

INTRODUCCIÓ

1. FISIOLÒGIA DEL MÚSCUL

Les fibres musculars estan constituïdes per nombroses subunitats paral·leles denominades miofibrilles, les quals consisteixen en una sèrie d'unitats repetides longitudinalment que són els sarcòmers, delimitats per les línies Z (Figura 1)

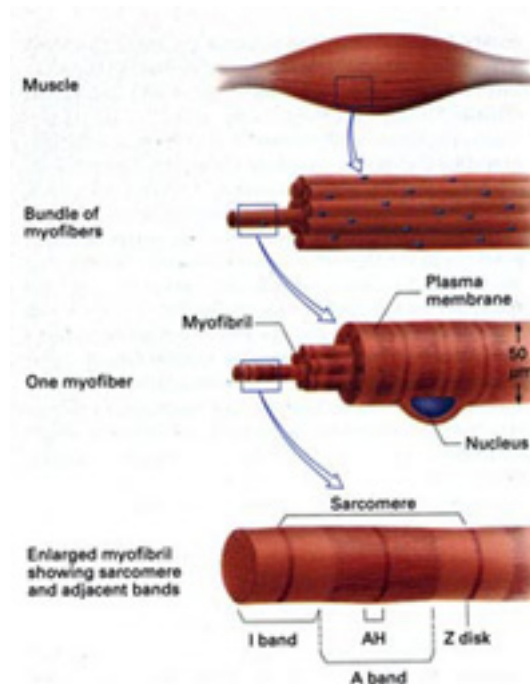


Figura 1: Estructura del sarcòmer com a unitat funcional de la fibra muscular (Darnell 1990).

El sarcòmer és la unitat funcional del múscul estriat, on es produeix la interacció entre els filaments intercalats d'actina (filaments prims) i miosina (filaments gruixuts), responsable de la funció contràctil i la seva integritat és, per tant, clau en el procés de la contracció muscular. En aquest procés l'escurçament i allargament dels filaments i l'esllavissament entre ells serà la base de la contracció (Eckert 1988) (Figura 2).

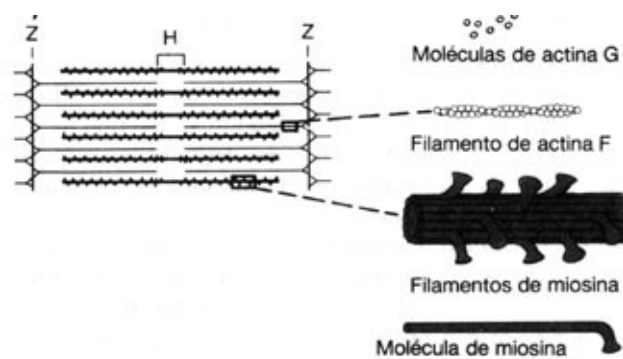
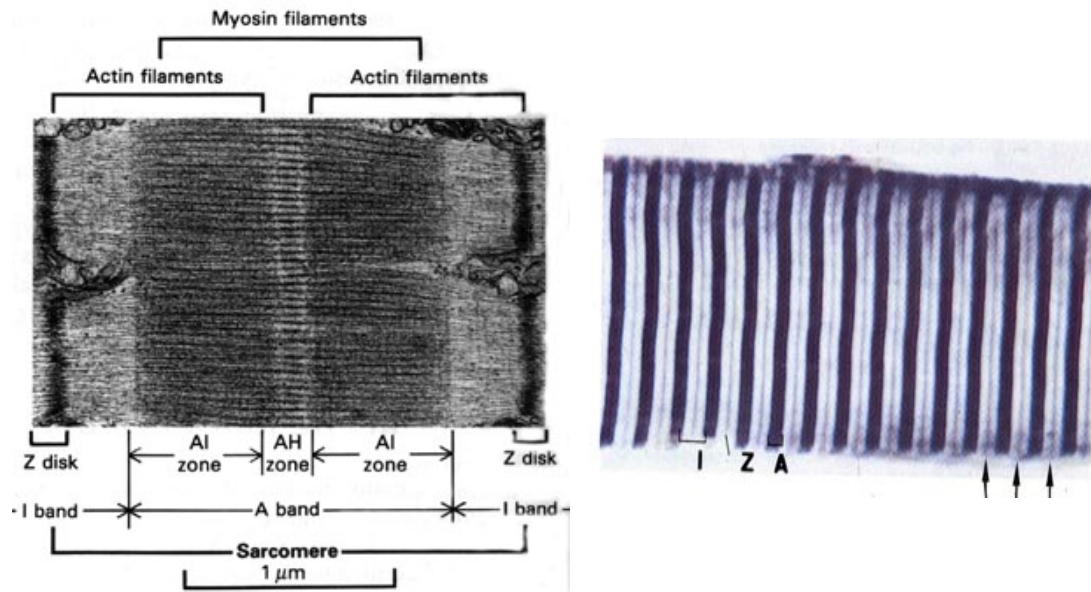


Figura 2: Disposició dels filaments d'actina i miosina al sarcòmer (Eckert 1988)

Al sarcòmer es poden observar diferents bandes:

- els filaments gruixuts conformen les bandes A
- la banda H seria la zona més clara dins la banda A
- les bandes I es troben entre dos bandes A
- al mig de les bandes I es troben les línies Z

En les figures 3 i 4 podem observar les diferents bandes a nivell microscòpic



Figures 3 i 4 : micrografies del sarcòmer on es poden apreciar les bandes A, I, Z i H.(Darnell 1990 i Weather 1987)

El calci juga un paper clau en la interacció entre actina i miosina, doncs permet un canvi en la disposició de la tropomiosina que al final permetrà la correcta interacció entre actina i miosina (Figura 5).

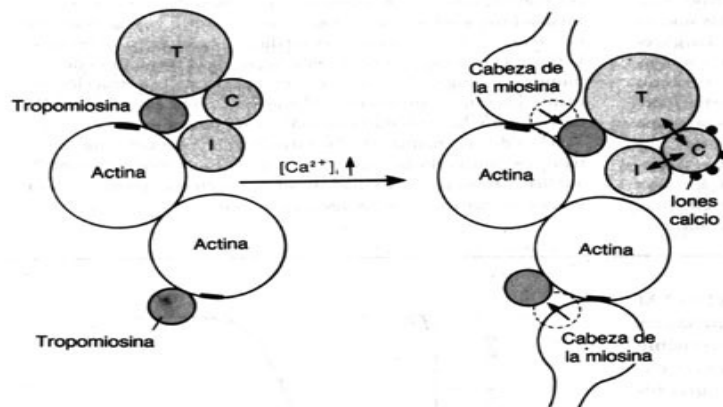
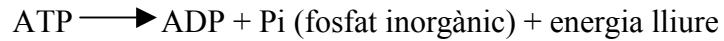
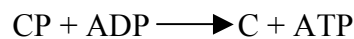


Figura 5: Es pot observar com l'entrada de ions Calci desplaça la tropomiosina i permet així la interacció actina-miosina (Eckert 1988).

El reticle sarcoplasmàtic acumula ions calci i els allibera cap el sarcoplasma (Eckert 1988). El potencial d'acció que despolaritza la membrana és el que provocarà l'alliberament de calci. També potencials sinàptics, en alguns músculs, poden produir aquesta despolarització. La font immediata d'energia pel procés contràctil és l'ATP (adenina trifosfat), que es transforma:



La concentració d'ATP al múscul, no obstant, és només de 2-4 mM, doncs és utilitzat ràpidament en la contracció sostinguda. L'ATP es regenera molt de pressa per refosforil·lació de l'ADP (adenina difosfat), actuant com a donant del grup fosfat d'alta energia un compost fosfàgen mitjançant l'acció d'un enzim. El compost fosfàgen és el fosfat de creatina (CP) i l'enzim creatin kinasa catalitza la reacció:



Aquesta reacció es produeix lliurement per tal de suministrar ATP durant l'exercici. El nivell d'ATP en el múscul no presenta un descens substancial fins que no s'ha esgotat la reserva de fosfàgen (Eckert 1988). Com veurem, l'activitat d'aquest enzim (CK) resulta útil com a marcador en malalties musculars.

Des d'un punt de vista fisiològic, podem establir 2 subtipus de fibres al múscul esquelètic, en funció de la seva especialització (veure Figura 6):

- fibres tòniques
- fibres fàsiques

Les **tòniques** estarien especialitzades en una contracció lenta continua, i es poden trobar, per exemple, en els músculs extraoculars. No produeixen potencials d'acció i no els precisen per propagar l'excitació, tenint lloc aquesta gràcies a repetides sinapsis al llarg de tota la fibra. Les **fàsiques** estarien especialitzades en una contracció espasmòdica a moviments ràpids de les extremitats. Podem subdividir les fàsiques en diferents subtipus:

- lentes
 - ràpides
- glucolítiques
 - oxidatives

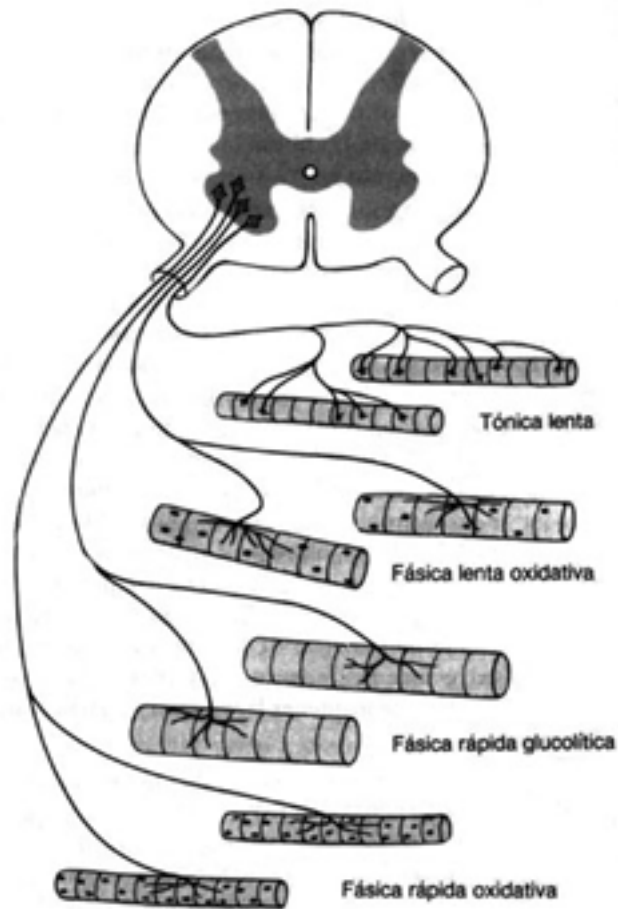


Figura 6: Tipus de fibres al múscul esquelètic (Eckert 1988)

Les **fibres de contracció lenta** són resistents a la fatiga, es troben als músculs posturals de mamífers i intervenen en moviments lents i iteratius. Generen potencials d'acció del tipus tot-o-res i per tant, es contrauen en resposta a impulsos motors nerviosos amb contraccions fàssiques lentes del tipus tot-o-res. Es fatiguen molt lentament, probablement degut a que contenen un gran nombre de mitocondris i utilitzen ATP a una velocitat relativament lenta. Les **fibres fàssiques ràpides glucolítiques** es contrauen ràpidament en part per l'activitat ATPasa de la miosina, que té un recanvi molt elevat, es fatiguen de seguida i contenen molt pocs mitocondris. Finalment, les **fibres fàssiques ràpides oxidatives** es fatiguen lentament, doncs amb el seu gran nombre de mitocondris són capaces de produir ATP ràpidament per fosforil.lació oxidativa. Així, s'especialitzen en moviments ràpids i repetitius (Eckert 1988).

2. LA UNIÓ NEUROMUSCULAR

El moviment efectiu precisa que la contracció de diversos músculs estigui correctament sincronitzada. Aquest ritme ve regulat per la distribució temporal dels impulsos motors generats pel sistema nerviós central. A més, és necessari que el grau de força en la contracció de cada múscul estigui regulat pel sistema nerviós. El múscul esquelètic està inervat per motoneurons, les quals tenen els somes localitzats en l'asta ventral de la substància gris de la medulla espinal. L'axó motor abandona la medulla a nivell d'una arrel ventral, continua fins al múscul a través d'un tronc nerviós perifèric i finalment es ramifica repetidament per tal d'inervar bé unes poques o bé moltes, fins a més de 1000, fibres musculars esquelètiques, depenent del tipus de múscul. La motoneurona i les fibres musculars inervades per ella formen una unitat motora (Eckert 1988).

La unió neuromuscular és un complex ensamblatge de proteïnes en el terminal nerviós presinàptic, la membrana postsinàptica de la fibra muscular i la làmina basal. En el múscul normal, la membrana postsinàptica es desplega característicament en nombrosos grups o plecs, les crestes dels quals són adjacents al terminal nerviós i contenen els receptors d'acetilcolina, a una concentració 1000 vegades més gran que a regions de la fibra muscular on no hi ha unió neuromuscular (Rafael 2000).

En les Figures 7 i 8 podem observar el procés d'una sinapsi química, des de l'arribada d'un potencial d'acció, passant per l'acció del calci i els neurotransmissors fins a la propagació del potencial.

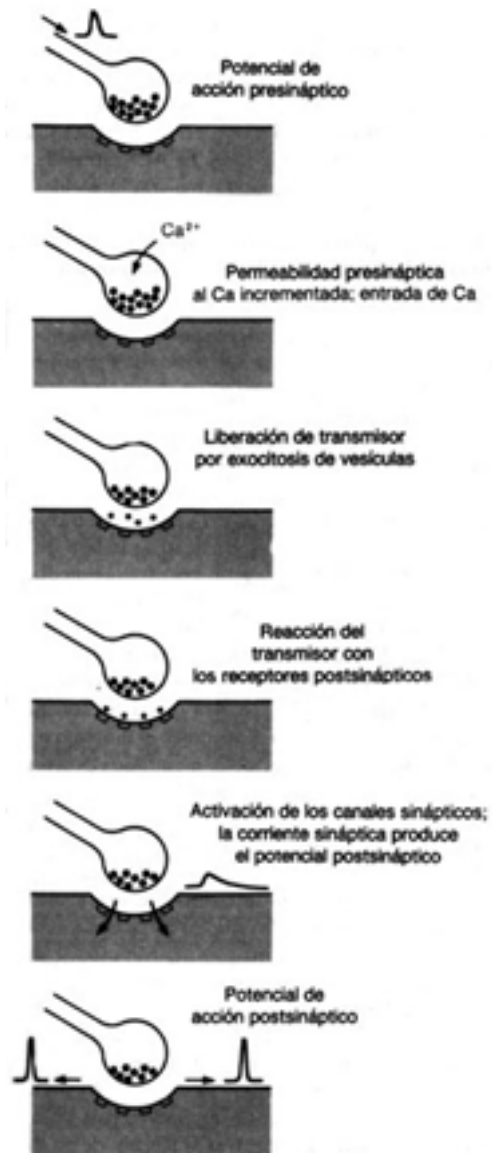


Figura 7: L'arribada d'un potencial desencadena una sèrie de processos, amb intervenció del calci i els neurotransmissors, generant-se al final un potencial post-sinàptic (Eckert 1988).

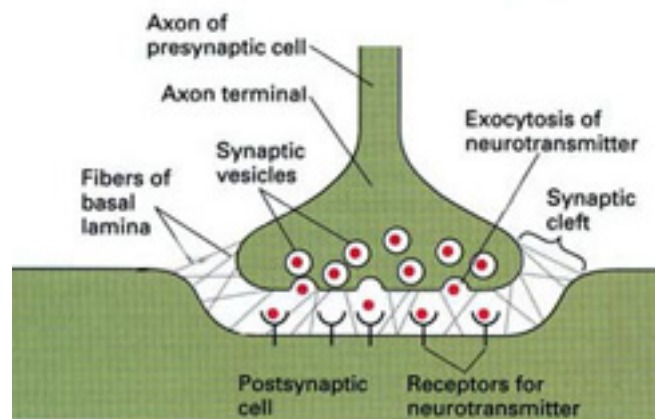


Figura 8: Estructura d'una sinapsi química. La transmissió d'impulsos elèctrics requereix l'alliberament de neurotransmissors per part de la cèl·lula pre-sinàptica, la seva difusió i unió a receptors específics de la membrana post-sinàptica (Darnell 1990).

A la base dels plec postsinàptics es concentren canals de sodi dependents de voltatge (Bewick 1992). El paper d'aquesta disposició es creu que pot ser el d'enfocar de forma directa i completa el fluxe cap als canals dependents de voltatge, amplificant així l'efecte transmissor alliberat (Martin 1994) i assegurant una transmissió efectiva (Wood 1997). L'arribada d'un potencial d'acció (originat com a conseqüència d'un senyal sinàptic a la motoneurona) als terminals axònics motors provoca l'alliberament del neurotransmissor acetilcolina. A la placa motora, aquest potencial d'acció obre canals que transporten un corrent sinàptic despolaritzant que, a la seva vegada, desencadena un potencial d'acció del tipus tot-o-res a la membrana superficial de la fibra muscular. Aquest potencial d'acció es propaga des de la placa motora o sinapsi neuromuscular en ambdues direccions, excitant així la membrana de la fibra muscular per complet. El potencial d'acció posa en marxa la seqüència d'aconteixements que condueixen a la contracció i el mecanisme contràctil respon amb una latència d'uns quants milisegons després del pic del potencial d'acció. Per tant, sempre que tingui lloc un potencial d'acció, la fibra muscular estriada típica respondrà amb una contracció fàstica del tipus tot-o-res (veure Figura 9). Cada cop que la motoneurona descarrega (generant un potencial d'acció, veure figura 10), totes les fibres musculars de la unitat motora són activades completament a causa de l'alliberament de neurotransmissor en tots els terminals motors d'aquesta neurona (Eckert 1988).

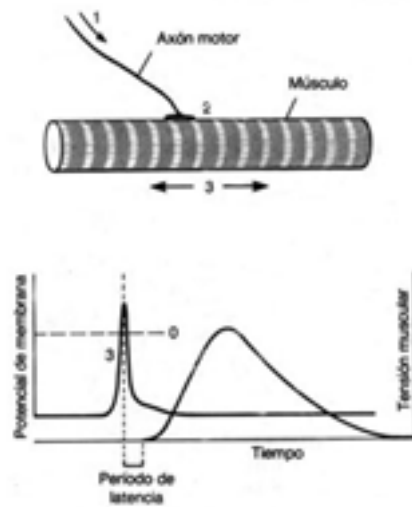


Figura 9: Excitació de la fibra muscular. El potencial d'acció en el nervi motor porta a la formació d'un potencial post-sinàptic que es propaga com un potencial d'acció en el múscul. El potencial d'acció a la fibra muscular va seguit, després d'un període de latència, d'una resposta del tipus tot-o-res, la contracció muscular (Eckert 1988).

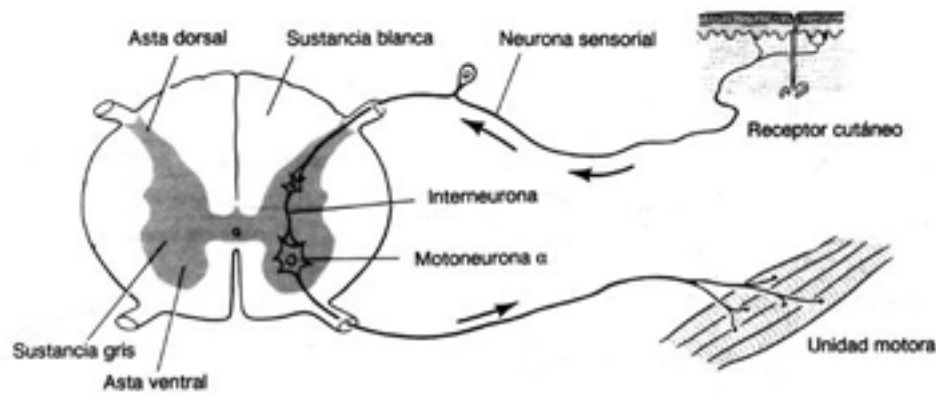


Figura 10: Podem observar com l'activació de la motoneurona condueix a la contracció del grup de fibres musculars que inerva (unitat motora) (Eckert 1988).

La quantitat de tensió produïda per una sola fibra muscular està estretament relacionada amb la concentració de Ca^{2+} lliure en el sarcoplasma, el qual és, a la seva vegada, funció del potencial de membrana. Per tal d'aconseguir un augment de la tensió total del múscul en forma gradual, té lloc un reclutament progressiu d'un major nombre d'unitats motores actives, així com una variació de la freqüència amb que descarrega la

població de motoneurons (Eckert 1988). Un pas clau en la formació de l'aparell postsinàptic és l'acumulació de receptors d'acetilcolina en forma d'agregats d'alta densitat en la membrana postsinàptica (Hall 1993). S'ha demostrat que la laminina indueix l'agregació de receptors d'acetilcolina en miotubs en cultiu per un mecanisme que implica a l' α -dístroglicà (Sugiyama 1997). Se sap que els canals de sodi co-purifiquen amb proteïnes com la distrofina i la sintrofina (components del complex distrofina-glicoproteïna, del que parlarem en endavant). Les interaccions amb la sintrofina poden representar un dels mitjans de localització dels canals de sodi en la unió neuromuscular (Wood 1998). Els canals de sodi dependents de voltatge es troben a elevades concentracions no només a la unió neuromuscular sino també a zones perifèriques. Aquest fet té una significació funcional doncs el llindar de potencial d'acció a la unió neuromuscular és inferior al d'àrees perifèriques. Aquesta particularitat, juntament amb els plecs postsinàptics proveeixen un gran marge de seguretat per la transmissió neuromuscular (Wood 1997). El paper de la distrofina en la determinació d'aquesta situació sembla no ser directe, donat que és una proteïna que no es concentra amb canals de sodi en àrees perifèriques a la unió neuromuscular. L'acetilcolinesterasa és la responsable de l'hidròlisi ràpida d'acetilcolina a la unió neuromuscular i està molt concentrada en la làmina basal de la unió. L'acetilcolinesterasa sinàptica depèn del patró d'activació muscular (Sketelj 1998). L'activitat més elevada d'acetilcolinesterasa en la unió neuromuscular en fibres musculars ràpides respecte de les lentes pot facilitar la ràpida hidròlisi d'acetilcolina que es requereix per la transmissió d'impulsos nerviosos al múscul a freqüències molt altes.

3. EL COMPLEX Distrofina-GLICOPROTEÏNA (DGC)

En parlar de la unió neuromuscular ja hem vist la importància de certes proteïnes com la distrofina, la laminina, la sintrofina i l' α -dístroglicà tant per la seva localització en parts clau de dita unió com per la inducció de concentració d'elements també imprescindibles en la funció neuromuscular. Així, el complex distrofina-glicoproteïna (DGC) engloba aquestes i altres proteïnes amb una clara implicació en diferents distròfies musculars. Si bé s'han pogut establir relacions entre elles, es coneix encara poc sobre les seves funcions i regulació i resta per aclarir com l'absència d'aquestes proteïnes sarcolèmiques específiques provoca la mort de la fibra muscular (Porter 2000). D'altra banda, com veurem, s'ha demostrat que mutacions en gens que codifiquen per proteïnes que interaccionen directa o indirectament amb la distrofina són les responsables de diverses distròfies musculars (Laing 1999).

El primer descobriment d'una proteïna associada a la distrofina el van fer Campbell i Kahl (1989), que van demostrar l'associació de la distrofina amb una glicoproteïna de membrana integral. Així, a més de la distrofina, hi han tota una sèrie de proteïnes transmembrana, integrals i citoplasmàtiques que fan de nexa d'unio entre els elements contràctils miofibrilars citoplasmàtics i les molècules de transducció de senyal de la matriu extracel.lular, a més de proveir suport estructural i integritat al sarcolema.

El complex DGC està format per (veure Figura 11):

- la distrofina
- els distroglicans (α , extracel.lular i β , integral de membrana)
- els sarcoglicans (α , β , γ i δ , transmembrana)
- les sintrofines (α , β 1 i β 2, totes citoplasmàtiques)
- les distrobrevines (α 1 i α 2, subsarcolèmiques)
- la laminina α 2 (merosina, extracel.lular)
- el sarcospan (integral)
- l' α -actinina-2 (citoplasmàtica) recentment s'ha vist que també forma part del complex

Revisat a: Bushby 1999a, Bushby 1999b, Laing 1999, Porter 2000, Watkins 2000.

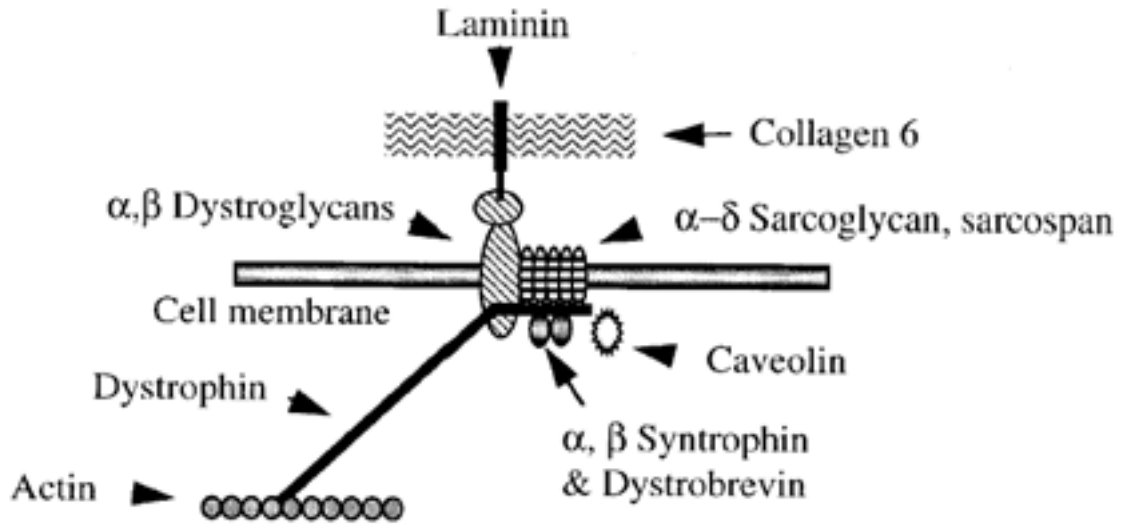


Figura 11: Esquema del complex distrofina-glicoproteïna (1) (Laing 1999)

Aquest complex pot definir-se com una estructura proteica transmembrana que connecta la matriu extracel·lular amb el citoesquelet muscular. El citoesquelet de la fibra muscular esquelètica és una xarxa molecular extremadament complexa. El complex DGC es va purificar per primer cop a partir de membranes de múscul esquelètic de conill solubilitzades amb digitonina (Ervasti 1990). A la Figura 12 podem veure una altra aproximació de com podria ser aquest complex.

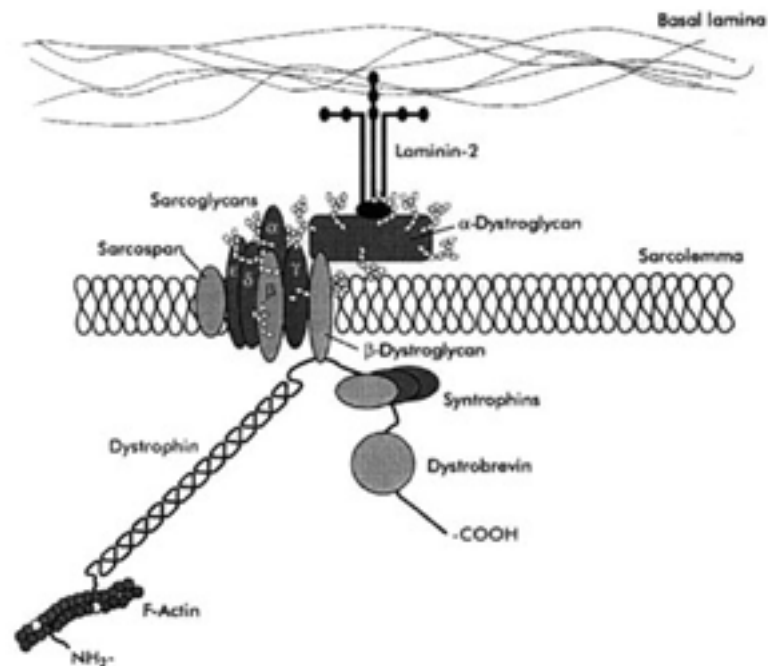


Figura 12 : Esquema del complex distrofina-glicoproteïna (2) (Bushby 1999a)

3.1 La distrofina

És una proteïna dimèrica citoesquelètica de 427 kilodalton (kDa) i 3562 aminoàcids amb 4 dominis estructurals (Koenig 1988) (Veure Figura 13).

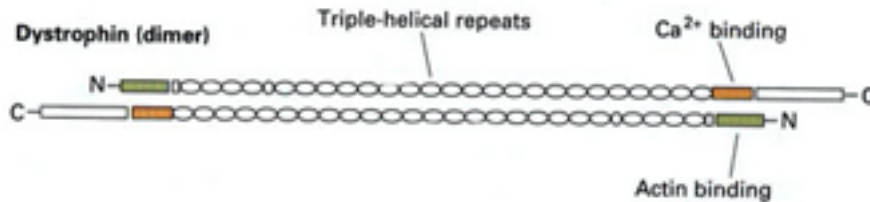


Figura 13: Dímer de distrofina (Darnell 1990)

El domini N-terminal presenta homologia amb l' α -actinina i s'uneix a la F-actina, component del citoesquelet (Corrado 1994, Fabrizio 1993). Aquest domini va seguit d'una gran regió de 24 repeticions que té homologia amb la β -espectrina, interrompuda per 4 regions *hinge* (Ahmed 1998). La darrera de les regions *hinge* codifica per un domini WW, sovint implicat en la unió a proteïnes amb seqüències riques en prolines (Bork 1994). El domini *rod* o vareta *espectrin-like* va seguit d'un domini ric en cisteïnes que conté una similitud aminoacídica amb el braç EF de l' α -actinina i on s'uneix Ca^{2+} (Koenig 1988). El domini C-terminal de la distrofina conté exons que pateixen *splicings* específics de teixit i desenvolupament (Feener 1989). Els dominis rics en cisteïnes i C-terminal són de gran importància en la unió amb el complex DGC (Rafael 2000). A la figura 14 es pot observar l'estructura de les diferents isoformes de la distrofina.

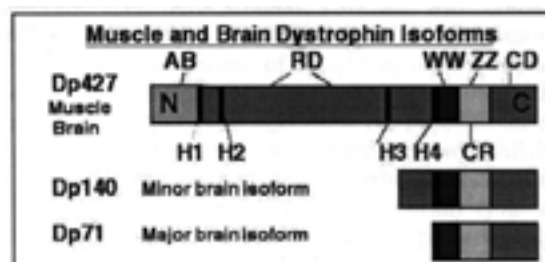


Figura 14: Isoformes de la distrofina amb els seus dominis (Culligan 2001)

La distrofina és la proteïna alterada en la distròfia muscular de Duchenne (DMD) i es localitza per sota de tota la membrana sarcolèmica del múscul esquelètic. Aquesta afecció dóna lloc a canvis histològics importants, essent les fibres més petites i desorganitzades (veure Figura 15) (Darnell 1990).

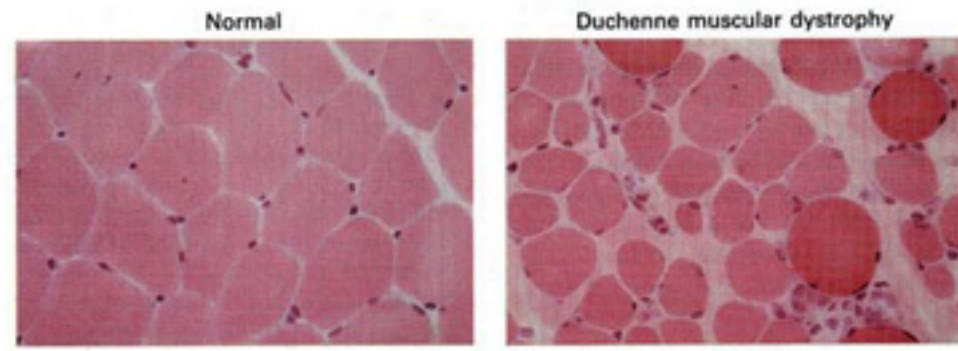


Figura 15: Micrografia on es pot veure de forma comparativa un múscul normal i un corresponent a un individu afecte de distròfia muscular de Duchenne (Darnell 1990)

A principi dels anys 90 ja es van començar a descriure llocs potencials d'unió al domini N-terminal de l'actina i d'unió a l'extrem C-terminal de distroglicans i distrofines (Corrado 1994, Ahn 1995, Jung 1995, Suzuki 1994 i 1995, Yang 1995). Per la seva part C-terminal, la distrofina s'uneix al β -distroglicà, el qual fa de pont entre la distrofina i d'altres proteïnes que conformen el complex DGC i també contacta per aquest extrem amb les sintrofines i la distrobrevina.

Tot i que l'absència de distrofina és causa demostrada de la distròfia muscular de Duchenne, l'efecte exacte d'aquesta pèrdua en la fisiologia funcional encara no es coneix bé. Donat que els membres del complex DGC estan íntimament interrelacionats i de manera interdependent, és possible que les conseqüències patològiques de les mutacions en el gen de la distrofina puguin tenir tant a veure amb les funcions cel.lulars de les proteïnes associades com amb la pròpia distrofina (Watkins 2000). A partir d'experiments de mutagènesi es va veure que la distrofina, sense certes regions riques en cisteïna, no podia estar unida als distroglicans i als sarcoglicans. A més, això va permetre descobrir que la presència dels sarcoglicans depèn de la unió de la distrofina amb el β -distroglicà (Rafael 2000). L'absència de distrofina desplaça altres proteïnes del complex DGC del sarcolema, donant lloc a la degeneració-regeneració cíclica del múscul. S'ha observat una fragilitat i permeabilitat sarcolèmica més grans en membranes deficientes en distrofina (Pasternak 1995). L'homeostàsi del calci també

podria estar alterada en les distrofinopaties primàries, doncs s'ha demostrat que hi ha una elevació del calci a ratolins *mdx* (Reeve 1997). L'increment de calci podria, per la seva banda, activar enzims dependents de calci que podrien contribuir al dany muscular.

3.2 Altres components del DGC

Els α i β -dístroglicans interaccionen directament amb la distrofina i la seva expressió és ubiqüa (Mizuno 1994a). En teixit cerebral i fibres nervioses perifèriques, aquestes proteïnes funcionen generalment com a receptors de laminina (Watkins 2000). El nexce de la distrofina amb els components integrals de la membrana té lloc per mitjà del β -dístroglicà (Suzuki 1994). L' α -dístroglicà funciona com un receptor per la laminina $\alpha 2$ múscul-específica en la matriu extracel.lular (Smalheiser 1995) i pot contribuir al *clustering* de receptors d'acetilcolina en la unió neuromuscular (Peng 1998). Tant l' α com el β -dístroglicà es situen clarament a la membrana (Cullen 1998). Sembla que els dístroglicans són essencials per l'homeostàsi i mutacions que provoquen la total pèrdua d'ells són letals (Jung 1995). Un estudi indica que mutacions en el β -dístroglicà causen una distròfia muscular de maluc (LGMD) i la disfunció dels dístroglicans s'ha implicat en la patogènesi de diverses malalties neuromusculars (Yamada 2001). El β -dístroglicà, com a proteïna integral de membrana, està unit a l' α -dístroglicà i al complex dels 4 sarcoglicans intramembrana.

Els sarcoglicans són proteïnes transmembrana de funció desconeguda (Straub 1997a, Ozawa 1998). Dels sarcoglicans coneguts, l' α i el γ s'han trobat només a múscul esquelètic i cardíac mentre que la resta tenen una distribució ubiqüa (Ettinger 1997, McNally 1998a). El conjunt dels sarcoglicans és un component clau del DGC, per tal que hi hagi un ancoratge estable de l' α -dístroglicà a la cara extracel.lular del sarcolema i aquest es mantingui intacte (Holt 1998a). Estudis recents han demostrat que l' α -sarcoglicà es localitza en la superfície exterior del sarcolema i que les formes β i δ es localitzen a la superfície interna (Wakayama 1999).

El sarcospan és un complex sarcolèmic amb múltiples subunitats, té una expressió ubiqüa respecte d'un dels seus trànscrips però presenta un trànscrip més gran expressat exclusivament en múscul esquelètic i cardíac i s'associa amb els sarcoglicans. Al múscul esquelètic, el sarcospan és especialment abundant a unions neuromusculars i miotendinoses. La seva expressió depèn de la presència del complex sarcoglicà (Crosbie

1999). Se sap que la seva presència es redueix molt en músculs afectats per distròfia muscular de Duchenne en relació a múscul normal, i dita reducció podria contribuir al fenotip distròfic (Crosbie 1997).

Les distrobrevines, a més d'interaccionar amb la distrofina, també ho fan amb les sintrofines (Porter 2000, Toniolo 1999). Les formes alfa 1 i alfa 2 es troben a múscul esquelètic. Durant el desenvolupament, la forma alfa 1 es troba en la superfície cel·lular i zones riques en receptors d'acetilcolina del miotub (Nawrotzki 1998). La forma alfa 2 es concentra en la sinàpsi però també és present en el sarcolema extrasinàptic en múscul madur (Peters 1998). L'associació de l' α -distrobrevina amb la regió sinàptica suggereix que pot tenir un paper en la formació i/o estabilitat de la sinapsi (Saudolet-Puccio 1997). La quantitat d' α -distrobrevina es troba severament reduïda en pacients amb distròfia muscular de Duchenne i en pacients amb LGMD resultat de pèrdua d'un o tots els sarcoglicans (Puca 1998).

Les sintrofines constitueixen un grup heterogeni de proteïnes intracel·lulars que s'uneixen a la distrofina i que estan associades a la membrana. La sintrofina $\alpha 1$ es localitza a la superfície interna del sarcolema del múscul esquelètic i cardíac i interacciona amb la distrofina (Ahn 1996, Suzuki 1995, Yang 1995). Les sintrofines $\beta 1$ i $\beta 2$ es troben a múscul i altres teixits (Ahn 1996). S'ha vist que la forma alfa 1 col·localitza amb la sintasa d'òxid nítric neuronal (nNOS) al sarcolema i pot unir-se a ella (Wakayama 1997). En absència de distrofina aquest enzim canvia la seva localització. És clar que l'absència de nNOS del sarcolema impedeix adaptar el fluxe sanguini als increments d'activitat metabòlica (Bredt 1998). Tot plegat veiem una relació entre components estructurals i elements amb un paper més regulador, exercint probablement una funció clau en el manteniment de la integritat muscular durant la contracció.

Les laminines són heterodímers compostos per cadenes α , β i γ , localitzades a les membranes basals. Al múscul esquelètic i als teixits neurals, les laminines interaccionen amb les integrines i amb l' α -dystroglicà, permetent així la unió física entre la matriu extracel·lular i el citosquelet muscular (Miyagoe-Suzuki 2000). Es creu que la laminina és essencial per la formació de les membranes basals a través d'interaccions amb ella mateixa i altres molècules (Timpl 1996). Al múscul esquelètic, les laminines constitueixen els principals lligams pels receptors de superfície cel·lular implicats en la transmissió de força des de l'interior de la cèl·lula, però podrien també influenciar en els aconexions de transmissió de senyals durant la formació i regeneració del múscul

(Gullberg 1999). És per això que la fisiopatologia de la distròfia muscular deu implicar necessàriament altres mecanismes diferents a la desestabilització estructural del sarcolema. No obstant, treballs recents postulen que aquest trencament té lloc i que les cèl.lules musculars madures entren en apoptosi (McGowan 2000).

S'ha vist que la distrofina interacciona amb l' α -actinina-2 i l'actina del múscul esquelètic (Hance 1999). A la figura 16 podem veure el complex DGC amb l' α -actinina-2.

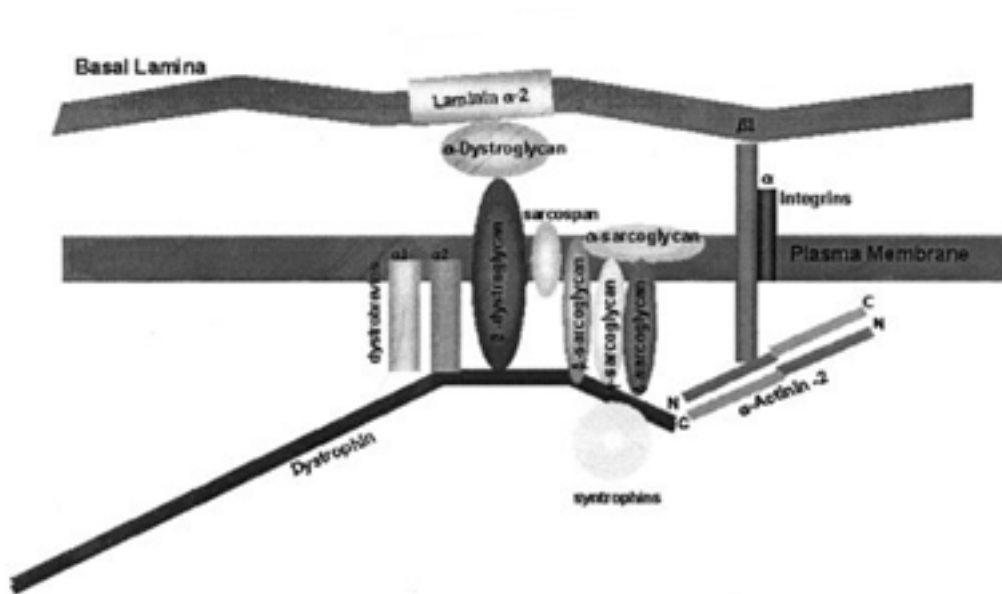


Figura 16: Complex Distrofina-Glicoproteïna amb l' α -actinina-2 (Watkins 2000).

4. LA FILAMINA

Si bé no s'ha considerat com un component clàssic del complex DGC, aquesta proteïna que lliga actina (*actin-binding protein*), en les seves diverses isoformes, juga un paper essencial en el manteniment de l'integritat de la membrana durant l'aplicació d'una força (Thompson 2000), a més d'estar implicada en la reorganització de l'actina i en cascades de transducció de senyal associades amb migració cel.lular, adhesió, diferenciació, transducció de força i supervivència (Thompson 2000). Forma part del grup de les *actin-crosslinking proteins*, les quals actuen creant feixos estables de filaments d'actina disposats paral.lelament, facilitant el seu ancoratge a la membrana (Hock 1999) o estabilitzant xarxes bi i tridimensionals de propietats elàstiques (Janmey 1991). Així, podem integrar-la en el complex DGC (veure Figura 17).

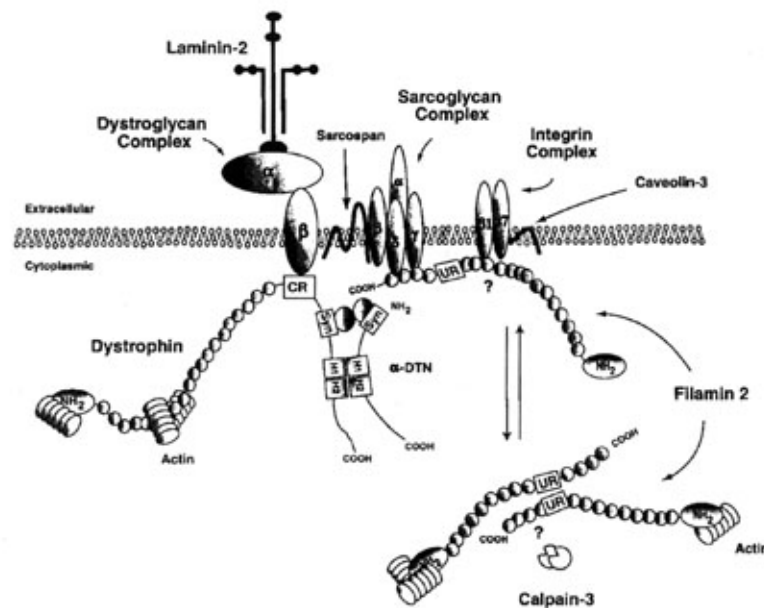


Figura 17: Complex DGC i interacció amb la filamina (Thompson 2000)

4.1 Característiques i isoformes

Fins ara s'han descrit 3 isoformes: la primera, anomenada ABP-280 (d'on ve el nom *actin-binding protein*) (Wang 1975, Brotschi 1978), el gen de la qual (FLN1) es troba a Xq28 (Gorlin 1993); la segona o ABP-L o γ filamina o FLNC (Maestrini 1993, Xie 1998), el gen de la qual (FLN2) està mapat a 7q32-q35 (Gariboldi 1994); finalment

la isoforma β filamina, que sembla ser un lligam de la *glicoproteïna Ib* α , amb localització cromosòmica a 3p14.3 (Takafuta 1998, Xu 1998). A la figura 18 podem observar les diferències entre les isoformes 1- β i la γ . Les 3 isoformes presenten una construcció molecular essencialment idèntica: un domini aminoterminal d'unió a actina, seguit de 24 repeticions, totes elles presentant un plec *immunoglobulin-like* (Hock 1999) i un domini carboxiterminal implicat en la formació de dímers de filamina (Davies 1980, Gorlin 1990). La isoforma FLN2 s'expressa a múscul esquelètic i cardíac (van der Ven 2000a, Thompson 2000, Chakarova 2000) i es diferencia de les altres isoformes en la inserció d'una seqüència que inicialment es va estimar en 82 aminoàcids en la repetició 20 (Xie 1998) i més tard en 78 aminoàcids, dins del domini *Ig-like*, codificats per un exó extra d'*splicing* alternatiu (van der Ven 2000a i b). A la figura 19 es compara l'estructura de les isoformes humanes ABP-280 i β amb la forma de pollastre.

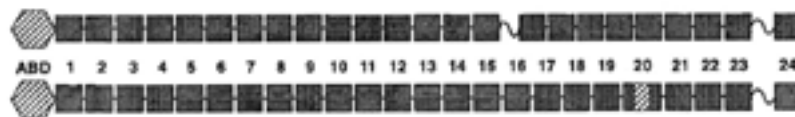


Figura 18: a la part superior, l'estructura comuna de les isoformes α i β i a la part inferior, l'estructura de la isoforma γ . Veiem que a la isoforma γ no trobem la regió *hinge* entre els dominis *Ig-like* i que aquesta presenta una inserció en mig del domini 20 (van der Ven 2000b)



Figura 19: Estructures comparatives de les filamines. A la part superior, la forma de pollastre. En segon terme, la forma ABP-280 humana i a la part inferior la forma β humana (Takafuta 1998).

4.2 Funcions i interaccions

Les filamines juguen un paper en la polimerització de l'actina, un procés crític per la regulació de l'aparell contràctil al múscul esquelètic, a més d'intervenir en l'estructura cel·lular, l'organització dels receptors de membrana i la mecanoprotecció en altres teixits. Sembla tenir un paper en la xarxa trans-Golgi (Liu 1997) i jugar un paper clau en la transmissió de senyals al citosquelet d'actina (van der Ven 2000a). La forma 2 o γ de la filamina (FLN 2 o FLN γ) interacciona amb el γ i δ -sarcoglicans, components del complex DGC (Thompson 2000) i també interacciona amb la miotilina, proteïna sarcomèrica d'unió a α -actinina que, com veurem, és la responsable d'una de les formes descrites de LGMD autosòmica dominant (van der Ven 2000b). La FLN2 està localitzada en les línies Z, tant en fibres musculars esquelètiques lentes com ràpides, en les unions miotendinoses i a la membrana sarcolèmica del múscul esquelètic (van der Ven 2000a). L'elevada concentració de filamina que hi ha en les unions miotendinoses i els discs intercal·lats implica un paper important en l'organització dels filaments primis en llocs on s'ha de resistir una tensió mecànica més gran (van der Ven 2000a). Altres observacions indiquen que pacients amb mutacions en γ -sarcoglicà, δ -sarcoglicà o distrofina (afectes de LGMD i DMD) presenten un increment del contingut de FLN2 a la membrana plasmàtica en comparació amb individus normals i en canvi, pacients amb miopatia general tenen un contingut normal en FLN2 (Thompson 2000). La filamina és la primera proteïna identificada que connecta efectes relacionats amb la membrana amb defectes miofibrilars. Una LGMD pot, aleshores, ser causada per 2 aconteixements moleculars interdependents: un, la desestabilització dels complexos d'adhesió a la membrana i l'altre, l'enfebliment de les miofibrilles i/o connexions miofibrilars, especialment al disc Z. Un exemple el podríem trobar en una de les darreres formes descrites de LGMD (la recessiva 2G), que està relacionada amb mutacions en la proteïna del disc Z teletonina (Moreira 2000), implicada en processos de senyalització durant el desenvolupament miofibrilar (Mayans 1998). Un altre paral·lelisme interessant el presenta la proteïna caveolina-1, isoforma de la caveolina-3 (implicada en una de les formes autosòmiques dominants de LGMD), doncs s'ha vist que la caveolina-1 s'uneix a dues isoformes de la filamina, la FLN1 i la β (Stahlhut 2000). Considerant l'alt grau de similitud de les isoformes d'ambdues proteïnes, la isoforma muscular de la caveolina o caveolina-3 podria perfectament interaccionar d'una forma similar amb la filamina muscular, si bé s'hauria de demostrar (van der Ven 2000b). També s'ha descrit una

interacció entre una proteïna anomenada miozenina tant amb la FLN2 com amb l' α -actinina, estant les tres co-localitzades a les línies Z (van der Ven 2000b). Així, podent-se considerar un nou membre del complex DGC, la FLN2 o filamina C esdevé un gen candidat en pacients afectes de LGMD que no presenten mutacions en cap dels gens coneguts com a implicats en diferents formes de LGMD. De fet, a més de la família objecte del nostre estudi, altres famílies afectes de LGMD s'han presentat amb lligament a la regió 7q, on es localitza el gen de la FLN2 (Thompson 2000).

5. DISTRÒFIES MUSCULARS : CARACTERÍSTIQUES FENOTÍPIQUES I GENOTÍPIQUES

Les distròfies musculars configuren un ampli i complex grup de malalties hereditàries que es caracteritzen per la presència de debilitat muscular que es manifesta de manera progressiva i per un patró d'alteracions histològiques consistents en signes de necrosi i regeneració muscular. Així, com a conseqüència de la degeneració i regeneració cícliques del múscul esquelètic el teixit muscular pateix uns canvis que defineixen unes entitats aparentment més severes a mesura que el teixit connectiu s'acumula i la capacitat regenerativa intrínseca del múscul es va esgotant. Dites alteracions histològiques serveixen per diagnosticar la distròfia muscular. Aquestes afeccions suposen una disminució de la capacitat de moviment i fins i tot poden estendre's a més d'una dècada de degeneració muscular, causant en ocasions una mort prematura. Són alteracions musculars primàries que impliquen a la musculatura axial i/o apendicular (Porter 2000). L'heterogeneïtat, tant a nivell clínic com genètic d'aquestes entitats ha fet difícil la classificació de totes elles, si bé la millora en el coneixement d'algunes d'elles, així com la millora dels criteris clínics en els darrers anys ha permès diferenciar-les millor i agrupar-les tant en funció de les seves manifestacions clíniques i del seu tipus d'herència com pels gens i proteïnes implicats (en els casos en que s'han pogut identificar), així com per les funcions d'aquestes proteïnes. Les diferents formes poden arribar a distingir-se a partir de la combinació de criteris clínics, genètics i morfològics. Convé que la confirmació de la biòpsia muscular sigui per tinció immunohistoquímica i no només histològica (Eymard 2001). La nomenclatura també s'ha vist afectada després d'aquests descobriments (Bushby 1995, Beckmann 1999). Així, el millor coneixement de la biologia molecular de les diferents formes ha contribuït a la seva diferenciació i a discernir, en algunes d'elles, les proteïnes defectives implicades. En aquest sentit, el descobriment de la distrofina com a proteïna alterada en la distròfia muscular de Duchenne (Bushby 1995, Bonilla 1988) va significar un gran avenç no només per representar la causa d'aquesta malaltia sinó per ser el punt de partida en el coneixement de tot un conjunt de proteïnes interrelacionades que juguen un paper clau en el correcte desenvolupament de la fisiologia muscular.

A grans trets, podem fer una classificació de les distròfies musculars que pot ser lleugerament variable segons diferents autors, però que inclouria, com es pot veure en la taules 1, 2, 3 i 4:

I)	Distròfia muscular de Duchenne (Taula 1)
II)	Distròfia muscular d'Emery-Dreyfuss (Taula 1)
III)	Distròfia muscular facio-escapulo-humeral (Taula 1)
IV)	Miopaties distals (Taula 1)
V)	Distròfies musculars congènites (Taula 2)
VI)	Distròfies musculars de cintura (LGMD) (Taules 3 i 4).

A la Figura 20 podem veure relacionades algunes proteïnes del complex DGC amb algunes distròfies musculars.

Taula nº 1. Tipus de distròfies musculars (a) No congènites

Tipus	Herència	Loc.Genètica	Gen	Referències
Duchenne/Becker	Lligada a X	Xp21.2	Distrofina	(1)
Emery-Dreifuss	Lligada a X	Xq28	Emerina	(2)
Emery-Dreifuss	Autos.Domin.	1q21	Lamina A/C	(3)
Facio-escapulo-humeral	Autos.Domin.	4q35	Desconegut	(4)
Miopatia Distal Laing	Autos.Domin.	14q11	Desconegut	(5)
Miopatia Distal Bethlem	Autos.Domin.	21q22/2q37	Col.làgen VI	(6)
Miopatia Dist.Welander	Autos.Domin.	2p	Desconegut	(7)
M.D.Markesbery-Griggs	Autos.Domin.	2q31-33	Desconegut	(8)
Miopatia Distal Miyoshi	Autos.Recessiv	2p12-14	Disferlina	(9)
Miopatia Distal Nonaka	Autos.Recessiv	9p1-q1	Desconegut	(10)
Epidermolysis bullosa i distròfia muscular	Autos.Recessiv	8q24-qter	Plectina	(11)
LGMD	Aut.Dom./Rec.	Taules 3 i 4	Taules 3 i 4	Taules 3 i 4

(1) Monaco 1986, Koenig 1987

(2) Bione 1994, Sakaki 2001

(3) Bonne 1999, Sakaki 2001

(4) Wijmenga 1992, Neuromuscular disorders 1999

(5) Laing 1995, Zimprich 2000

(6) Neuromuscular disorders 1999, Joebsis 1996, Speer 1996

- (7) Welander 1951
 - (8) Marquesbery 1974, Haravuori 1998
 - (9) Barohn 1991, Miyoshi 1975, Miyoshi 1986
 - (10) Nonaka 1981, Ikeuchi 1997
 - (11) Smith 1996
- Revisat a : Toniolo 1999, Illa 2000.

Taula nº 2. Distròfies musculars (b) Congènites

Tipus	Herència	Loc.Genètica	Gen	Referències
Fukuyama	Autos.Recessiv	9q31-q33	Fukutina	(12)
Deficiència en merosina	Autos.Recessiv	6q2	Laminina $\alpha 2$	(13)
Deficiència integrina $\alpha 7$	Autos.Recessiv	12q13	Integrina $\alpha 7$	(14)

- (12) Kobayashu 1998, Hayashi 2001
- (13) Helbling-Leclerc 1995
- (14) Hayashi 1998

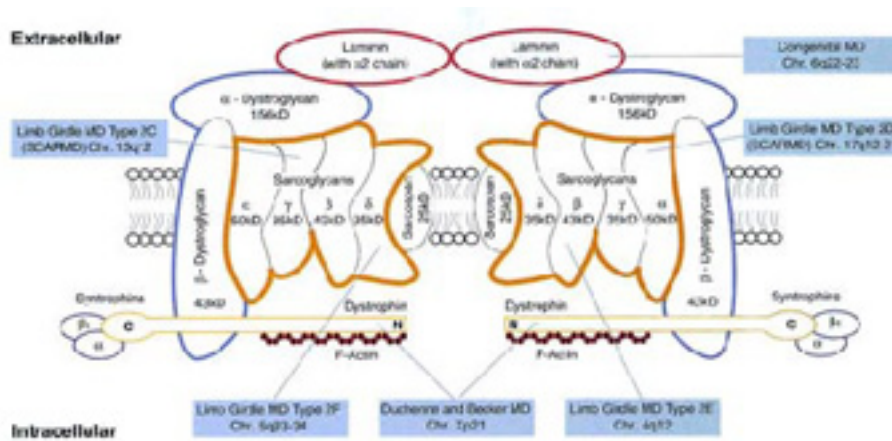


Figura 20: Resum de distròfies musculars i implicació de les proteïnes del complex DGC (Novocastra, comercial).

5.1 Distròfies musculars de maluc (*Limb Girdle Muscle Dystrophies* o LGMD)

La definició de les distròfies musculars de maluc (LGMD) com a grup ha experimentat diversos canvis i ha generat no poques controvèrsies. Podríem definir-les com a entitats caracteritzades per un patró distròfic progressiu amb afectació de la musculatura proximal, principalment a nivell de les cintures escapulars i pèlviques. Entre les primeres distincions podem esmentar la que va servir per diferenciar-les de la distròfia muscular de Duchenne (DMD) i de la distròfia facio-escapulo-humeral (Stevenson 1953, Walton 1954 i 1991), tot definint-se per primer cop el terme LGMD. Prèviament, es va creure que les distròfies facio-escapulo-humerals (FSH) i pelvifemorals eren manifestacions del mateix procés i es van anomenar distròfies musculars juvenils progressives i després es va veure que pacients amb miopaties distals podien també desenvolupar una afectació proximal (Barnes 1932, Milhorat 1943). Ja el 1954 es va reafirmar el concepte de LGMD en una classificació de distròfies musculars proposada per Walton (1954) que incloïa 3 categories: DMD, FSH i LGMD. Eren, però, termes considerats pobres i poc definitoris. Fins fa uns deu anys, les LGMD es definien com una síndrome de debilitat muscular progressiva que afecta les cintures escapular i pèlvica, establint-se que la malaltia tenia lloc bé espontàniament o bé amb un patró d'herència autosòmica recessiva, essent l'herència dominant poc freqüent (Shields 1986 i Gilchrist 1988). Des d'aleshores s'ha avançat molt en el coneixement d'aquest tipus de distròfies musculars i tot i que segueix suposant un grup molt heterogeni, s'han pogut establir uns trets característics que defineixen aquestes entitats. Així, s'han definit 14 formes genèticament diferenciades de LGMD, mitjançant estudis de lligament que han permès delimitar diferents *loci* cromosòmics (veure Taules 3 i 4), essent 9 d'elles d'herència autosòmica recessiva i 5 d'herència autosòmica dominant, trobant-se, com veurem, els gens responsables en algunes d'elles. Veiem, doncs, que la possibilitat de determinar la base genètica de les diverses formes de la malaltia ha redefinit en gran mesura el concepte de LGMD.

Per tal de definir les LGMD de forma general i des d'un punt de vista clínic, podríem dir que es presenten en un ampli ventall d'edats des de la infància fins a l'edat adulta i típicament s'inicien amb debilitat muscular de les extremitats inferiors que genera problemes per pujar escales o per aixecar-se d'un seient. Posteriorment es veuen afectats els músculs de la cintura escapular, provocant el fenomen de l' *escàpula alada*, així com dificultats per aixecar les extremitats superiors. Un tret també característic és

que els nivells sèrics de creatin-kinasa (CK) són usualment elevats. Altres signes i símptomes inclouen: cardiomiopatia, alteracions de la conducció cardíaca, debilitat muscular orofaríngea i hipertròfia de panxells. Els estudis morfològics presenten alteracions de tipus miopàtic inespecífiques, canvis regeneratius i necrosi (Figures 21 i 22).

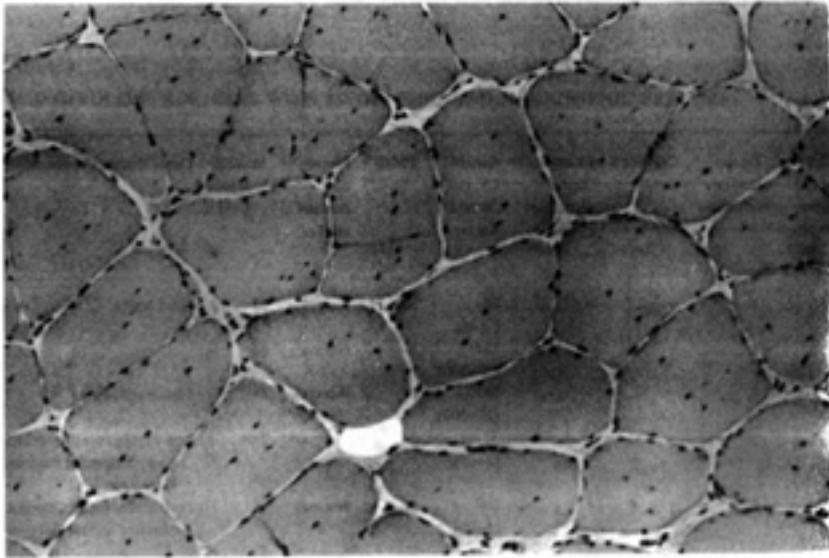


Figura 21: En la micrografia es poden observar els canvis miopàtics típics d'una LGMD. Les fibres musculars són hipertròfiques, varien en forma i contenen un major nombre de nuclis centrals (Panegyres 1990).

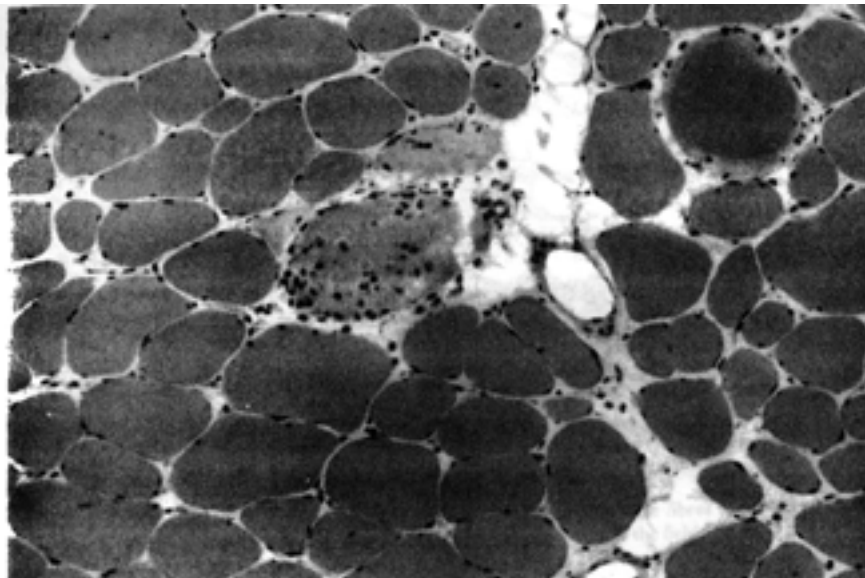


Figura 22: Necrosi focal a LGMD. Al centre de la imatge es pot veure una gran fibra amb un sarcoplasma homogeni que conté molts nuclis picnòtics (Panegyres 1990).

Veiem que, en general, les LGMD, que tenen una incidència d'aproximadament 1/100.000, són heterogènies pel tipus de transmissió i per la clínica, ja sigui per l'edat d'inici, el tipus d'evolució com per la distribució de la debilitat muscular.

Un cop va estar clar que el nivell d'heterogeneïtat era gran, amb diferents *loci* implicats, es va proposar una classificació basada en *locus* per un consorci sota les directrius del *European Neuromuscular Centre*, designant-se les autosòmiques dominants com a LGMD1 i les autosòmiques recessives com a LGMD2, amb lletres en ordre en funció de l'ordre de descobriment (Bushby 1995). Així, existeixen una sèrie de criteris diagnòstics per tal d'identificar una LGMD amb certesa (Bushby 1997a).

5.2 Classificació i identificació de gens implicats

A les taules 3 i 4 podem veure la classificació de les diferents formes LGMD autosòmiques dominants i recessives, amb la seva localització cromosòmica i el gen implicat en els casos en que és conegut.

Taula n° 3. LGMD (3) Autosòmiques dominants

Tipus	Localització Genètica	Gen Defectiu	Referències
LGMD 1A	5q22 –q34	Miotilina	(15)
LGMD 1B (LMNA)	1q11-q21	Lamina A/C	(16)
LGMD 1C (CAV3)	3p25	Caveolina 3	(17)
LGMD 1D (FDC-CDM)	6q23	Desconegut	(18)
LGMD 1E	7q	Desconegut	(19)

(15) Speer 1992, Hauser 2000

(16) van der Kooi 1997, Muchir 2000

(17) Minetti 1998, McNally 1998b, Galbiatti 1999, Galbiatti 2001

(18) Messina 1997

(19) Speer 1999

Taula nº 4.LGMD (4) Autosòmiques recessives

Tipus	Localització Genètica	Gen Defectiu	Referències
LGMD 2A (CAPN3)	15q15.1-q21.1	Calpaína-3	(20)
LGMD 2B	2p13	Disferlina	(21)
LGMD 2C	13q12	γ -sarcoglicà	(22)
LGMD 2D	17q12-q21.33	α -sarcoglicà	(23)
LGMD 2E	4q12	β -sarcoglicà	(24)
LGMD 2F	5q33-q34	δ -sarcoglicà	(25)
LGMD 2G	17q11-q12	Teletonina	(26)
LGMD 2H (Hutterite)	9q31-q34.1	Ubiquitina lligasa	(27)
LGMD 2I	19q13.3	Desconocido	(28)

(20) Beckmann 1991, Richard 1995

(21) Bashir 1994, Liu 1998

(22) Ben Othmane 1992, Noguchi 1995

(23) Roberds 1994, Piccolo 1995

(24) Lim 1995, Bonnemann 1996

(25) Passos-Bueno 1996, Nigro 1996

(26) Moreira 1997 i 2000

(27) Weiler 1998, Frosk 2002

(28) Driss 2000

5.2.1 LGMD d'herència autosòmica dominant

5.2.1.1 LGMD 1A

El 1992, Speer va estudiar una família de 218 membres, 49 d'ells afectats per debilitat proximal a les cames amb o sense debilitat als braços, absència de reflexes als tendons del tornell i valors elevats de CK, amb una herència autosòmica dominant. Posteriorment, també Speer (1998a) va demostrar que en aquesta forma es presentava un clar efecte d'anticipació. Van efectuar l'estudi de lligament utilitzant marcadors microsatèl·lits polimòrfics, el qual va donar com a resultat que el *locus* de la malaltia es trobava al braç llarg del cromosoma 5 (5q). Posteriorment, altres estudis van precisar millor la localització, situant-se a 5q31 (Yamaoka 1994, Bartoloni 1998). Finalment, Hauser (2000) va identificar el defecte genètic causant de la malaltia, tot trobant una mutació del tipus *missense* en el gen de la **miotilina**, proteïna sarcomèrica dels discs Z que s'uneix a l' α -actinina, si bé encara es desconeix el mecanisme concret pel qual dita mutació altera l'estructura dels discs Z. La proteïna α -actinina, que s'uneix a l'actina i que entrecreu filaments primers en feixos antiparal·lels en les línies Z també es localitza als discs Z (Salmikangas 1999). Per microscopia electrònica s'ha vist que a biòpsies musculars de pacients afectes de LGMD 1A es presenten anomalies de les línies Z, les quals apareixen freqüentment en forma de cossos amb forma de varetes, similars als vistos en la miopatia nemalínica (Hauser 2000). El transcrit de l'al·lel mutat de la miotilina és present en el teixit muscular dels pacients amb LGMD 1A i sembla estar traduït. El nivell global de la proteïna és normal i la tinció immunocitoquímica evidencia que la miotilina està correctament localitzada en la línia Z, sense evidència de precipitats o dipòsits anormals. Per tal d'arribar a identificar aquesta proteïna com la responsable de la malaltia, Hauser (2000) va analitzar tot l'interval cromosòmic o regió candidata definida pels marcadors que van establir el lligament amb la malaltia. En aquesta regió, d'unes 2 megabases, es van trobar una sèrie de EST (*expressed sequence tags*), dels quals l'objecte prioritari d'estudi com a gen candidat va ser un inclòs en un *cluster* compost quasi exclusivament per EST de múscul esquelètic. A partir d'aquí i amb l'ajut d'un cromosoma artificial de fag es va poder establir l'estructura d'un gen, tot definint-se les regions intròniques i exòniques. Un cop amplificats els exons del gen definit en 2 individus afectes de la família objecte de l'estudi es va trobar la ja esmentada mutació que canviava una citosina per una timina i donava lloc a la

conversió d'una treonina en una isoleucina. Dita mutació va segregat perfectament amb l'haplotip associat a la malaltia. Si bé alguns membres asimptomàtics de la família també van presentar la mutació, aquests eren individus d'una edat inferior a la mitjana establerta d'aparició de la malaltia ($27 \pm 8,5$ anys) i s'esperaria que desenvolupessin la malaltia més endavant (Hauser 2000). En l'altre únic pedigrí descrit amb lligament a la regió 5q, que representa una miopatia distal autosòmica dominant amb debilitat faríngea i de cordes vocals, s'ha descartat que la miotilina estigui implicada, doncs no ha presentat cap mutació (Hauser 2000, Feit 1998).

5.2.1.2 LGMD 1B

El 1995 (Speer 1995) es van descriure famílies que semblaven ser afectades per una nova forma de LGMD. Els pacients presentaven afectació cardíaca en un 62,5 % dels casos, desenvolupada després de presentar-se la simptomatologia neuromuscular. La meitat dels pacients presentaven debilitat simètrica iniciada als músculs proximals inferiors abans de l'edat de 20 anys. En la tercera o quarta dècada de vida, els músculs superiors també s'anaven veient afectats gradualment. La CK era normal o moderadament elevada. L'escasa afectació a nivell de contractures espinals, de colzes i tendons d'Aquiles diferenciava l'entitat de la distròfia muscular d'Emery-Dreyfuss (AD-EDMD). Els electromiogrames (EMG) i les biòpsies musculars eren consistents amb una distròfia muscular suau. Van der Kooi (1996) va descriure amb detall aquesta forma i en especial els trets relacionats amb la implicació cardíaca. Després que Speer (1995) descartés la regió 5q com a candidata, Van der Kooi (1997) va efectuar l'estudi de lligament en aquestes 3 famílies i va fixar el *locus* de la malaltia en el braç llarg del cromosoma 1 (1q11-21) en 2 de les famílies, mentre que no es va poder discernir la localització cromosòmica de la tercera família. Muchir (2000) va identificar el defecte genètic de les famílies afectades per la forma lligada al cromosoma 1, tot trobant mutacions en el gen **LMNA**, que codifica per les lamines A/C, dues proteïnes de l'envolta nuclear. Prèviament (Bonne 1999), s'havia trobat el mateix gen com a responsable de la AD-EDMD, la qual cosa indicava que aquesta distròfia i la LGMD lligada al cromosoma 1 eren formes al·lèliques de la mateixa malaltia. Les mutacions trobades implicaven aminoàcids conservats entre espècies i lamines. Les lamines A/C són membres de la família multigènica de filaments intermitjos. Formen dímers a través del seu domini en forma de vareta i interaccionen amb la cromatina i proteïnes integrals

de la membrana nuclear interna a través de llocs d'unió localitzats en l'esmentat domini i la seva cua globular carboxi-terminal. Les mutacions trobades afectarien a la dimerització i ensamblatge de les lamines com a conseqüència de tenir un domini vareta aberrant, alterant la xarxa d'aquestes proteïnes i l'arquitectura nuclear.

5.2.1.3 LGMD 1C

L'any 1998 es va trobar el defecte genètic responsable de la tercera forma LGMD autosòmica dominant, la 1C, en el gen de la **caveolina-3**, localitzat al braç curt del cromosoma 3 (3p25). El gen es va clonar i es va mapar, tant per hibridació *in situ* fluorescent (FISH) com per cribratge d'un cromosoma artificial de llevat (YAC) (Minetti 1998, McNally 1998b). Si bé no es va fer una aproximació per anàlisi de lligament, el gen va ser trobat fent una recerca entre gens candidats. L'objecte d'estudi van ser 2 famílies d'Itàlia en que els seus membres afectes presentaven desenvolupament motor normal, inici de la malaltia al voltant dels 5 anys d'edat, amb dolors per rampes musculars després de fer exercici, hipertròfia de panxell i debilitat muscular proximal entre suau i moderada. La progressió de la malaltia era variable, essent lenta en una família però més ràpida en la'altra. La concentració sèrica de CK era elevada, estant entre 4 i 25 cops per sobre del normal (McNally 1998b).

Les caveolines són els principals components de les membranes caveoles. Les caveoles són invaginacions vesiculars de la membrana plasmàtica (Severs 1988), que es creu participen en processos de tràfic vesicular i de transducció de senyal (Couet 1997a, Okamoto 1998, Engelmann 1998, Smart 1999, Razani 2000). L'expressió de la caveolina-3, múscul-específica (Tang 1996, Way 1995), s'indueix durant la diferenciació dels mio blasts esquelètics i es localitza en el sarcolema, on forma un complex amb la distrofina (McNally 1998b) i les seves glicoproteïnes associades (Song 1996a), si bé no sembla ser essencial per la biogènesi del complex distrofina-glicoproteïna (Crosbie 1998). Es creu que les caveolines actuen com a proteïnes *scaffolding* per organitzar i concentrar lípids específics i molècules de senyalització dintre de les membranes caveolars, tot participant en processos de tràfic vesicular. Les mutacions descrites en el gen de la caveolina 3 afecten el domini *scaffolding* i el domini transmembrana de la proteïna i provoquen la pèrdua de més d'un 90 % de la mateixa (Minetti 1998).

La caveolina-3 humana conté un domini d'*scaffolding* crític per l'homo-oligomerització i per la interacció amb diverses molècules de senyalització associades amb ella, com per exemple proteïnes G heterotrimèriques, H-ras, de la família de les Src tirosin kinases, EGF-R (receptor de factor de creixement epidèrmic), PKC (proteïna kinasa C) i eNOS (Couet 1997a, Song 1997, Li 1995, Neer 1995, Song 1996b, Li 1996, Couet 1997b, Oka 1997, Feron 1996). Donat que la caveolina-3 forma homo-oligòmers, un possible mecanisme d'acció responsable de la disfunció proteica implicaria que les mutacions heteròlogues exercicin un efecte dominant negatiu que induís una ràpida degradació de la proteïna, tant en la seva forma normal com en la mutada. Una reducció de l'expressió de la proteïna tant dràstica impediria molt probablement la formació de les caveoles a la superfície cel.lular (Minetti 1998). Galbiatti (1999) va demostrar que les mutacions en la caveolina-3 causen la formació d'agregats inestables de la proteïna d'elevada massa molecular que són retinguts a l'aparell de Golgi i no dirigits a la membrana plasmàtica. Cal remarcar que els residus implicats en les mutacions estan molt conservats evolutivament. El fet que la caveolina-3 estigui implicada en processos de senyalització cel.lular i que quan muta es reté en l'aparell de Golgi pot indicar que es retenguin molècules de senyalització en aquest orgànul, podent-se alterar l'activació o inhibició normals dutes a terme per la caveolina-3 *wild-type* (Galbiatti 1999). Altres mutacions afecten parts proteiques implicades en la modulació de l'activitat NOS, havent-se trobat en altres entitats distròfiques com la *Hereditary rippling muscle disease* (RMD) (Betz 2001, McNally 1998b). La caveolina-3 inhibiria l'activitat catalítica de NOS neuronal, havent-se observat un increment d'aquesta activitat en múscul esquelètic amb mutacions de caveolina-3 (Sunada 2001). La caveolina-3 s'uneix a la fosfofructokinasa múscul-específica, amb la qual cosa podria jugar un paper en la regulació de la glicòlisi al múscul (Song 1996a, Bushby 1999b). En estudis amb ratolins transgènics deficientes en caveolina-3 s'ha observat una alteració del complex DGC i dels túbuls T (Galbiatti 2001).

5.2.1.4 LGMD 1D

El 1997 (Messina 1997) es va descriure una nova forma autosòmica dominant en un gran pedigrí que presentava una distròfia muscular proximal de progressió lenta i inici en edat adulta, juntament amb una cardiopatia de dilatació no hipertròfica amb defecte conductor. En la família estudiada els individus afectes més joves que no

presentaven afectació muscular sí presentaven símptomes relacionats amb defectes de conducció o bloqueig del nòdul AV. A mesura que progressa la malaltia el bloqueig del nodol AV d'alt grau es veu acompanyat d'una dilatació cardíaca no hipertròfica. La falla cardíaca congestiva i els símptomes de debilitat muscular tendeixen a aparèixer més tard en el curs de la malaltia. A les biòpsies musculars es va observar una arquitectura distròfica amb variació del tamany de les fibres, nuclis centrals i teixit connectiu i greix augmentats. El nivell de CK es va trobar elevat entre 2 i 4 vegades respecte de la normalitat i l'edat d'inici de la malaltia era similar (entre la segona i tercera dècada de vida) en les diferents generacions, excloent-se el fenomen d'anticipació. Es van excloure diverses regions de cardiopaties de dilatació familiars (FDC), com per exemple la FDC-CD1 i distròfies musculars ja descrites per anàlisi de lligament, entre elles la regió 1q11-21 implicada en la forma LGMD 1B, també associada a defectes cardíacs. Cal remarcar que els marcadors implicats en la segregació de la forma LGMD 1B i de la FDC-CD1 són comuns, amb la qual cosa s'indica que ambdues malalties són al·lèliques. Finalment es va identificar un nou *locus* a 6q23 tot definint-se una nova entitat anomenada LGMD 1D. De moment no s'ha pogut descriure el gen responsable de la malaltia, havent-se exclòs diversos gens candidats (laminina $\alpha 2$, laminina $\alpha 4$, fosfolamban i triadina) propers a la regió acotada, d'uns 3 centiMorgan entre els marcadors D6S1705 i D6S1656, per diverses recombinacions entre aquests gens i la malaltia (Messina 1997).

5.2.1.5 LGMD 1E

El 1998, Speer (1998b) va estudiar 4 famílies afectes de LGMD i va excloure les 3 formes prèviament conegudes per estudis de lligament. Ja el 1999, Speer va aconseguir identificar un nou *locus* al braç llarg del cromosoma 7 (7q), que abastaria uns 9 cM entre els marcadors D7S2546 i D7S2423, en dues famílies que encara no estaven lligades i no podien ser relacionades amb cap de les regions implicades en les formes LGMD conegudes fins aquell moment, estant incloses les 4 inicialment estudiades per ell el 1998. Les característiques clíniques observades en les famílies eren comuns a les trobades en altres pedigrís afectes de formes LGMD autosòmiques dominants i, de fet, l'absència de trets associats diferencials (disàrtria a 1A, anomalies cardíques a 1B i 1D) diferenciava la nova forma. Els individus inclosos en l'estudi es van considerar com afectes quan presentaven debilitat proximal a les cames, absència de

reflexes als tendons dels tornells amb o sense afectació proximal als braços i nivells elevats de CK. Considerant els resultats de l'anàlisi de lligament de les 2 famílies on el cromosoma 7 estava implicat, es va poder acotar la regió candidata entre els marcadors D7S2546 i D7S2423. Tampoc no es coneix encara el defecte genètic implicat en aquesta forma i la regió implicada ha estat objecte d'estudi en aquesta tesi, tot i ser exclosa finalment després de considerar els marcadors implicats en la regió de LGMD 1E.

5.2.1.6 Fenomen d'anticipació

No fa gaires anys (Speer 1998a), es va detectar l'anomenat fenomen d'anticipació a una LGMD autosòmica dominant. És a dir, un increment en la severitat de la malaltia en la transmissió d'un gen lligat a la malaltia de pare a fill. Aquest fenomen, present en malalties diverses, s'ha pogut relacionar amb un aconteixement genètic, com és l'expansió de zones repetitives en forma de trinucleòtids (Carpenter 1994). S'havia trobat ja una elevada correlació entre les 2 variables en malalties com la Corea de Huntington (HDCRG 1994), la distròfia miotònica (Harper 1992, Mahadevan 1992) i la malaltia de Machado-Joseph (Kawaguchi 1994) entre d'altres. Globalment, s'han descrit expansions de repeticions de trinucleòtids en un total de 14 afeccions neurològiques (Cummings 2000a), entre les quals figuren la Síndrome de l' X fràgil (Knight 1993), diverses atàxies com la de Friedrich (Campuzano 1996) i les espinocerebel·lars (Koob 1999, Holmes 1999). Entre elles, s'han demostrat expansions de trinucleòtids en diverses afeccions de caràcter neuromuscular (Lieberman 2000, Cummings 2000a). No fa gaire s'han descrit expansions de triplets GCG a la distròfia muscular oculofaríngea, si bé no relacionada amb anticipació (Brais 1998, Muller 2001). La distròfia miotònica congènita s'associa amb expansions de triplets CTG (Brook 1992, Buxton 1992, Harley 1992). Finalment, a l'atròfia muscular espinal i bulbar lligada al cromosoma X (SBMA) o malaltia de Kennedy, s'han trobat expansions de repeticions CAG (La Spada 1991). En el cas de la distròfia muscular facio-escapulo-humeral s'ha observat també el fenomen de l'anticipació però no relacionat amb expansions sino amb delecions (Tawil 1996, Flanigan 2001). El mecanisme pel qual es generen aquestes expansions es desconeix i pot afectar tant a zones codificants com no codificants (Cummings 2000b), estant relacionat amb el processament i estabilitat de l'ARN (Harley 1992, Wilson 1999, Lieberman 2000). Com veurem, en la família objecte del present estudi sembla presentar-se l'esmentat fenomen d'anticipació.

5.2.2 LGMD d'herència autosòmica recessiva

Com ja hem avançat, dins del complex DGC, hi ha un subcomplex format pels sarcoglicans (α , β , γ i δ), les mutacions dels quals donen lloc a 4 formes de LGMD autosòmiques recessives (LGMD2 D, E, C i F, respectivament) (Roberds 1994, Noguchi 1995, Lim 1995, Bonnemann 1995, Nigro 1996). Donat que la pèrdua o deficiència de tots o algun dels 4 sarcoglicans dóna lloc a una distròfia muscular, aquestes proteïnes deuen jugar un paper crític en el manteniment de la integritat de la membrana. Holt (1998) va demostrar que el conjunt dels sarcoglicans és un component imprescindible del complex DGC per tal de tenir un ancoratge estable de l' α -dístroglicà a la cara extracel·lular del sarcolema, així com pel manteniment d'aquesta membrana intacta (Holt 1998a, Holt 1998b). Entre els anys 1992 i 1994 es va veure que els sarcoglicans α i γ estaven específicament absents en nens afectats per una distròfia muscular d'herència autosòmica recessiva (Matsumura 1992, Mizuno 1994b, Passos-Bueno 1993) que es va lligar genèticament al cromosoma 13 (13q12) (Azibi 1993, Ben Othmane 1992). S'ha vist que en alguns casos de sarcoglicanopatia, no només es veia disminuït un o més sarcoglicans (per immunotinció amb anticossos específics), sinó que la dístrofina, component clau del complex DGC, també veia reduïda la seva presència (Jones 1998, Bushby 1997b, Vainzof 1996). Els primers estudis en biòpsies musculars de pacients amb LGMD donaven a entendre que una mutació en qualsevol dels sarcoglicans produïa una inestabilitat de la resta (Bonnemann 1995, Duggan 1997, Lim 1995, Noguchi 1995). Avui se sap que això no és tan simple i que no tots els sarcoglicans es desestabilitzen d'igual manera per una mutació en un d'ells. Un exemple el trobem en la LGMD 2C, on els pacients amb mutacions en el γ -sarcoglicà retenen freqüentment α -sarcoglicà a la membrana (Vainzoff 1996). Per tant, l' α -sarcoglicà pot estar menys fortament associat amb el γ (Sakamoto 1997) i certs estudis han evidenciat que l' α -sarcoglicà pot asseparar-se més fàcilment de la resta dels sarcoglicans (Chan 1998). En la forma 2D, on els pacients presenten mutacions en l' α -sarcoglicà, existeix immunotinció residual de γ -sarcoglicà (Vainzof 1996), si bé no se sap si és funcional. De fet, no hi ha una correlació clara entre tinció residual de sarcoglicans i quadre clínic (Vainzoff 1996). Normalment, la pèrdua total del conjunt dels 4 sarcoglicans té lloc quan es produeix una mutació de β o δ -sarcoglicà. Si els mutats són α o γ la reducció sol ser menor i inclús el patró d'algun dels altres sarcoglicans sol ser normal (Ozawa 1998, Bonnemann 1996,

Jones 1998, Bushby 1997b, Vainzof 1996). L'espectre associat a les mutacions dels gens dels sarcoglicans es superposa amb l'espectre associat a les mutacions de la distrofina en la DMD i la distròfia muscular de Becker, a excepció del fet que el nivell cognitiu no es veu afectat en mutacions de sarcoglicans (Ben Hamida 1989, Miladi 1999). Normalment la distrofina s'expressa al sistema nerviós central i perifèric. Per contra, els 4 sarcoglicans s'expressen en múscul cardíac i esquelètic. Per tant, el complex dels sarcoglicans és múscul específic i els seus defectes semblen limitar-se a aquests teixits (Hack 2000). Com a components integrals del DGC, els sarcoglicans, juntament amb les sintrofines, deuen jugar un paper important en l'estabilització del complex. Diferents models animals indiquen que amb deficiència en α -sarcoglicà es presenta una distròfia muscular progressiva amb pèrdua completa del complex sarcoglicà i desaparició de l'associació a la membrana de l' α -dystroglicà, a més d'evidenciar-se un mecanisme patogènic comú en distròfies musculars produïdes per deficiència en distrofina o sarcoglicans. Mutants sense distrofina o δ -sarcoglicà presenten una alteració substancial de la membrana plasmàtica (Straub 1997b) i la pèrdua de β o δ -sarcoglicans dóna lloc a l'alteració del complex sarcoglicans-sarcospan. A humans amb mutacions en el γ -sarcoglicà es detecten nivells reduïts de distrofina, α i β -sarcoglicans, a més de patrons alterats de laminina, essent doncs les anomalies de distrofina un fenomen secundari en alguns casos (Jones 1998). Mutacions en sarcoglicans podrien no desestabilitzar la unió entre el citoesquelet i la matriu extracel·lular i sí alterar l'*scaffolding* necessari per les funcions de senyalització cel·lular del DGC, induïnt apoptosi de les miofibres (Porter 2000). No obstant, s'ha suggerit que la pèrdua o reducció de sarcoglicans dóna lloc a una inestabilitat de la membrana plasmàtica (Hassoni 1999). El grau de dany en un múscul concret pot no estar completament relacionat amb el defecte genètic primari i potser altres factors, bé ambientals o genètics, poden contribuir a determinar l'efecte d'una mutació en una àrea en particular (Bushby 1999b). Certs estudis han evidenciat que la mutació en un dels sarcoglicans, tot i que la resta estiguin intactes i normalment glicosilats, impedeix que tots 4 es puguin ensamblar i mobilitzar cap a la membrana plasmàtica (Bushby 1999b).

A part dels defectes en sarcoglicans, es coneixen els gens implicats en 3 formes més autosòmiques recessives. En la forma LGMD2A, el gen implicat és la **calpaïna** (CAPN-3), una proteasa intracel·lular dependent de calci (Richard 1995, Beckmann 1996). Si bé no es coneix la seva funció, s'especula amb la possibilitat que estigüés

implicada, per la seva localització en el nucli de cèl·lules musculars, en el control de l'expressió de factors de transcripció múscul-específics i prengué part en la regulació de la diferenciació muscular (Kinbara 1997). Sembla que les mutacions descrites en la calpaïna afectarien les seves interaccions domini-domini, tot inactivant-la (Jia 2001), havent-se trobat mutacions que no suposaven una alteració de l'expressió de la proteïna (Talim 2001). En la forma LGMD 2B, el gen implicat és la **disferlina**, també de funció desconeguda i implicat igualment en la miopatia de Miyoshi (Bejaoui 1995, Illarioshkin 1996, Aoki 2001), trobant-se fins i tot mutacions comuns, tot indicant la necessitat de factors addicionals que contribueixin als diferents fenotips (Ueyama 2001, Illarioshkin 2000). Aquesta proteïna és múscul específica i es localitza a la membrana plasmàtica de les fibres musculars. Darrers estudis postulen que és una proteïna clau per tal de mantenir la integritat estructural de la membrana plasmàtica de la fibra muscular (Selcen 2001) i per tant del complex DGC, abandonant el sarcolema quan és mutada i passant-se a acumular al citoplasma (Piccolo 2000). S'ha vist certa heterogeneïtat fenotípica en les disferlinopaties (Illa 2001). Tant calpaïna com disferlina podrien estar relacionades, doncs s'ha observat un defecte secundari de calpaïna en pacients amb disferlinopatia (Anderson 2000).

Finalment, la forma LGMD2G presenta defectes en el gen **teletonina**, una proteïna sarcomèrica exclusiva de múscul estriat i cardíac (Valle 1997). Sembla estar localitzada al disc Z del múscul esquelètic adult (Mues 1998). És un substrat de la titina, clau en el procés d'ensamblatge del sarcòmer (Gregorio 1999). Després de l'activació per fosforil·lació i unió a calci/calmodulina, la titina sembla fosforil·lar el domini carboxiterminal de la teletonina a miòcits en diferenciació (Mayans 1998). Les mutacions en el gen causen una alteració important en un domini funcional important a la regió carboxiterminal i poden donar lloc a l'alteració de l'estructura sarcomèrica (Moreira 2000). S'ha vist que en les disferlinopaties, la implicació muscular pot ser distal i proximal (Illa 2001, Mahjneh 2001) mentre que a les sarcoglicanopaties els músculs proximals es veuen més afectats (Vlak 2000). L'ús d'anticossos en tècniques immunològiques acompanyat de l'anàlisi mutacional és útil de cara al diagnòstic d'aquestes deficiències (Pogue 2001).