

Distrofina y proteínas asociadas a la distrofina. Su evaluación en el laboratorio de patología neuromuscular

C. Navarro

*DYSTROPHIN AND DYSTROPHIN-ASSOCIATED PROTEINS.
THEIR EVALUATION AT THE NEUROMUSCULAR PATHOLOGY LABORATORY*

Summary. Objective. To describe the main techniques used to detect skeletal muscle proteins and to discuss the results regarding the new classification of limb-girdle muscular dystrophies. Material and methods. Over three hundred muscle biopsies with a suspected diagnosis of muscular dystrophy were immunostained for dystrophin, dystrophin-associated proteins, spectrin and utrophin. In one hundred and twenty of them, Western blot for different proteins was performed. Results. Duchenne muscular dystrophy showed negative immunostaining and Western blot for dystrophin and dystrophin-associated proteins, and over-expression of utrophin. In Becker muscular dystrophy there is an abnormal dystrophin immunolabelling and molecular weight. Sarcoglycanopathies present decreased sarcoglycans and normal dystrophin. In some forms of congenital muscular dystrophy there is absence of merosin and α 2-laminin, with variable results on Western blot analysis. Conclusion. The immunohistochemical analysis of several cytoskeletal and transmembrane proteins as well as Western blot analysis, are necessary to elaborate a correct diagnosis of dystrophinopathies, sarcoglycanopathies and the different forms of congenital muscular dystrophy [REV NEUROL 1999; 28: 154-8].

Key words. Congenital muscular dystrophy. Dystrophin. Dystrophin-associated proteins. Limb-girdle muscular dystrophy. Merosin. Sarcoglycanopathies. Utrophin.

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de la distrofina en 1987 [1], meses después de la clonación de su gen codificador en Xp21 [2], responsable de la distrofia muscular de Duchenne (DMD) y la distrofia muscular de Becker (DMB), fue primordial para la definición precisa de estas distrofias musculares, y supuso el comienzo de una cascada de acontecimientos que permitieron identificar nuevos genes y proteínas, algunas de ellas responsables de otras distrofias menos frecuentes [3-11].

Con la identificación de estas proteínas se establece una nueva manera de estudiar las distrofias musculares en el laboratorio, basada en la inmunodetección del mayor número de proteínas posibles. La clasificación propuesta por Buhsby y Beckmann en 1995, actualmente aceptada (Tabla I), se basa en la proteína deficitaria [12,13]. De la mayoría de estas enfermedades, denominadas en general distrofias de cinturas (LGMD), se conoce la localización genética, aunque en algunas no se ha identificado aún la proteína.

La distrofina es una proteína subsarcolémica de gran tamaño, 427 kDa, cuya función se suponía relacionada con el anclaje de las proteínas musculares citoplásmicas a la membrana celular [14]. Según su secuencia de aminoácidos (3865 aa), la distrofina consta de cuatro dominios: un dominio aminoterminal por el que se une a la F-actina; un largo dominio central o 'rod domain'; un dominio rico en cisteína y un dominio carboxiterminal, estos dos últimos responsables de la unión al sarcolema.

En 1989, Campbell y Kahl [15] demostraron que la distrofina se encontraba asociada a una glucoproteína de la membrana. Posteriormente se descubrió que se trataba de un complejo de proteínas al que se denominó 'Dystrophin-Associated Proteins complex' (DAP) [3,16,17]. Este hallazgo confirmaba la hipótesis de que la distrofina actuaba como anclaje entre las proteínas citoesqueléticas y las proteínas integrales de la membrana.

En las DAP se distinguen dos subcomplejos: distroglicano y sarcoglicano [17]. El subcomplejo distroglicano está constituido por dos proteínas, el β -distroglicano (43 kDa, gen 3p21) que es una proteína transmembrana ligada, por su dominio amino intracitoplásmico a la distrofina, y por su extremo carboxil al α -distroglicano (156 kDa, gen 3p21). El subcomplejo sarcoglicano está constituido por cinco proteínas denominadas: α -sarcoglicano (50 kDa) o adhalina ('adhal' significa músculo en árabe), β -sarcoglicano (43 kDa), γ -sarcoglicano (35 kDa), δ -sarcoglicano (35 kDa) y sarcospan (25 kDa), esta última descrita hace pocos meses [18]. Como vemos en la tabla I, se ha asociado el déficit de cada una de estas proteínas a un tipo de distrofia muscular.

Poco tiempo después de la identificación de la distrofina, y como resultado de los estudios realizados con múltiples anticuerpos antidistrofina, se descubrió una nueva proteína a la que se denominó 'Dystrophin-Related Protein' (DRP) por su gran parecido a la distrofina [19,20]. El gen codificante se localizó en la posición 6q24 [21]. La DRP, actualmente denominada utrofina, tiene una gran similitud en la secuencia de aminoácidos con la distrofina y, como ésta, un elevado peso molecular, de aproximadamente 380 kDa. Se expresa, en la edad fetal, antes que la distrofina y se localiza en el subsarcolema [22]. Cuando comienza a expresarse la distrofina, la utrofina empieza a desaparecer y queda exclusivamente ubicada en el subsarcolema de las fibras del huso neuromuscular, en vasos y en nervio.

Por otra parte, en 1994 Tomé et al [23] identifican una proteína de la matriz extracelular llamada merosina o laminina 2, ausente total o parcialmente en un elevado porcentaje de casos de la forma occidental de distrofia muscular congénita (DMC). La merosina, que se encuentra ligada al complejo de DAP mediante la α -distroglicano, está constituida por tres cadenas, α 2, β 1 y γ 1. En los casos de DMC con déficit de merosina existen mutaciones en el gen

Recibido: 05.06.98. Aceptado: 14.06.98.

Servicio de Anatomía Patológica y Neuropatología. Hospital do Meixoeiro, Vigo, España.

Correspondencia: Dra. Carmen Navarro. Servicio de Anatomía Patológica y Neuropatología. Hospital do Meixoeiro. Meixoeiro, s/n. E-36200 Vigo. Fax: +34 98627 6416. E-mail: cnavarro@unimeixo.cesga.es

Agradecimientos: A los biólogos Susana Teijeira y Alfonso Teijeiro, becarios del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), y a Roberto Fernández, becario del Ministerio de Educación y Ciencia, por su excelente colaboración científica y técnica. A María Valeiras, Graci Santín y Soraya Barrera por el cuidadoso procesamiento de las biopsias musculares. Este estudio ha sido subvencionado en parte por el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 96/0229) y la Asociación Francesa contra las Miopatías (AFM 4436).

© 1998, REVISTA DE NEUROLOGÍA

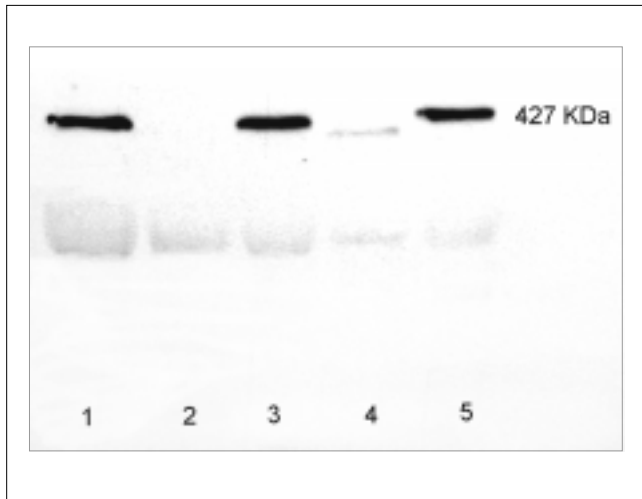


Figura 1. Western blot del dominio carboxiterminal de la distrofina. Las calles 1, 3 y 5 corresponden a controles. La 2 a un caso de DMD y la 4 a un caso de DMB en la que se observa una menor cantidad y una disminución del peso molecular. El paciente presentaba una delección de los exones 45 al 47.

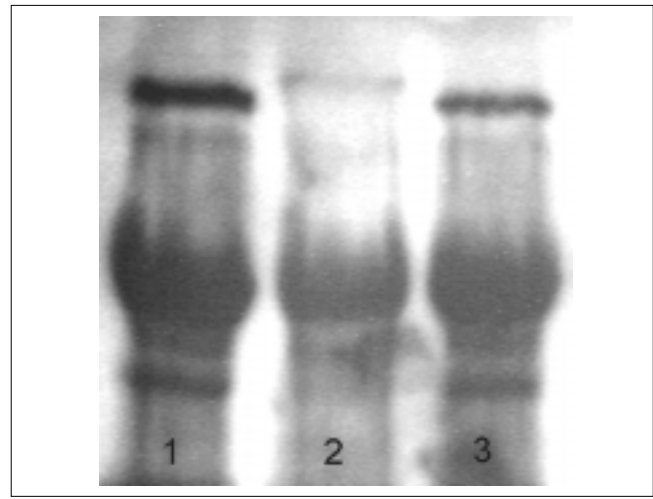


Figura 2. Western blot de la distrofina, carboxiterminal. Las calles 1 y 3 son controles. La 2 corresponde a una DMB con una duplicación confirmada genéticamente por la presencia de un 'junction fragment'.

Tabla I. Clasificación actualizada de las distrofias musculares progresivas.

Enfermedad	Localización genética	Producto del gen	PM (kDa)	Localización
Duchenne /Becker	Xp21	Distrofina ^a	427	Citoesqueleto
LGMD2A	15q15	Calpaína 3	-	-
LGMD2B	2p13	Desconocido	-	-
LGMD2C	13q12	g-sarcoglicano, A4 ^a	35	Transmembrana
LGMD2D	17q21	a-sarcoglicano, A2 ^a	50	Transmembrana
LGMD2E	4q12	b-sarcoglicano, A3b ^a	43	Transmembrana
LGMD2F	5q33-3s4	d-sarcoglicano ^a	35	Transmembrana
LGMD1A	5q22-31	Desconocido	-	-
LGMD1B	1q11-21	Desconocido	-	-
Distrofia muscular congénita merosina negativa	6q22-23	Merosina (cadena a2) ^a	-	Matriz extracelular

^aProteínas con anticuerpos monoclonales comercializados.

codificador de la cadena $\alpha 2$, llamado LAMA2, que se sitúa en el intervalo 6q22-23 [24,25].

MÉTODOS

Sobre la biopsia muscular congelada en isopentano enfriado en nitrógeno líquido, se hacen cortes transversales de 7 μ m en criostato. Además de las tinciones histoenzimáticas habituales (hematoxilina-eosina, tricrómico de Gomori modificado, PAS, ORO, SDH, NADH y ATPasas a pH 9,4; 4,63 y 4,35) [26], se utiliza la técnica de peroxidasa amplificada con avidina-biotina, u otros métodos de inmunomarcaje. Un pequeño fragmento, congelado de forma similar, se reserva para Western blot.

Los anticuerpos monoclonales más utilizados y recomenda-

dos son: espectrina, distrofina (tres dominios), α -, β -, γ - y δ -sarcoglicano, merosina, $\alpha 2$ -laminina y DRP (dos dominios).

Para la técnica de Western blot, el fragmento de músculo se homogeneiza en solución de Laemmli [27] y se realiza una electroforesis (SDS-PAGE). Se transfieren las proteínas a una membrana de nitrocelulosa según el método de Towbin [28] y se realiza la inmunodetección de las proteínas deseadas mediante una reacción de quimioluminiscencia. El gel post-blot se tiñe con azul de Coomassie para valorar la cantidad de proteínas musculares totales. Los resultados se cuantifican con un sistema de documentación de geles (Gel Doc 1000. Bio-Rad).

RESULTADOS

Distrofinopatías

En los casos de DMD se observa ausencia total de distrofina tanto en inmunohistoquímica como en el Western blot [29-31] (Fig. 1), como resultado de la mutación 'frame-shift' que ocurre en el gen [32]. Sin embargo, en el 40% de los casos se encuentran algunas fibras distrofino-positivas, siempre menos del 3% del total, denominadas 'revertant fibres' [29-31]. Se supone que en estas fibras se ha producido una mutación somática que restaura la pauta de lectura y permite la producción de distrofina. La escasa cantidad de distrofina sintetizada por estas fibras no es apreciable en el Western blot [33,34]. El inmunomarcaje de las DAP es muy tenue o prácticamente inexistente ya que este complejo se desestabiliza al no existir distrofina [35]. Con respecto a la utrofina, se sobrepresa y adquiere la posición de la distrofina [35]. Diversos autores han sugerido que esta sobrexpresión podría ser un mecanismo que compensase los efectos de la ausencia de distrofina [36].

El patrón de inmunomarcaje de la distrofina observado en la DMB es más heterogéneo que el de la DMD. Puede existir irregularidad y/o disminución de la intensidad del marcaje, con fibras negativas [29-31]. Si además, la mutación 'in-frame' [32] afecta a alguno de los epítopes de los tres anticuerpos utilizados, el inmunomarcaje con este anticuerpo será totalmente negativo. En el Western blot, la banda de la distrofina puede mostrar un peso molecular aparentemente normal e intensidad disminuida, si es el resultado de una pequeña mutación; un peso molecular disminu-

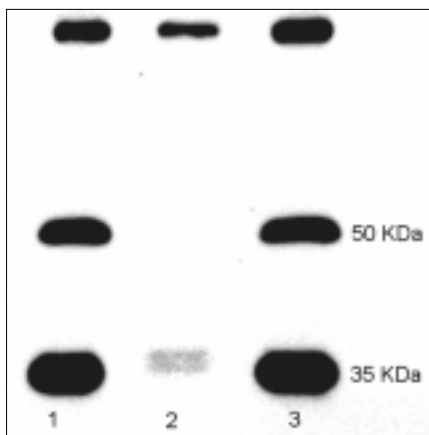


Figura 3. Western blot combinado de α - y γ -sarcoglicano de un caso de α -sarcoglicanopatía. Las calles 1 y 3 son controles. En el caso probando se observa una ausencia total de la banda de 50 kDa y un déficit importante de 35 kDa.

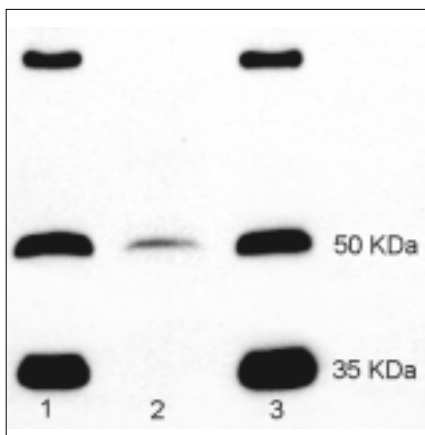


Figura 4. Western blot combinado de α - y γ -sarcoglicano. Las calles 1 y 3 son controles. La 2 corresponde a un caso de γ -sarcoglicanopatía en un niño de raza gitana. La banda de 35 kDa está totalmente ausente mientras que se observan trazas de 50 kDa. Posteriormente, se detectó la mutación C283Y.

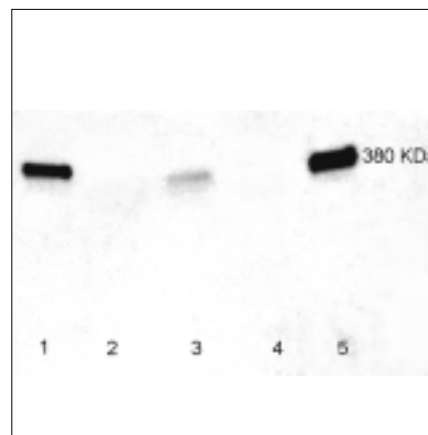


Figura 5. Western blot para merosina. calles 1 y 5 corresponden a músculos control. Las calles 2 y 4, a DMC occidental merosino-negativa. La calle 3, banda muy tenue, corresponde a un déficit parcial de merosina.

do (Fig. 1), si la mutación es una delección; o un peso molecular aumentado si ha ocurrido una duplicación [33,34] (Fig. 2). Como en la DMD, las DAP se encuentran alteradas secundariamente, aunque en menor grado, y la utrofina se sobrexprea especialmente en las fibras negativas para la distrofina.

Las portadoras sintomáticas presentan un patrón en mosaico, con grupos de fibras distrofina-positivas y grupos de fibras distrofina-negativas [29-31]. Esta imagen se invierte con la utrofina. El patrón de Western blot difiere entre portadoras de DMD y de DMB [37]. En el primer caso se observará una banda de peso molecular normal y una intensidad que dependerá del número de fibras distrofina-positivas. En el caso de una portadora de DMB con una extensa delección se observarán dos bandas, una de peso molecular normal y otra de peso molecular disminuido. Si la portadora de DMB presenta una duplicación la segunda banda será de mayor peso molecular.

Sarcoglicanopatías

El inmunomarcaje de las DAP en estas distrofias de cinturas sigue un modelo común que consiste en un déficit total o parcial de la proteína responsable de cada uno de los tipos y, secundariamente, una alteración del resto de las proteínas del subcomplejo sarcoglicano [38,39]. Dada la estrecha relación entre estas proteínas, la afectación de todas ellas suele ser muy marcada y, en ocasiones resulta difícil demostrar el defecto primario utilizando únicamente el inmunomarcaje. En todos los casos de sarcoglicanopatía la distrofina es normal. Estos resultados deben ser confirmados mediante Western blot (Figs. 3 y 4).

Distrofia muscular congénita, forma occidental

Se han descrito tres tipos diferentes de la forma occidental de DMC. En el primer tipo, DMC merosino-positiva, no se conoce la proteína deficitaria ni la localización genética, y la merosina muestra un inmunomarcaje normal [40]. Los casos de DMC me-

rosino-negativa muestran negatividad para esta proteína de la matriz extracelular y también de su cadena $\alpha 2$ -laminina [23,25]. El tercer grupo lo constituyen casos en los que existe un déficit parcial de merosina y que han sido descritos recientemente [41]. En todos los casos de DMC, las DAP y la distrofina muestran un inmunomarcaje normal. Como en los casos anteriores, estos resultados deberán ser confirmados mediante Western blot (Fig. 5).

CONCLUSIONES

Los recientes descubrimientos en el terreno genético y en la identificación de diversas proteínas del músculo esquelético han determinado la posibilidad de realizar un diagnóstico correcto en un número elevado de casos de distrofias musculares en el laboratorio de patología neuromuscular. Es decir, determinar la proteína deficitaria causante de la enfermedad como paso imprescindible para proceder al estudio genético.

Dada la sutileza de las diferencias en el inmunomarcaje de diversas proteínas relacionadas entre sí, especialmente las del complejo sarcoglicano, es difícil en ocasiones determinar la proteína deficitaria primariamente y cuáles lo son de forma secundaria. El déficit parcial de merosina en la DMC y algunos casos de DMB son igualmente difíciles de diagnosticar, por lo que es recomendable emplear una amplia batería de anticuerpos, que incluya espectrina y utrofina entre otros. Igualmente, la técnica de Western blot, con cuantificación mediante un sistema de documentación de geles adecuado, resulta imprescindible para un buen diagnóstico.

El estudio de la biopsia muscular por estos métodos debe preceder al estudio genético, que es siempre obligado. Éste debe realizarse en el paciente y en sus familiares para identificar heterocigotos portadores y establecer un adecuado consejo genético, así como el diagnóstico prenatal o preimplantación en los casos necesarios.

BIBLIOGRAFÍA

- Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987; 51: 919-28.
- Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987; 50: 509-17.
- Ervasti JM, Campbell KP. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 1991; 66: 1121-31.
- Beckmann JS, Richard I, Hillaire D, Broux O, Antignac C, Bois E, et al. A gene for limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 15 by linkage. *C R Acad Sci III* 1991; 312: 141-8.
- Matsumura K, Tomé FMS, Collin H, Azibi K, Chaouch M, Kaplan JC, et

- al. Deficiency of the 50K dystrophin-associated glycoprotein in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *Nature* 1992; 359: 320-2.
6. Fardeau M, Matsumura K, Tomé FMS, Collin H, Leturcq F, Kaplan JC, et al. Deficiency of the 50 kDa dystrophin associated glycoprotein (adhahin) in severe autosomal recessive muscular dystrophies in children native from European countries. *C R Acad Sci* 1993; 316: 799-804.
 7. McNally EM, Yoshida M, Mizuno Y, Ozawa E, Kunkel LM. Human adhahin is alternatively spliced and the gene is located on chromosome 17q21. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9690-4.
 8. Noguchi S, McNally EM, Ben Othmane K, Hagiwara Y, Mizuno Y, Yoshida M, et al. Mutations in the dystrophin-associated protein γ -sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. *Science* 1995; 270: 819-22.
 9. Piccolo F, Roberds SL, Jeanpierre M, Leturcq F, Azibi K, Beldjord C, et al. Primary adhalinopathy: a common cause of autosomal recessive muscular dystrophy of variable severity. *Nat Genet* 1995; 10: 243-5.
 10. Bönnemann CG, Modi R, Noguchi S, Mizuno Y, Yoshida M, Gussoni E, et al. β -sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nat Genet* 1995; 11: 266-73.
 11. Passos-Bueno MR, Moreira ES, Vainzof M, Marie SK, Zatz M. Linkage analysis in autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy (AR LGMD) maps a sixth form to 5q33-34 (LGMD2F) and indicates that there is at least one more subtype of AR LGMD. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 815-20.
 12. Bushby K. Towards the classification of the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Neuromusc Disord* 1996; 6: 439-41.
 13. Beckmann JS, Bushby MD. Advances in the molecular genetics of the limb-girdle type of autosomal recessive progressive muscular dystrophy. *Curr Opin Neurol* 1996; 9: 389-93.
 14. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 1988; 53: 219-28.
 15. Campbell KP, Kahl SD. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature* 1989; 338: 259-62.
 16. Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 1992; 355: 696-702.
 17. Ervasti JM, Campbell KP. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol* 1993; 122: 809-23.
 18. Crosbie RH, Heighway J, Venzke DP, Lee JC, Campbell KP. Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem* 1997; 272: 31221-4.
 19. Blake DJ, Love DR, Tinsley J, Morris GE, Turley H, Gatter K, et al. Characterization of a 4.8kb transcript from the Duchenne muscular dystrophy locus expressed in Schwannoma cells. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 103-9.
 20. Blake DJ, Tinsley JM, Davies KE. Utrophin: a structural and functional comparison to dystrophin. *Brain Pathol* 1996; 6: 37-47.
 21. Buckle VJ, Guenet JL, Simon-Chazottes D, Love DR, Davies KE. Localisation of a dystrophin-related autosomal gene to 6q24 in man, and to mouse chromosome 10 in the region of the dystrophin muscularis (dy) locus. *Hum Genet* 1990; 85: 324-6.
 22. Rigoletto C, Prella A, Ciscato P, Moggio M, Comi G, Fortunato F, et al. Utrophin expression during human fetal development. *Int J Dev Neurosci* 1995; 13: 585-93.
 23. Tomé FMS, Evangelista T, Leclerc A, Sunada Y, Manole E, Estournet B, et al. Congenital muscular dystrophy with merosin deficiency. *C R Acad Sci Paris* 1994; 317: 351-7.
 24. Hillaire D, Leclerc A, Faure S, Topaloglu H, Chiannilkulchai N, Guicheney P, et al. Localization of merosin-negative congenital muscular dystrophy to chromosome 6q2 by homozygosity mapping. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1657-61.
 25. Helbling A, Zhank X, Topaloglu H, Cruaud C, Tesson F, Weissenbach J, et al. Mutations in the laminin α_2 -chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Nat Genet* 1995; 11: 216-8.
 26. Dubowitz V. Histological and histochemical stains and reactions. In Dubowitz V, ed. *Muscle biopsy: a modern approach*. London: Baillière Tindall; 1985. p. 19-40.
 27. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
 28. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4350-4.
 29. Nicholson LVB, Davison K, Johnson MA, Slater CR, Young C, Bhattacharya S, et al. Dystrophin in skeletal muscle. II. Immunoreactivity in patients with Xp21 muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 1989; 94: 137-46.
 30. Teijeira S, Navarro C. Distrofinopatías: concepto y metodología diagnóstica. *Neurología* 1994; 9: 191-7.
 31. Cabello A. Valoración histológica e inmunohistoquímica de la distrofina en las distrofias musculares de Duchenne y de Becker. *Rev Neurol* 1995; 23 (Supl 3): S395-9.
 32. Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 1988; 2: 90-5.
 33. Nicholson LVB, Davison K, Falkous G, Harwood C, O'Donnell E, Slater CR, et al. Dystrophin in skeletal muscle I. Western blot analysis using a monoclonal antibody. *J Neurol Sci* 1989; 94: 125-6.
 34. Navarro C. Técnica de Western blot en el diagnóstico de las distrofinopatías. *Rev Neurol* 1995; 23 (Supl 3): S401-3.
 35. Mizuno Y, Yoshida M, Nonaka I, Hirai S, Ozawa E. Expression of utrophin (dystrophin-related protein) and dystrophin-associated glycoproteins in muscles from patients with Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 1994; 17: 206-16.
 36. Tinsley JM and Davies KE. Utrophin: a potential replacement for dystrophin? *Neuromusc Disord* 1993; 3: 537-9.
 37. Hoffman EP, Arahata K, Minetti C, Bonilla E, Rowland LP. Dystrophinopathy in isolated cases of myopathy in females. *Neurology* 1992; 42: 967-75.
 38. Vainzof M, Passos-Bueno MR, Canovas M, Moreira ES, Pavanetto RCM, Marie SK, et al. The sarcoglycan complex in the six autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1963-9.
 39. Duggan DJ, Gorospe JR, Fanin M, Hoffman EP, Angelini C. Mutations in the sarcoglycan genes in patients with myopathy. *N Engl J Med* 1997; 336: 618-24.
 40. Kobayashi O, Hayashi Y, Arahata K, Ozawa E, Nonaka I. Congenital muscular dystrophy: clinical and pathologic study of 50 patients with the classical (Occidental) merosin-positive form. *Neurology* 1996; 46: 815-8.
 41. Tan E, Topaloglu H, Sewry C, Zorlu Y, Naom I, Erdem S, et al. Late onset muscular dystrophy with cerebral white matter changes due to partial merosin deficiency. *Neuromusc Disord* 1997; 7: 85-9.

DISTROFINA Y PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA DISTROFINA. SU EVALUACIÓN EN EL LABORATORIO DE PATOLOGÍA NEUROMUSCULAR

Resumen. Objetivo. Describir las principales técnicas de detección de proteínas del músculo esquelético y la interpretación de sus resultados en relación con la nueva clasificación de las distrofias musculares progresivas. Material y métodos. Más de trescientas biopsias musculares con diversos tipos de distrofias se procesaron con inmunohistoquímica para distrofina, proteínas asociadas a la distrofina, espectrina y utrofina. En 120 de ellas, con resultados anormales, se hizo Western blot para diferentes proteínas. Resultados. La distrofia muscular de Duchenne (DMD) presenta inmunodetección y Western blot negativos para la distrofina y proteínas asociadas, así como sobreexpresión de utrofina. En la distrofia muscular de Becker (DMB) la distrofia tiene irregularidad en el inmunomarcaje y peso molecular alterado. Las sarcoglicanopatías presentan disminución de todos los sarcoglicanos con ausencia del primario y normalidad de la distrofina. En algunas formas de distrofia muscular congénita se encuentra ausencia de merosina y $\alpha 2$ -laminina, con valores variables en el Western blot. Conclusión. El análisis inmu-

NA DISTROFIA MUSCULAR DE BECKER (DMB) A DISTROFINA TEM IRREGULARIDADE NA IMUNOMARCAÇÃO E PÊSO MOLECULAR ALTERADO

Resumo. Objectivo. Descrever as principais técnicas de detecção de proteínas do músculo esquelético e a interpretação dos resultados em relação à nova classificação das distrofias musculares progressivas. Material e métodos. Mais de trezentas biopsias musculares com diversos tipos de distrofias foram processadas com imunohistoquímica para distrofina, proteínas associadas à distrofina, espectrina e utrofina. Em 120 delas, com resultados anormais, fez-se Western blot para diferentes proteínas. Resultados. A distrofia muscular de Duchenne (DMD) apresenta imunodeteção e Western blot negativos para a distrofina e proteínas associadas, assim como sobre-expressão de utrofina. As sarcoglicanopatias apresentam diminuição de todos os sarcoglicanos com ausência do primário e normalidade da distrofina. Em algumas formas de distrofia muscular congénita encontra-se ausência de merosina e $\alpha 2$ -laminina, com valores variáveis no Western blot. Conclusão. A análise imunohistoquímica conjunta de múltiplas proteínas citoesqueléticas e de

nohistoquímico conjunto de múltiples proteínas citoesqueléticas y de membrana es necesario, junto con el Western blot, para un diagnóstico correcto de las distrofinopatías, sarcoglicanopatías y las distintas formas de distrofia muscular congénita [REV NEUROL 1999; 28: 154-8].

Palabras clave. *Distrofia de cinturas. Distrofia muscular congénita. Distrofina. Merosina. Proteínas asociadas a la distrofina. Sarcoglicanopatías. Utrofina.*

membrana é necessária, juntamente com o Western blot, para um diagnóstico correcto das distrofinopatias, das sarcoglicanopatias e das distintas formas de distrofia muscular congénita [REV NEUROL 1999; 28: 154-8].

Palavras chave. *Distrofia de cinturas. Distrofia muscular congénita. Distrofina. Merosina. Proteínas associadas à distrofina. Sarcoglicanopatias. Utrofina.*