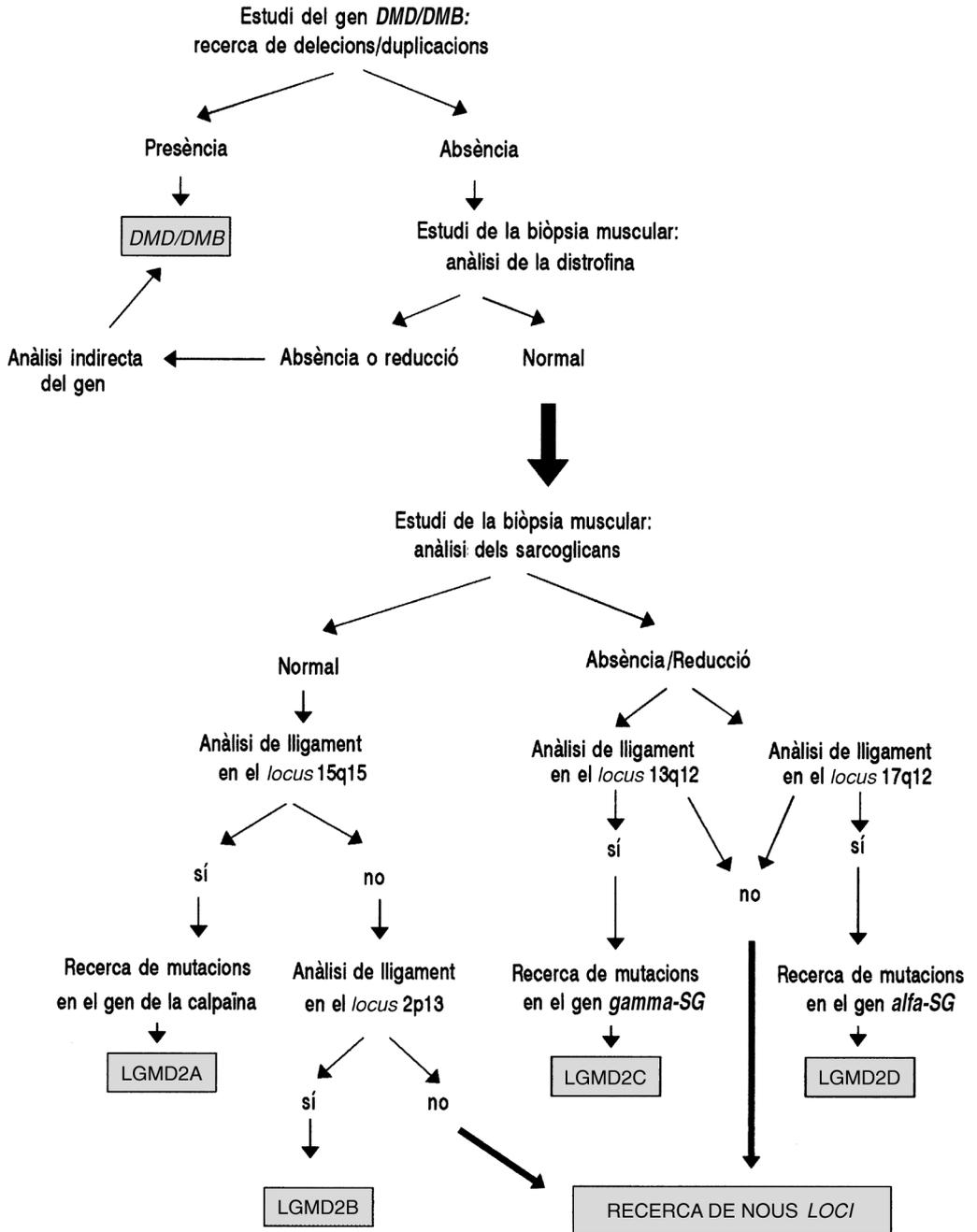


FIGURA 4. Estratègia d'estudi de les distròfies musculars progressives autosòmiques recessives.

(per a aquelles proteïnes de les quals es disposa d'un anticòs) i, posteriorment, en l'anàlisi dels gens. Un complement útil d'aquesta estratègia és l'anàlisi de lligament, la qual pot proporcionar en casos privilegiats (nombre suficient de meiosis informatives) un element d'orientació decisiu. En aquest esquema, mentre s'espera la possibilitat d'analitzar la calpaïna 3 des d'un punt de vista proteic, el diagnòstic de calpaïnopatia és difícil i roman, de moment, un diagnòstic d'exclusió (figura 4).

CORRELACIONS FENOTIP-GENOTIP, FISIOPATOLOGIA

Sarcoglicanopaties

De manera general, les sarcoglicanopaties comparteixen característiques clíniques que fan que s'assemblin sobretot a les distrofinopaties com ara la hipertròfia del tou de la cama, la freqüent macroglòssia, l'afecció muscular proximal i poc selectiva o l'elevació marcada de la concentració de creatina quinasa. Al contrari, l'afecció respiratòria i cardíaca és molt menys predominant i no s'observa retard mental. Per regla general, sembla que les β -, γ - i δ -sarcoglicanopaties són més greus, amb un inici en la infància i un quadre de Duchenne o de Becker greu (Lim *et al.*, 1995; Bönnemann *et al.*, 1995; Bönnemann *et al.*, 1996; Nigro *et al.*, 1996b; McNally *et al.*, 1996; Piccolo *et al.*, 1996). Malgrat això, s'ha de remarcar que el nombre de mostres de pacients analitzats fins ara és encara petit i es limita als casos més greus. És possible que ampliant les investigacions a malalts menys afectats s'arribi a descobrir una major variabilitat clínica, com ha succeït en el cas de les α -sarcoglicanopaties.

En efecte, ara sabem que aquestes últimes poden originar una varietat de qua-

dres clínics que van des de la forma greu, amb pèrdua de la deambulació abans dels dotze anys, a formes molt poc invalidants, revelades tardanament per rampes i/o fatigabilitat i una elevada concentració de creatina quinasa (Piccolo *et al.*, 1995; Carrié *et al.*, 1997; Eymard *et al.*, 1997). És temptador atribuir aquestes variacions fenotípiques a mutacions diferents en el gen α -SG, però existeixen casos amb diferent gravetat i que tenen la mateixa mutació. Per això, és difícil assignar un fenotip constant a una determinada mutació. Per a una mateixa mutació homocigota o amb el mateix conjunt d'al·lels en cas d'heterocigosi composta, s'observen variacions d'una família a una altra o, fins i tot, dins d'una mateixa fratria (Carrié *et al.*, 1997; Eymard *et al.*, 1997). Aquestes variacions, que han estat subratllades en les observacions dels clínics (Ben Hamida *et al.*, 1983), podrien reflectir la intervenció de gens modificadors.

La fisiopatologia de les sarcoglicanopaties encara no es coneix. Certament, es tracta de pertorbacions del complex sarcolèmmic que serveix d'intermediari entre el citoesquelet intracel·lular, via distrofina, i la matriu extracel·lular. L'observació preliminar de la pertorbació secundària d'aquest complex en cas de distrofinopatia (Ervasti *et al.*, 1990; Matsumura *et al.*, 1993a, 1993b) permetria pensar que el complex podria tenir un paper central i explicar el procés distròfic, tant en les distrofinopaties com en les sarcoglicanopaties (Matsumura *et al.*, 1992). La restauració del complex constituiria una via possible de correcció de les distrofinopaties. Un treball realitzat concurrentment per dos grups ha invalidat aquesta hipòtesi: l'expressió mitjançant transgènesi de les proteïnes DP71 (corresponent a la part C-terminal de la distrofina) en el múscul del ratolí *mdx* (model múrid de DMD) restaura completament els com-

plexos associats a la distrofina (dystroglican i sarcoglican) sense millorar de cap manera el procés distròfic (Rafael *et al.*, 1996; Greenberg *et al.*, 1994).

Calpaïnopaties

Com per a les sarcoglicanopaties, el quadre clínic induït per les mutacions *missense* és, en general, menys greu que el de les mutacions *nonsense* (Richard *et al.*, 1997). Ja que aquestes darreres produeixen una proteïna truncada i molt probablement no funcional, es pot pensar que la patologia no resulta d'una activació intempestiva de la calpaïna 3. Es tracta, per tant, d'una patologia recessiva clàssica per pèrdua de funció, funció que encara roman desconeguda. En absència d'indicis sobre la localització cel·lular de la calpaïna 3, sobre la naturalesa del seu substrat o substrats fisiològics, així com sobre l'impacte proteic de les mutacions, els coneixements de la fisiopatologia són merament especulatius.

S'ha suggerit un paper per a la calpaïna 3 durant la miogènesi, sobretot pel truncament d'una proteòlisi programada i precisament regulada pels factors de transcripció, com MyoD i miogenina. Ni el quadre clínic ni la patologia serien evocadors d'una malaltia del desenvolupament muscular i, per tant, és probable que la calpaïna 3 intervingui en el manteniment de la massa muscular, més que no pas en la seva formació. La unió amb titines i la regulació pel calci poden igualment fer pensar en una intervenció en el propi procés de contracció muscular. També podem imaginar una funció protectora de les cèl·lules musculars amb la intervenció en el catabolisme de determinades proteïnes. La pertorbació d'aquesta funció conduiria a una acumulació tòxica de certs compostos i finalment a la degradació de les fibres musculars.

LA NOVA NOSOLOGIA

Les distròfies musculars són una il·lustració de com el descobriment dels gens implicats en les malalties genètiques monofactorials i la caracterització de les seves mutacions han canviat la classificació clinicomorfològica clàssica. Una mateixa entitat clínica pot recobrir una varietat de gens patològics, com és el cas del conjunt de malalties musculars abusivament anomenat «distròfies de cintures», les quals poden ser degudes a una anomalia situada en el gen de la calpaïna 3 o bé en un dels gens del complex sarcoglican.

Per altra banda, la patologia d'un mateix gen pot conduir a fenotips desiguals que sembli que provenen de malalties diferents com ara les mutacions en el gen de la distrofina o en el de l' α -sarcoglican, que poden originar miopaties greus o benignes, segons l'al·lel considerat i també en funció de les variacions epistàtiques, els mecanismes de les quals se'ns escapen encara totalment. Per tant, en absència d'estrictes correlacions genotip-fenotip, la nova nosologia molecular no podria substituir completament la nosologia clínica.

A mesura que s'anaven descobrint, els gens de les distròfies musculars també ens han proporcionat elements d'una classificació subcel·lular de la malaltia. Es pot parlar de *patologia del sarcolemma* per a les distrofinopaties i les sarcoglicanopaties.

Pel que fa a les calpaïnopaties, primer exemple d'una malaltia muscular per anomalia d'una proteasa, constitueixen en l'actualitat un enigma fisiopatològic. És possible que els altres gens de les distròfies musculars progressives recessives que resten per descobrir, com el situat en el *locus* LGMD2B sobre el cromosoma 2 (Bashir *et al.*, 1994) o els que encara no han estat localitzats (Passos-Bueno *et al.*, 1996), reservin altres sorpreses.

BIBLIOGRAFIA

- AHN, A. H.; L. M. KUNKEL (1993). «The structural functional diversity of dystrophin». *Nature Genet*, núm. 3, pàg. 283-291.
- ALLAMAND, V.; O. BROUX; I. RICHARD [et al.] (1995). «Preferential localization of the limb-girdle muscular dystrophy type 2A gene in the proximal part of a 1-cM 15q15.1-q15.3». *Am J Hum Genet*, núm. 56, pàg. 1-13.
- ALLOISIO, N.; D. DALLA VENEZIA; A. RANA [et al.] (1993). «Evidence that red blood cell protein p55 may participate in the skeleton-membrane linkage that involves protein 4.1 and glycophorin C». *Blood*, núm. 82, pàg. 1323-1327.
- ARAHATA, K.; S. ISHIURA; T. ISHIGURO [et al.] (1988). «Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide». *Nature*, núm. 333, pàg. 861-863.
- AZIBI, K.; J. S. BACHNER; J. S. BECKMANN [et al.] (1993). «Severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy with deficiency of the 50kDa dystrophin-associated glycoprotein maps to chromosome 13q12». *Hum Mol Genet*, núm. 2, pàg. 1423-1428.
- BASHIR, R.; T. STRACHAN; S. KEERS [et al.] (1994). «A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome». *Hum Mol Genet*, núm. 3, pàg. 455-457.
- BECKMANN, J. S.; I. RICHARD; D. HILLAIRE [et al.] (1991). «A gene for limb-girdle muscular dystrophies maps to chromosome 15 by linkage». *C R Acad Sci Paris*, núm. 312, pàg. 141-148.
- BEN HAMIDA, M.; M. FARDEAU; N. ATTIA (1983). «Severe childhood muscular dystrophy affecting both sexes and frequent in Tunisia». *Muscle Nerve*, núm. 6, pàg. 469-480.
- BEN OTHMANE, K.; M. BEN HAMIDA; M. PERICAK-VANCE [et al.] (1992). «Linkage of Tunisian autosomal recessive Duchenne-like muscular dystrophy to the pericentromeric region of chromosome 13q». *Nature Genet*, núm. 2, pàg. 315-317.
- BEN OTHMANE, K.; M. C. SPEER; J. STAUFFER [et al.] (1995). «Evidence for linkage disequilibrium in chromosome 13-linked Duchenne-like muscular dystrophy (LGMD2C)». *Am J Hum Genet*, núm. 57, pàg. 732-734.
- BÖNNEMANN, C. G.; R. MODI; S. NOGUCHI [et al.] (1995). « β -sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex». *Nature Genet*, núm. 11, pàg. 266-273.
- BÖNNEMANN, C. G.; M. R. PASSOS-BUENO; E. M. McNALLY [et al.] (1966). «Genomic screening for β -sarcoglycan gene mutations: missense mutations may cause severe limb-girdle muscular dystrophy type 2E (LGMD2E)». *Hum Mol Genet*, núm. 5, pàg. 1953-1961.
- BUSHBY, K. M. D.; J. S. BECKMANN (1995). «Report on the Thirtieth and Thirty-First ENMC International Workshops on the limb-girdle muscular dystrophies. Proposal for a new nomenclature». *Neuromusc Disord*, núm. 5, pàg. 337-343.
- CAMPBELL, K. P.; S. D. KAHL (1989). «Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein». *Nature*, núm. 338, pàg. 259-262.
- CAMPBELL, K. P. (1995). «Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage». *Cell*, núm. 80, pàg. 675-679.
- CARRIÉ, A.; F. PICCOLO; F. LETURCQ; C. DE TOMA [et al.] (1997). «Mutational diversity and hot spots in the α -sarcoglycan gene in autosomal recessive muscular dystrophy (LGMD2D)». *J Met Genet*, núm. 34, pàg. 470-475.
- CROALL, D. E.; G. N. DEMARTINO (1991). «Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation». *Physiol Rev*, núm. 71, pàg. 813-847.
- EL KERCH, F.; A. SEFIANI; K. AZIBI [et al.] (1994). «Linkage analysis of families with severe autosomal recessive muscular dystrophy (SCARMD) in Morocco indicates genetic homogeneity of the disease in North-Africa». *J Med Genet*, núm. 31, pàg. 342-343.
- EMERY, A. E. (1993). *Duchenne muscular dystrophy*. 2nd ed. Oxford University Press.
- EMERY, A. E.; F. E. DREIFUSS [et al.] (1966). «Unusual type of benign X-linked muscular dystrophy». *J Neurol Neurosurg Psychiatr*, núm. 29, pàg. 338-342.
- ERB, W. (1884). «Ueber die Juvenile Form der progressiven Muskelatrophie ihre Beziehungen zur sogenannten Pseudohypertrophie der Muskeln». *Dtsch Arch Klin Med*, núm. 34, pàg. 467-519.
- ERVASTI, J. M.; K. OHLENDIECK; S. D. KAHL; M. G. GAVER; K. P. CAMPBELL (1990). «Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle». *Nature*, núm. 345, pàg. 315-319.
- ERVASTI, J. M.; K. P. CAMPBELL (1991). «Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex». *Cell*, núm. 66, pàg. 1121-1131.
- EYMARD, B.; N. B. ROMERO; F. LETURCQ [et al.] (1997). «Primary adhalinopathy (α -sarcoglycanopathy): clinical, pathological, and genetic correlation in 20 patients with autosomal recessive muscular dystrophy». *Neurology*, núm. 48, pàg. 1227-1234.
- FARDEAU, M.; K. MATSUMURA; F. M. S. TOMÈ [et al.] (1993). «Deficiency of the 50 kDa dystrophin associated glycoprotein (adhalin) in severe autosomal recessive muscular dystrophies in children native from European countries». *C R Acad Sci Paris*, núm. 316, pàg. 799-804.
- FARDEAU, M.; D. HILLAIRE; C. MIGNARD [et al.] (1996).

- «Juvenile limb-girdle muscular dystrophy. Clinical, hispathological and genetic data from a small community living in the Reunion island». *Brain*, núm. 119, pàg. 295-308.
- FOUGEROUSSE, F.; O. BROUX; I. RICHARD [et al.] (1994). «Mapping of a chromosome 15 region involved in Limb-Girdle Muscular Dystrophy». *Hum Mol Genet*, núm. 3, pàg. 285-293.
- GREENBERG, D. S.; Y. SUNADA; K. P. CAMPBELL; D. YAFEE; U. NUDEL (1994). «Exogenous dp71 restores the levels of dystrophin associated proteins but does not alleviate muscle damage in *mdx* mice». *Nature Genet*, núm. 8, pàg. 340-344.
- HOFFMAN, E.; L. KUNKEL (1989). «Dystrophin abnormalities in Duchenne/Becker muscular dystrophy». *Neuron*, núm. 2, pàg. 1019-1029.
- KAWAI, H.; M. AKAIKE; T. ENDO [et al.] (1995). «Adhalin gene mutations in patients with autosomal recessive childhood onset muscular dystrophy with adhalin deficiency». *J Clin Invest*, núm. 96, pàg. 1202-1207.
- LANDOUZY, L.; J. DJERINE (1885). «De la myopathie atrophique progressive». *Rev Med*, núm. 5, pàg. 81-117; 253-366.
- LIM, L. E.; F. DUCLOS; O. BROUX [et al.] (1995). « β -Sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex». *Nature Genet*, núm. 11, pàg. 257-265.
- LJUNGGREN, A.; M. DUGGAN; E. MCNALLY [et al.] (1995). «Primary adhalin deficiency as a cause of muscular dystrophy in patients with normal dystrophin». *Ann Neurol*, núm. 38, pàg. 367-372.
- MATSAMURA, K.; F. M. S. TOMÉ; H. COLLIN [et al.] (1992). «Deficiency of the 50K dystrophin-associated glycoprotein in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy». *Nature*, núm. 359, pàg. 320-322.
- MATSAMURA, K.; I. NONAKA; F. M. S. TOMÉ [et al.] (1993a). «Mild deficiency of dystrophin-associated proteins in Becker muscular dystrophy patients having in-frame deletions in the rod domain of dystrophin». *Am J Hum Genet*, núm. 53, pàg. 409-416.
- MATSAMURA, K.; F. M. S. TOMÉ; V. V. IOANESCU [et al.] (1993b). «Deficiency of dystrophin-associated proteins in Duchenne muscular dystrophy patients lacking C-terminal domains of dystrophin». *J Clin Invest*, núm. 92, pàg. 866-871.
- MCNALLY, E.; R. PASSOS-BUENO; C. G. BÖNNEMANN [et al.] (1996). «Mild and severe muscular dystrophy caused by a single γ -sarcoglycan mutation». *Am J Hum Genet*, núm. 59, pàg. 1040-1047.
- MONACO, A. P.; L. M. KUNKEL (1988). «Cloning of the Duchenne/Becker muscular dystrophy locus». *Adv Hum Genet*, núm. 17, pàg. 61-98.
- NIGRO, V.; E. DE SA MOREIRA; G. PILUSO [et al.] (1996a). «Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy, LGMD2F, is caused by a mutation in the δ -sarcoglycan gene». *Nature Genet*, núm. 14, pàg. 195-198.
- NIGRO, V.; G. PILUSO; A. BELSITO [et al.] (1996b). «Identification of a novel sarcoglycan gene at 5q33 encoding a sarcolemmal 35 kDa glycoprotein». *Hum Mol Genet*, núm. 5, pàg. 1179-1186.
- NOGUCHI, S.; E. MC NALLY; K. BEN OTHMANE [et al.] (1995). «Mutations in the dystrophin-associated protein γ -sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy». *Science*, núm. 270, pàg. 819-822.
- OZAWA, E.; M. YOSHIDA; A. SUZUKI [et al.] (1995). «Dystrophin-associated proteins in muscular dystrophy». *Hum Mol Genet*, núm. 4, pàg. 11711-11716.
- PASSOS-BUENO, M. R.; J. R. OLIVEIRA; E. BAKKER [et al.] (1993a). «Genetic heterogeneity for Duchenne-like muscular dystrophy (DLMD) based on linkage and 50 DAG nalysis». *Hum Mol Genet*, núm. 2, pàg. 1945-1947.
- PASSOS-BUENO, M. R.; I. RICHARD; M. VAINZOF [et al.] (1993b). «Evidence of genetic heterogeneity for the autosomal recessive adults forms of limb-girdle muscular dystrophy following linkage analysis with 15q probes in Brazilian families». *J. Med Genet*, núm. 30, pàg. 385-387.
- PASSOS-BUENO, M. R.; E. S. MOREIRA; M. VAINZOF [et al.] (1995). «A common missense mutation in the adhalin gene in three unrelated Brazilian families with a relatively mild form autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy». *Hum Mol Genet*, núm. 4, pàg. 1163-1167.
- PASSOS-BUENO, M. R.; E. S. MOREIRA; M. VAINZOF; S. K. MARIE; M. ZATZ (1996). «Linkage analysis in autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy (ARLGMD) maps a xisth from to 5q33-34 (LGMD2F) and indicates that there is a least one more subtype of ARLGMD». *Hum Mol. Genet*, núm. 5, pàg. 815-820.
- PETROF, B. J.; J. B. SHRAGER; H. H. STEDMAN; A. M. KELLY; H. L. SWEENEY (1993). «Dystrophin protects the sarcolemma from stress developed during muscle contraction». *Proc Natl Acad Sci USA*, núm. 90, pàg. 3710-3714.
- PICCOLO, F.; S. L. ROBERDS; M. JEANPIERRE [et al.] (1995). «Primary adhalinopathy: a common cause of autosomal recessive muscular dystrophy of variable severity». *Nature Genet*, núm. 10, pàg. 243-245.
- PICCOLO, F.; M. JEANPIERRE; F. LETURCQ [et al.] (1996). «A founder mutation in the γ -sarcoglycan gene of Gypsies possibly predating their migration out of India». *Hum Mol Genet*, núm. 5, pàg. 2019-2022.
- RAFAEL, J. A.; G. A. COX; K. CORRADO [et al.] (1996). «Forced expression of dystrophin deletion constructs reveals structure-function correlations». *J Cell Biol*, núm. 134, pàg. 93-102.
- RICHARD, I.; O. BROUX; V. ALLAMAND [et al.] (1995).

- «Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A». *Cell*, núm. 81, pàg. 1-20.
- RICHARD, I.; L. BRENGUIER; P. DINÇER; C. ROUDAUT [*et al.*] (1997). «Multiple independent molecular etiology for limb-girdle muscular dystrophy type 2A from various geographical origins». *Am J Hum Genet*, núm. 60, pàg. 1128-1138.
- ROBERDS, S. L.; R. D. ANDERSON; O. IBRAGHIMOV-BESKROVNAYA; K. P. CAMPBELL (1993). «Primary structure and muscle-specific expression of the 50-kDa dystrophin-associated glycoprotein (adhalin)». *J Biol Chem*, núm. 268, pàg. 23739-23742.
- ROBERDS, S. L.; F. LETURCQ; V. ALLAMAND [*et al.*] (1994). «Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy». *Cell*, núm. 78, pàg. 625-633.
- SORIMACHI, H.; S. IMAJOH-OHMI; Y. EMORI; H. KAWASAKI; S. OHNO; Y. MINAMI; K. SUZUKI (1989). «Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and mu-type. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle». *J Biol Chem*, núm. 264, pàg. 20106-20111.
- SORIMACHI, H.; T. C. SAIDO; K. SUZUKI (1994). «New era of calpain research Discovery of tissue-specific calpains». *FEBS Lett*, núm. 343, pàg. 1-5.
- WANG, K. W.; A. VILLALOBO; B. D. ROUFOGALIS (1989). «Calmodulin-binding proteins as calpain substrates». *Biochem J*, núm. 262, pàg. 693-706.
- WALTON, J. N.; F. J. NATTRASS (1954). «On the classification, natural history and treatment of the myopathies». *Brain*, núm. 77, pàg. 169-231.
- YOUNG, K.; T. FOROUD; P. WILLIAMS [*et al.*] (1992). «Confirmation of linkage of limb-girdle muscular dystrophy, type 2, to chromosome 15». *Genomics*, núm. 13, pàg. 1370.
- ZUBRYCKA-GAARN, E. E.; D. E. BULMAN; G. KARPATI [*et al.*] (1988). «The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle». *Nature*, núm. 333, pàg. 466-469.