

Università degli studi di Cagliari

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE E BIOTECNOLOGICHE

DOTTORATO DI RICERCA

“TERAPIA PEDIATRICA E FARMACOLOGIA DELLO SVILUPPO”

XIX CICLO

**DISCIPLINA: SCIENZE MEDICHE
PEDIATRIA GENERALE E SPECIALISTICA**

TESI

***MALATTIE RARE IN GENETICA CLINICA: VARIABILITA' E
DISTRIBUZIONE NELLA POPOLAZIONE SARDA, APPLICAZIONE DI
TEST GENETICI, STUDIO DELLE NUOVE PROSPETTIVE TERAPEUTICHE.***

Tutor:
Prof. Stefano De Virgiliis

Tesi di Dottorato della:
Dott.ssa Monica Marica

Anno Accademico 2005-2006

INDICE

• INTRODUZIONE:

o DISTROFIE MUSCOLARI	Pag.	4
o DISTROFINOPATIE :	Pag.	11
Genetica		16
Clinica :		21
DM di Duchenne		22
DM di Becker		25
XLDMC		26
Diagnosi:		27
Trattamento e tentativi terapeutici:		31
Consulenza genetica		36
o DISTROFIE MUSCOLARI DEI CINGOLI :	Pag.	37
LMGD AR		39
Sarcoglicanopatie		42
Calpainopatie		46
Disferlinopatie		51
Teletoninopatie		55
LGMD2H		55
LGMD2I		56
LGMD AD		58
Miotilinopatie		59
Laminopatie		60
Caveolinopatie		62
LGMD1D-E-F-G		63
Diagnosi:		64
Consulenza genetica		66
Trattamento		67
o DISTROFIA MUSCOLARE FACIO-SCAPOLO-OMERALE :	Pag.	69
Diagnosi		71
Genetica		71
Trattamento		74
Consulenza genetica		74

• PAZIENTI E METODI:	Pag. 76
• RISULTATI:	
o DISTROFINOPATIE	Pag. 86
o DISTROFIE MUSCOLARI DEI CINGOLI	Pag. 96
o DM FACIO-SCAPOLO-OMERALE	Pag. 105
• DISCUSSIONE:	
o DISTROFINOPATIE	Pag. 114
o DISTROFIE MUSCOLARI DEI CINGOLI	Pag. 118
o DM FACIO-SCAPOLO-OMERALE	Pag. 142
• CONCLUSIONI	Pag. 144
• BIBLIOGRAFIA	Pag. 146

INTRODUZIONE

DISTROFIE MUSCOLARI

Le distrofie muscolari sono un gruppo di disordini degenerativi del muscolo geneticamente eterogeneo, caratterizzato da progressiva perdita della forza e dell'integrità muscolare.

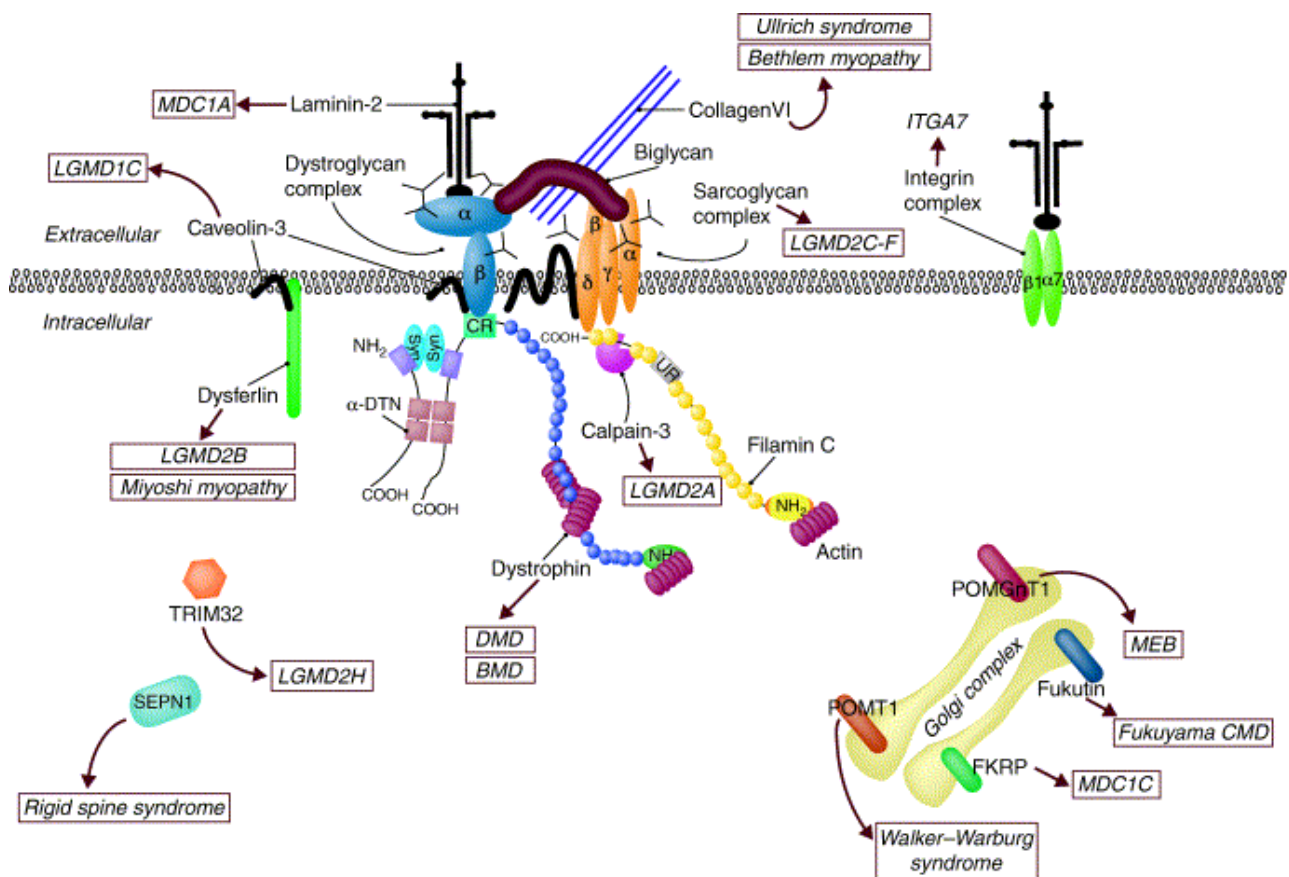
Distrofia muscolare è un termine generico che descrive un gruppo di disordini miogenici ereditari, caratterizzati da una progressiva disorganizzazione e atrofia del muscolo con variazione dello spessore delle fibre muscolari, aree di necrosi con incremento della quantità di grasso e di tessuto connettivo.

La malattia muscolare riguarda l'anello terminale dell'unità motoria. La debolezza muscolare, o difetto di forza, colpisce la muscolatura prossimale dei cingoli scapolare e pelvico e, in certe forme in modo suggestivo, quella del collo e della faccia.

Negli ultimi due decenni, il notevole sviluppo delle ricerche di genetica molecolare ha consentito di identificare molti dei geni coinvolti in tali malattie e ha fornito così la chiave per decifrarne la patogenesi molecolare; attualmente sono stati mappati 29 differenti loci che danno origine a 34 distinti disordini che variano per l'età di inizio, grado di severità, modo di ereditarietà, e gruppi muscolari che sono primariamente coinvolti.

La membrana delle fibre muscolari (sarcolemma) è la vera responsabile di questo gruppo di malattie e la sua composizione proteica, ora molto più nota, risulta straordinariamente complessa.

Fig.1: distrofie muscolari e membrana con proteine enzimatiche associate



Appare evidente che la fibra muscolare è in comunicazione molto stretta con la membrana basale e la matrice extracellulare (ECM), e che le proteine della membrana sarcolemmatica realizzano questo legame.

Ogni alterazione della composizione proteica e dell'equilibrio della membrana si traduce in una destabilizzazione, che invariabilmente esita in distruzione della fibra muscolare.

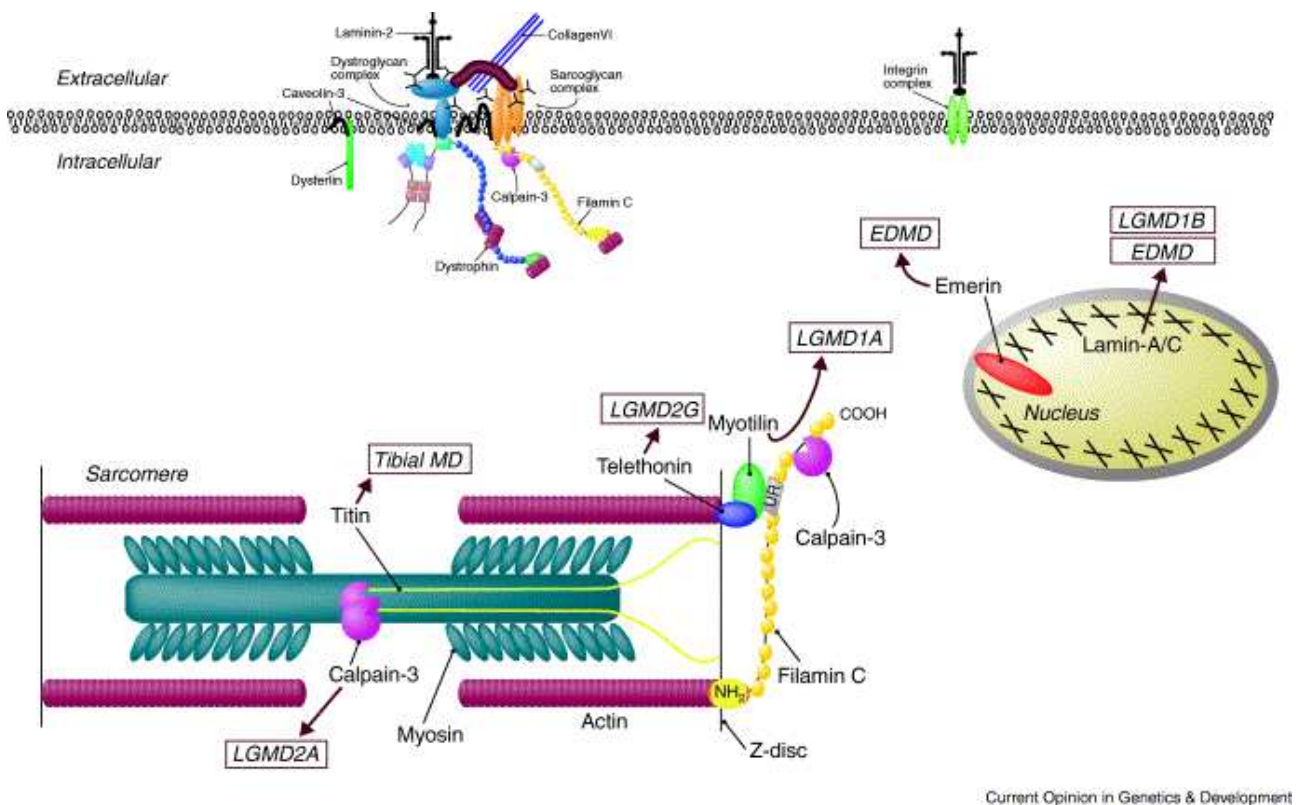
Questo complesso sarcolemma-membrana basale/matrice extracellulare è composto, per quanto oggi noto, da:

- Proteine proprie della membrana sarcolemmatica (distrofina, sarcoglicani, dysferlina, caveolina-3)

- Proteine della matrice extracellulare (alfa2 laminina o merosina, collagene 6)
- Proteine sarcomeriche (teletonina, myotilina, titina, nebulina)
- Proteine del citoplasma muscolare (calpaina 3)
- Proteine nucleari (emerina, lamina A/C)
- Proteine della via glicosilativa (fukutina, proteina fukutina-correlata o FKRP)

Tutte indispensabili per l'integrità del sarcolemma.

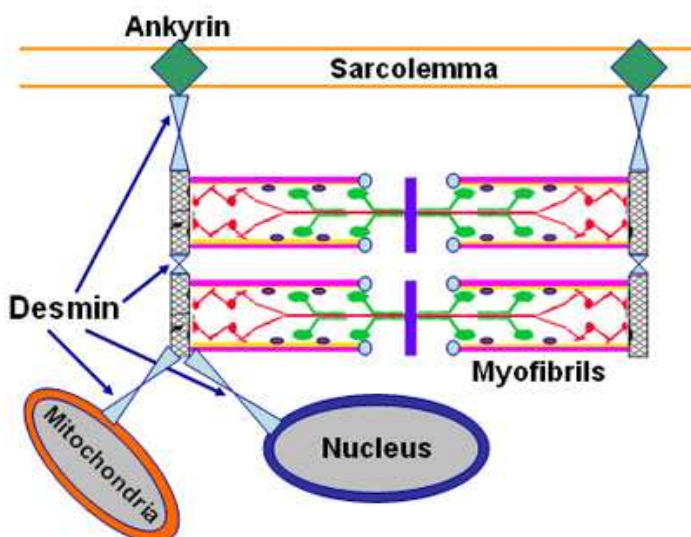
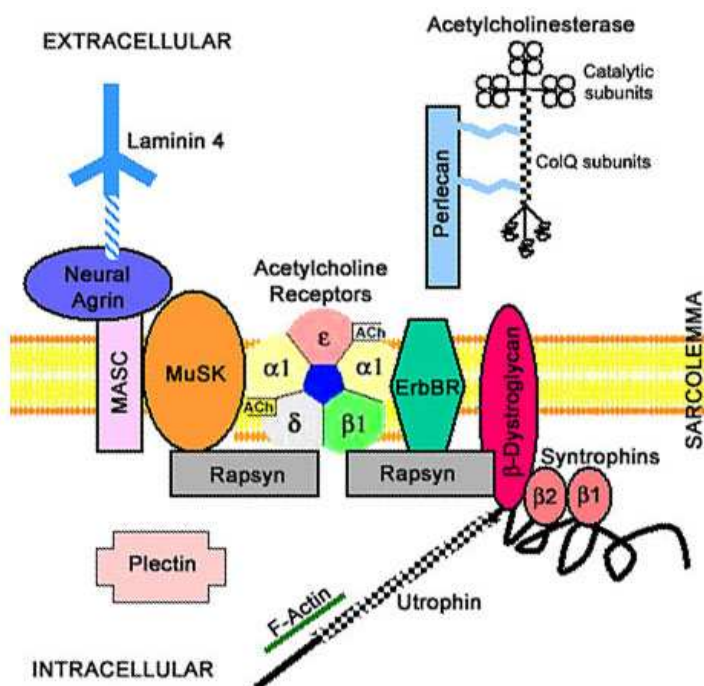
Fig.2: proteine nucleari e sarcomeriche coinvolte nelle distrofie muscolari



La disponibilità di sempre più raffinati markers biochimici e genetici ha rivoluzionato non solo la diagnostica, ma anche la comprensione di meccanismi patogenetici di queste malattie, anche se il cammino da fare in questa direzione resta notevole.

Tuttavia questo progresso ha messo in crisi le classificazioni basate sull'analisi del fenotipo, dimostrando che malattie apparentemente identiche dal punto di vista clinico possono essere dovute a mutazioni in geni diversi, così come mutazioni di uno stesso gene possono produrre fenotipi clinici diversi.

Ogni classificazione allo stato attuale non può che essere considerata temporanea, ma ha il pregio di indicare rapidamente i progressi fatti in campo genetico-molecolare.



Tab1: classificazione clinico-genetico-molecolare delle distrofie muscolari

Malattia	Ereditarietà	Locus genetico	Gene	Proteina Deficitaria	OMIM
Distrofinopatie primitive: DMD/BMD	XR	Xp21.2	DYS	Distrofina	310200
DM dei cingoli:					
LGMD 1A	AD	5q31	TTID	Miotilina	159000
LGMD 1B	AD	1q11-21	LMNA	Lamina A/C	159001
LGMD 1C	AD	3p25	CAV3	Caveolina	601253
LGMD1D	AD	6q23			602087
LGMD1E	AD	7q			603511
LGMD2A	AR	15q15.1-	CAPN3	Calpaina3	253600
LGMD2B	AR	21.1-2p13.3	DYSF	Disferlina	603009
LGMD2C	AR	13q12	SGCG	γSarcoglicano	253700
LGMD2D	AR	17q12-21.33	SGCA	αSarcoglicano	600119
LGMD2E	AR	4q12	SGCB	βSarcoglicano	253700
LGMD2F	AR	5q33-34	SGCD	λSarcoglicano	253700
LGMD2G	AR	17q11-12		Telethonina	253700
LGMD2H	AR	9q31.34.1			254110
LGMD2I	AR	19q13.3		FKRP	
DM facio-scapolo-omeroale	AD	4q35			
DM omero-peroneale (Emery-Dreyfuss)	XR-AD/AR	Xq28 1q	EMD LAM1	Emerina Lamina A/C	310300 181350
DM congenite (CMD)	AR				
MDC1A		6q 22.23	MDC1A	LamininaA2 o Merosina	156225
MDC1B		1q	sconosciuta	Gruppo delle Laminine	604801
MDC1C		19q	FKRP	Fukutin-related protein	
Deficit di integrinaA7	AR	12q	RSMD1	Integrina A7	600536
Sindrome spina rigida	AR	1p35		SEPN1 selenoproteina	602771
Bethlem myopatya 1	AR	21q22	COL6A1	Collagene6A1	120220
Bethlem myopatya 2	AR	21q22	COL6A2	Collagene6A2	120240
Bethlem myopatya3	AR	2q37	COL6A3	Collagene6A3	120250
Ulrich scleroatonicMD	AR	21q22,2q37	COL6A2	Collagene6A2	

Forme gravi con anomalie occhio e SNC: CMD di Fukuyama	AR	9q31-34.1		Fukutina	253800
Muscle-eye-brain disease (MEB)	AR	1p32-34	POMGnT1	O-mannosil-acetilglucosaminil-transferasi	253280
Walker-Warburg syndrome WWS	AR	9q	POMT1	Omannosiltransferasi 1	
Miopatie distali:					
Miopatia di Myoshi	AR	2p12-14	DYSF	Dysferlina	254130
Miopatia “rimmel vacuoles”	AR	9p1-q1			600737
Miopatia “inclusion body”	AR	9p1-q1	GNE		601073
Miopatia distale dominante	AD	14	MPD1		160500
Distrofia muscolare tibiale	AD	2q31			600334

(Current Opinion in Genetics e Development 2003, 13.231-238)

DISTROFINOPATIE

Le distrofinopatie includono uno spettro di disordini muscolari causati dalla mutazione del gene DMD, che codifica per una proteina chiamata Distrofina.

La distrofina è il prodotto di un grosso gene di 2,4 milioni di basi e 79 esoni, che si localizza nel braccio corto del cromosoma X (Xp21), ha un trascritto di 14.000 nucleotidi corrispondente a una proteina di 3.600 aminoacidi.

Il gene della distrofina è il gene di maggiori dimensioni fra quelli finora noti nel genoma umano.

Il suo mRNA è espresso nel muscolo scheletrico, cardiaco e liscio, ma anche in tessuti non muscolari, come il cervello e il rene (isoforme della distrofina).

Tutti questi tessuti mostrano vari gradi di coinvolgimento clinico.

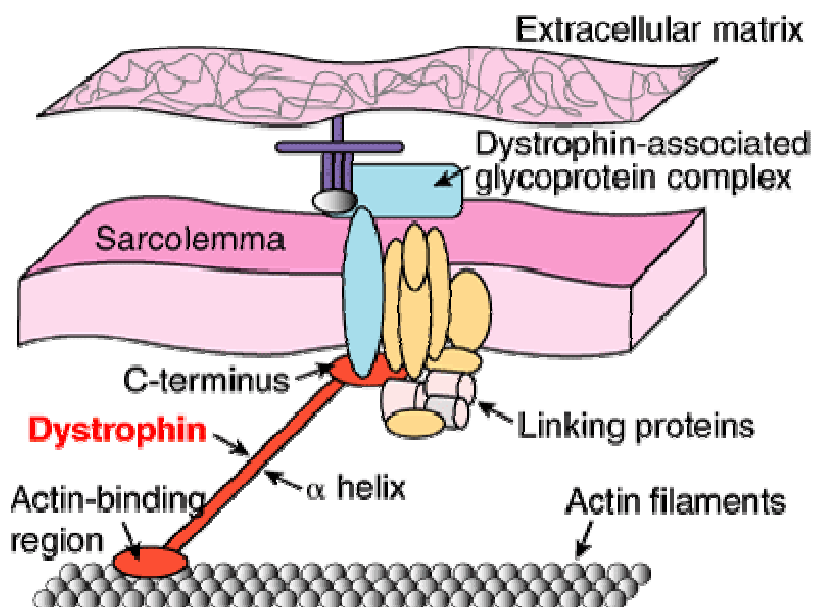
La distrofina compare, nello sviluppo del muscolo fetale umano, alla 11° settimana di gestazione.

La distrofina è una larga proteina intracellulare di 400.000 dalton, ha sede immediatamente subsarcolemmale e garantisce la flessibilità e la stabilità della membrana cellulare; è il legame tra il citoscheletro intracellulare e la matrice extracellulare. La porzione carbossiterminale della distrofina è attaccata al sarcolemma, la membrana superficiale del muscolo striato, al beta-distroglicano e ai siti glicoproteina-distrofina associati. Quando la distrofina non è in grado di legare il beta-distroglicano, si ha la perdita del complesso beta-distroglicano sarcoglicano dal sarcolemma.

La destabilizzazione di questo complesso porta a una sregolazione della concentrazione intracellulare di Calcio, ed è proprio l'eccesso di Calcio ad attivare processi di proteolisi Ca-dipendente e a provocare la disfunzione dei mitocondri e la morte cellulare, sia per apoptosi, sia per veri e propri fenomeni di necrosi.

Il complesso distrofina- glicoproteine (DCG) è un aggregato di proteine e glicoproteine integrali di membrana e periferiche, raggruppate in tre sotto complessi principali (dystroglicano, sarcoglicano e sintrofina) che funge da ponte attraverso la membrana plasmatica tra l'actina del citoscheletro e la matrice extracellulare.

Fig.3



La molecola è costituita da 3685 aminoacidi, ha una forma allungata composta da quattro distinte zone o domini:

- Il terminale NH₂ (porzione N terminale) (in rosso nella fig 4) consta di 250 aminoacidi ed ha estrema affinità di legame con la F-actina del citoscheletro della fibra muscolare, consentendo alla distrofina di “tradurre” i messaggi all’interno della fibra;
- Il lungo dominio bastoncellare centrale (blue fig4) detto anche dominio “rod-like” caratterizzato da una struttura a tripla elica ripetuta 24 volte (spectrin-like repeats R1-R24), di 2840 aminoacidi, ricco di motivi nucleotidici assimilabili a quelli delle spectrine e, come queste, coinvolto nei processi di trasmissione intracellulare dei segnali di provenienza dalla membrana cellulare; contiene inoltre 4 regioni “cardine” (turchese fig4) H1-H4;
- Il dominio ricco di cisteina (verde fig 4) di soli 280 aminoacidi, coinvolto nei legami con il Ca⁺⁺ e con il beta-distroglicano (β DG) che consente la connessione della distrofina con la ECM;
- Il terminale COOH, di 400 aminoacidi, è una regione di estrema importanza, che contiene il sito di legame con le sintrofine e con altre glicoproteine di membrana, oltre che essere il substrato di alcune proteinkinasi citosoliche.

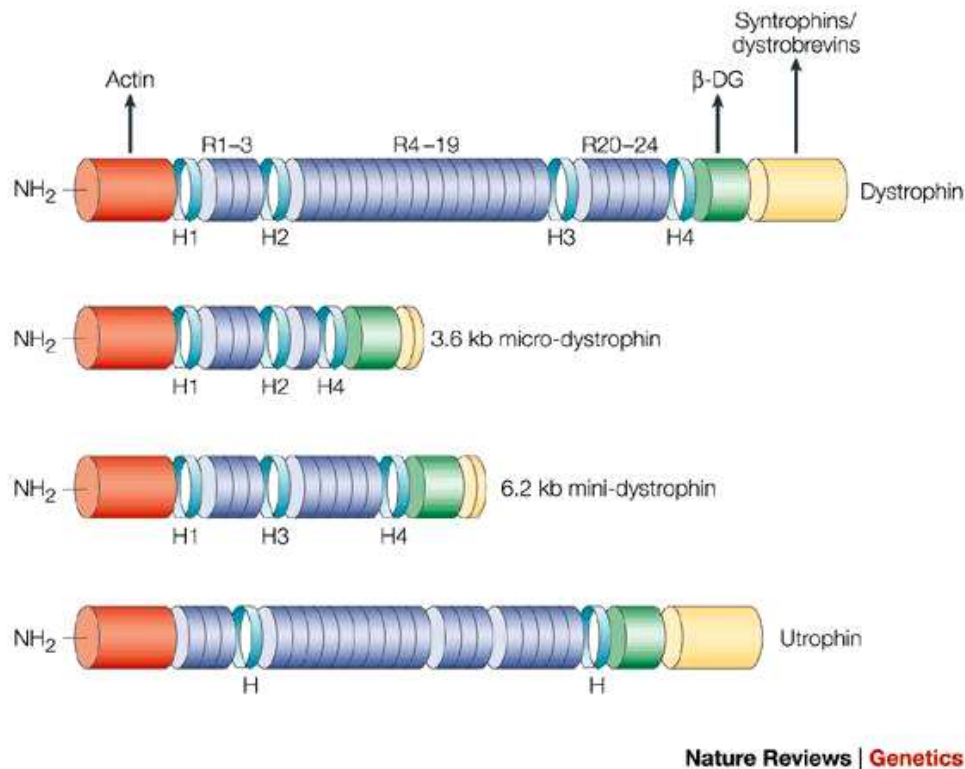


Fig.4 : Domini strutturali della distrofina, mini e micro-distrofina, e utrofina.

UTROFINA

Nelle prime fasi di sviluppo la distrofina è assente, mentre il DGC è già assemblato attorno ad un'altra proteina strutturalmente e funzionalmente molto simile, l'utrofina.

Quest'ultima è codificata da un gene (UTRN), di grandezza approssimativamente di un terzo di quello della distrofina, mappato sul cromosoma 6q24, il suo trascritto è di 13 Kb. Nel muscolo adulto normale l'espressione dell'utrofina è limitata alla giunzione neuromuscolare.

Come la distrofina, (Fig 4) lega a un estremo (dominio N-terminale) i filamenti di actina e all'altro (dominio C-terminale) il beta-distroglicano, costituendo un

complesso laminina-distroglicani-utrofina-actina alla stregua della distrofina.

Contiene anche un dominio centrale avvolto a spirale (coiled-coil rod domain)

manca dei repeats 15 e 19, e due regioni cardine (hinge regions).

Una strategia di ricerca alternativa molto promettente si è concentrata sulla possibilità di riattivare artificialmente l'espressione dell'utrofina.

Sono stati identificati alcuni fattori in grado di aumentare l'espressione di

Utofina;

“L'iperespressione di utrofina in topi transgenici con distrofia muscolare (mdx)

mostra che elevati livelli di quest'ultima sono in grado di correggere il fenotipo

patologico riducendo marcatamente la patologia distrofica, ristabilendo il DGC e

facendo tornare normali i livelli di CPK senza causare apparenti disturbi in altri

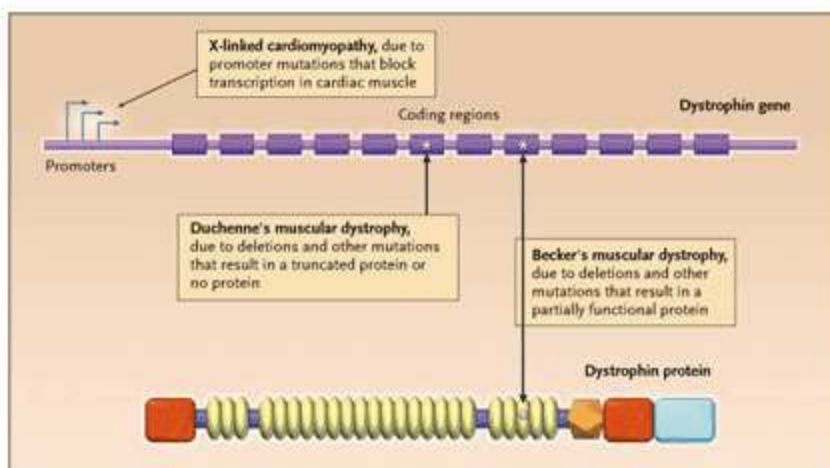
distretti”.

GENETICA

Il gene della distrofina presenta almeno 7 diversi trascritti alternativi, dovuti a promotori diversi ed espressi in tessuti diversi. Oltre al trascritto tipico delle cellule muscolari scheletriche, è stato identificato ad esempio un trascritto più lungo, tipico delle cellule cerebrali, ed uno, molto più corto, tipico delle cellule della retina.

A livello cerebrale sono stati individuati un promoter e un primo esone alternativi e, inoltre, la regione non tradotta 5' del mRNA nel tessuto nervoso appare altamente conservata lungo l'evoluzione, fatto che non si verifica per l'omonima regione del muscolo.

Fig.5



Il grosso gene della Distrofina, pur essendo molto conservato nella specie, subisce un notevole numero di mutazioni responsabili dei diversi quadri clinici di Distrofinopatia.

DMD è il solo gene associato a distrofinopatia.

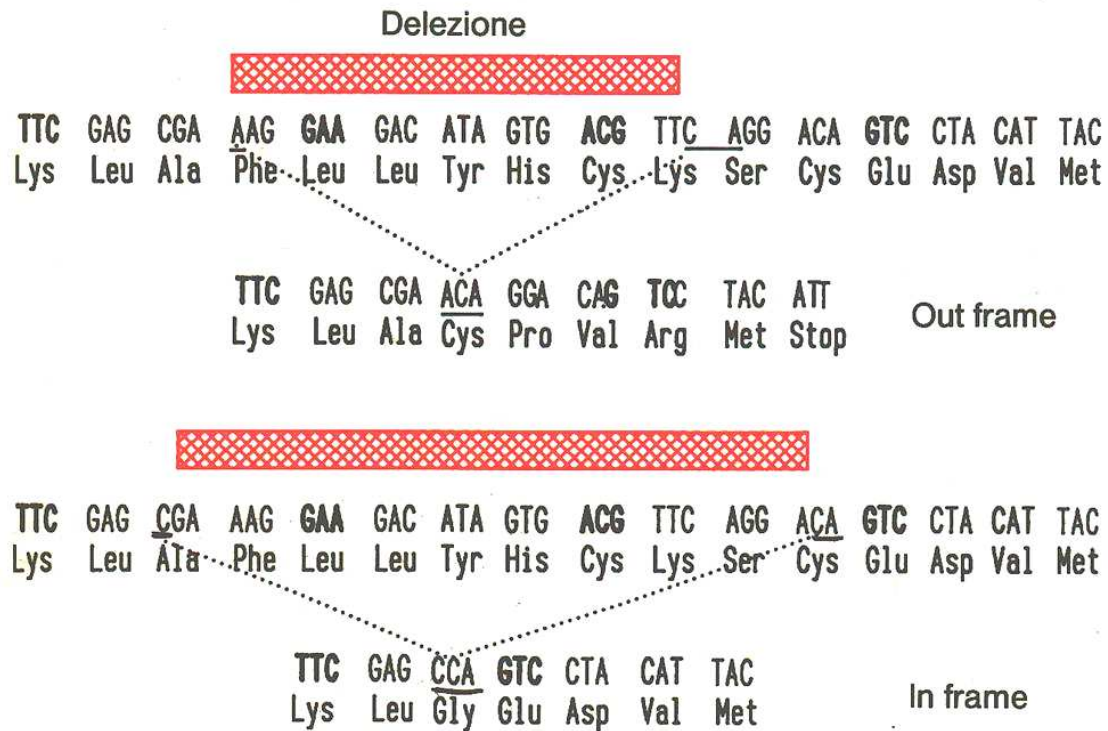
La forma più frequente di mutazione è la delezione di porzioni più o meno estese del gene.

Le delezioni del gene della distrofina ricorrono preferenzialmente in due punti caldi “hot-spot”: uno localizzato nella regione prossimale del gene, all’incirca in corrispondenza degli esoni 3-7 e l’altro nella regione centrale del gene tra gli esoni 44 e 48. Le delezioni intrageniche sono responsabili di circa il 65% dei fenotipi clinici (DMD e BMD); l’incidenza insolitamente alta di delezioni (65%) appare giustificata dalle dimensioni del gene.

Nei maschi con DMD e BMD, il fenotipo è meglio correlato con il grado di espressione della distrofina, il quale è ampiamente determinato dal “reading frame” cioè dall’effetto della delezione sulla fase di lettura del DNA e di conseguenza con il tipo di proteina che viene prodotta.

Nei pazienti con Distrofia muscolare di Duchenne si osservano delezioni che interrompono una tripletta codificante per un determinato aminoacido, determinando così una lettura sfalsata della sequenza nucleotidica (delezioni out-frame) che, oltre a produrre una sequenza aminoacidica completamente diversa, dà luogo ben presto alla formazione di un codone di STOP con prematura interruzione della catena polipeptidica. Le delezioni nei pazienti con distrofia

muscolare di Becker invece, interrompono gli esoni mantenendo però inalterata la fase di lettura (delezioni in frame) per cui si produce una proteina più corta, ma con sequenza aminoacidica rispettata.



Queste delezioni rendono conto del 65% dei casi di distrofia muscolare di Duchenne (DMD) e dell'85% di quelli della più lieve distrofia muscolare di Becker (BMD). Queste stesse regioni del gene possono andare incontro a “duplicazione”, meccanismo che giustifica un altro 5% circa dei casi di DMD/BMD.

Il restante 30 % dei casi è dovuto a mutazioni “puntiformi”, ossia sostituzioni di singoli nucleotidi, delezioni e duplicazioni di uno o più nucleotidi. Una mutazione “nonsense” (genesi di un codone di stop) dà luogo a un fenotipo grave (DMD) a causa del precoce arresto della traduzione, mentre mutazioni “missense”

(sostituzioni aminoacidiche) possono dare luogo a fenotipi clinici BMD, a fenotipi paucisintomatici o apparentemente nullisintomatici, a seconda dell'aminoacido sostituito e della sua posizione lungo la molecola proteica.

Nei casi con mutazione puntiforme o piccole delezioni /inserzioni non esiste, alcuna possibilità di correlazione clinica; non esistono sedi privilegiate del gene, perché si possono verificare in tutta la sua lunghezza, anche se le mutazioni puntiformi colpiscono in generale l'esone 55 e, spesso, i tratti del gene non codificanti, di cui non si conosce ancora la struttura completa.

Data l'estrema complessità del gene della distrofina, 79 esoni estesi in 2,4 Mb del DNA e per il fatto che le mutazioni puntiformi sono disseminate lungo tutto l'intero gene, un efficiente screening di routine delle microlesioni è difficoltoso, richiede molto tempo ed è molto costoso.

Mutazioni puntiformi out-of-frame spesso causano codoni di STOP e risultano in assenza di Distrofina. Se l'esone 1 e la regione del promoter sono coinvolti genotipicamente, il fenotipo è di lieve debolezza e più probabilmente severa cardiomiopatia.

Se è coinvolto l'esone 45, il risultato può essere uno dei due fenotipi Duchenne/Becker.

Larghe delezioni o duplicazioni sono usualmente trovate in NH2 terminale o rod domains. La delezione di più di 36 esoni produce un fenotipo severo.

Nei casi con delezione non esiste correlazione fra gravità clinica e mutazione all'interno del gene; tuttavia, è possibile che la perdita del terminale COOH,

fondamentale per la stabilità della distrofina e della membrana cellulare, coincide con quadri gravi di DMD, mentre delezioni o anche mutazioni puntiformi all'interno del dominio centrale che tuttavia non facciano perdere la corrispondenza nucleotidica, sarebbero alla base di forme meno gravi di BMD.

La maggioranza delle mutazioni missense rilevate nei pazienti BMD sono state trovate nella porzione del gene che corrisponde alla parte N-terminale della proteina, mentre la parte centrale (il cosiddetto rod) tollera maggiormente eventuali mutazioni missense.

L'osservazione che ampie delezioni in-frame del gene della distrofina si associavano a un fenotipo clinico mite in pazienti affetti da Distrofia muscolare tipo Becker mite, dimostra che una larga parte del gene non è vitale per la funzione.

Le delezioni nel dominio N-terminale sono associate a un fenotipo relativamente attenuato, il che indica che questa regione è importante, ma non essenziale per l'attacco dell'actina al citoscheletro. In contrasto, la delezione nel dominio ricco di cisteina causa severa distrofia dovuta alla distruzione dell'intero complesso distrofina-glicoproteina. Il dominio C-terminale, con un vario pattern di splicing alternativi non sembra essere richiesto per l'assemblaggio dell'intero complesso.

Una serie di larghe delezioni sono state valutate in dominio centrale rod domain, e indicano che tuttavia la rod struttura è indispensabile, e il numero dei repeat può essere marcatamente ridotto.

Alcune sostituzioni nucleotidiche possono riguardare siti di splicing e risultare patogene in quanto fanno saltare un intero esone (“exon skipping”).

Queste ricerche sono fondamentali per lo studio della terapia genica della DM di Duchenne .

CLINICA

Le distrofinopatie comprendono uno spettro di disordini muscolari che vanno da fenotipi attenuati, quali l’aumento asintomatico delle CPK, crampi muscolari con mioglobinuria e isolata miopatia dei quadricipiti a fenotipi severi come la Distrofia muscolare di Duchenne, di Becker, e la DMD correlata a cardiomiopatia dilatativa .

La distinzione tra Distrofia muscolare di Duchenne (DMD) e quella di Becker (BMD) si basa essenzialmente sull’età di dipendenza dalla sedia a rotelle: prima dei 13 anni in DMD e dopo i 16 anni in BMD. E’ stato riconosciuto un gruppo intermedio di individui che diventa dipendente dalla sedia a rotelle tra i 13 e i 16 anni. Diversi ricercatori hanno esteso nello spettro di BMD fenotipi attenuati che includono individui con elevate concentrazioni di CPK sieriche e anormale distrofina alla biopsia muscolare, ma con coinvolgimento “subclinico” della muscolatura scheletrica. Quando questi individui con disturbi atipici sviluppano severa cardiomiopatia, non è possibile distinguerli tra BMD e DMD-correlata-DCM.

L'interessamento cardiaco è usualmente asintomatico nei primi stadi del disturbo, tuttavia sono state notate tachicardia sinusale e varie anomalie ECG.

L'ecocardiografia è normale e mostra solo anomalie regionali.

Interessamento cardiaco subclinico o clinico è presente approssimativamente nel 90% degli individui con DMD/BMD, tuttavia l'interessamento cardiaco è causa di morte solo nel 20% degli individui con DMD e nel 50% di quelli con BMD.

La cardiomiopatia dilatativa (DCM) generalmente si presenta con scompenso cardiaco congestizio secondario a incremento del volume ventricolare e riduzione della funzione ventricolare. Nei maschi con XLDCM è rapidamente progressivo con inizio nell'età adolescenziale, portando a morte in uno o due anni dopo la diagnosi. Individui con DCM possono o non possono avere evidenza clinica di alterazione della muscolatura scheletrica.

DM di DUCHENNE

La DM di Duchenne è la più comune malattia neuromuscolare ereditaria (è il più frequente disordine ereditario letale dell'infanzia) che colpisce tutte le razze e i gruppi etnici.

La sua incidenza è di 1:3600 maschi nati vivi.

La diagnosi clinica è basata essenzialmente su tre criteri:

- Progressiva debolezza muscolare simmetrica maggiormente prossimale che distale, spesso con ipertrofia dei polpacci
- Sintomi presenti prima dei 5 anni

- Perdita della capacità di deambulare e utilizzo di sedia a rotelle prima dei 13 anni

I maschi affetti sono raramente sintomatici alla nascita o nella prima infanzia, sebbene alcuni possano già presentare una modesta ipotonia.

Lo sviluppo psicomotorio e l'acquisizione della marcia solitamente avvengono in epoca appropriata o in leggero ritardo.

DMD si manifesta clinicamente entro i primi 3-4 anni di vita con frequenti cadute, difficoltà a salire e scendere le scale, correre, alzarsi da una sedia, sollevare le braccia. La debolezza muscolare si presenta inizialmente nel cingolo pelvico e successivamente nel cingolo scapolare con difficoltà a eseguire tutti i movimenti che richiedono principalmente il lavoro della muscolatura prossimale.

La rotazione anteriore delle anche, determinata dalla debolezza muscolare dei glutei, determina una iperlordosi lombare con andatura che diventa anserina.

La “manovra di Gowers” che mostra la difficoltà ad alzarsi in piedi si rende evidente entro il terzo anno di età e si esprime chiaramente intorno al 5°-6° anno.

L'ipertrofia dei polpacci (pseudoipertrofia) con sostituzione fibroadiposa del muscolo degenerato si rende ben evidente all'età di 4-5 anni. I riflessi osteotendinei diminuiscono nel tempo e i rotulei scompaiono abbastanza precocemente, in contrasto i riflessi Achillei sono usualmente eccitabili per molti anni.

La perdita di forza muscolare ha luogo quando circa un terzo della massa muscolare di un dato distretto è stata perduta.

DMD è rapidamente progressiva e i bambini affetti diventano dipendenti dalla sedia a rotelle dall'età di 12 anni. Nei bambini con DMD, l'incidenza di cardiomiopatia aumenta progressivamente nell'età adolescenziale, con approssimativamente 1/3 di individui affetti dall'età di 14 anni, metà dall'età di 18 anni, tutti dopo i 18 anni.

Pur essendo l'intelligenza normale, alcuni pazienti mostrano vari gradi di debilità mentale non progressiva. E' stato visto che le difficoltà verbali viste nei ragazzi con DMD sono principalmente il risultato di turbe della memoria verbale a breve termine, più recentemente è stato notato un particolare deficit di memoria e delle funzioni esecutive; una isoforma della distrofina espressa nel cervello e nelle cellule del Purkinje contribuisce al mantenimento della stabilità delle connessioni sinaptiche importante nei processi cognitivi.

Delezioni delle porzioni più distali del gene sono spesso associate a Ritardo Mentale, approssimativamente il 20-30% dei pazienti ha un QI inferiore a 70; la maggior parte presenta difficoltà di apprendimento che, tuttavia, permette loro di frequentare la scuola con sostegno; pochi pazienti presentano un grave ritardo mentale, ma non esiste correlazione con la gravità della miopatia.

I pazienti con DMD per la ridotta mobilità hanno una ridotta densità ossea, con aumento del rischio di fratture; il trattamento con corticosteroidi aumenta il rischio di fratture con compressione vertebrale, molte delle quali sono asintomatiche. Anche la scoliosi diventa rapidamente progressiva dopo il confinamento sulla sedia a rotelle. Pochi sopravvivono oltre la terza decade. Le complicanze respiratorie e la cardiomiopatia sono le più comuni cause di morte. Il coinvolgimento dei muscoli

respiratori si esprime con tosse debole e inefficace, infezioni polmonari recidivanti e diminuzione del volume respiratorio.

DM di BECKER

La DM di Becker ha una incidenza di 1:18.500 maschi nati vivi, è caratterizzata da:

- Progressiva debolezza muscolare simmetrica e atrofia, maggiormente nei muscoli prossimali, spesso con ipertrofia dei polpacci (la debolezza del quadricipite femorale può essere il solo segno)
- L'attività può indurre crampi (presenti in alcuni individui)
- Contrattura in flessione dei gomiti (se presente, tardiva)
- Dipendenza dalla sedia rotelle (se presente dopo i 16 anni)
- Preservata la forza dei muscoli flessori del collo

La presenza di fascicolazioni o la perdita della sensibilità esclude la diagnosi di Distrofinopatia.

La DM di Becker ha un quadro clinico meno grave da tutti i punti di vista, la debolezza muscolare ha un inizio più tardivo, con individui che camminano sino ai 20 anni, e la sopravvivenza è più lunga. Non raramente l'esordio è anomalo, in forma di crampi, mialgie e episodi di mioglobinuria. A dispetto del coinvolgimento più lieve della muscolatura scheletrica, le alterazioni cardiache sino alla DCM sono la più comune causa di morbidità e di morte.

Vengono classificati come Becker anche individui con inizio dei sintomi dopo l'età di 30 anni, che deambulano sino all'età di 60, individui moderatamente affetti con conferma genetica o dalla biopsia muscolare di distrofinopatia, individui con

iperCPKemia, ipertrofia dei polpacci, crampi muscolari, mialgia, mioglobinuria e individui con interessamento “benigno” della muscolatura scheletrica, accompagnati da debolezza muscolare del cingolo pelvico o scapolare.

DMD correlata a CARDIOMIOPATIA DILATATIVA

Questa forma è caratterizzata da :

- Cardiomiopatia dilatativa con scompenso cardiaco congestizio con presentazione tipica nei maschi all’età di 20-40 anni e nelle femmine in epoca tardiva
- Usualmente non evidenza clinica di disturbi dei muscoli scheletrici
- Rapida progressione alla morte in diversi anni nei maschi e progressione più lenta, oltre la decade nelle femmine

L’associazione con l’aritmia ventricolare è comune. Le femmine portatrici sviluppano cardiomiopatia moderata nella quarta o quinta decade con lenta progressione. La sola anomalia biochimica è l’elevazione della concentrazione di CPK. Studi recenti dimostrano che in individui con fenotipo cardiaco severo, il muscolo cardiaco non è in grado di produrre Distrofina, mentre la muscolatura scheletrica non è affetta.

DIAGNOSI

La diagnosi si basa oltre che sui dati clinici, sull'incremento dei valori di CPK costantemente molto elevati anche negli stadi presintomatici; la concentrazione serica usuale è di 15.000-35.000 UI/l (con valori normali inferiori a 160); la concentrazione di CPK diminuisce gradualmente con l'avanzare dell'età come risultato di progressiva eliminazione di fibre muscolari distrofiche, dalle quali deriva l'elevazione delle CPK sieriche. Altri enzimi muscolari, quali le aldolasi, le transaminasi e l'LDH, sono aumentati, ma meno specifici.

L'EMG è utile nel distinguere un processo miopatico da un disordine neurogeno. Questo mette in evidenza una corta durata, bassa ampiezza, potenziali polifasici velocemente reclutati nell'unità motoria; come la malattia progredisce i pattern motori diventano incompleti a causa del reclutamento ridotto, fino a che il muscolo diventa elettricamente silenzioso. Tuttavia, questi dati non sono specifici, ma si rilevano in tutti i disordini miogeni; in pratica l'EMG è usato soltanto raramente nella diagnosi delle distrofinopatie.

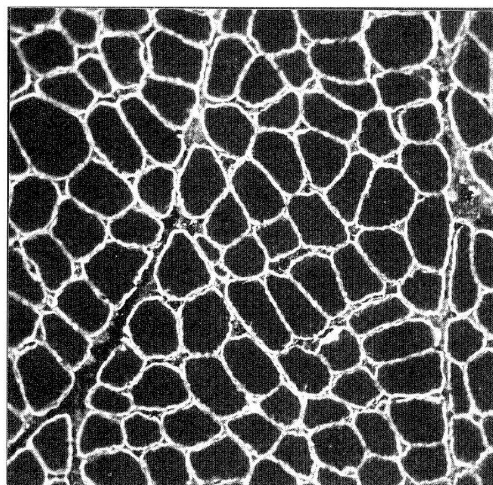
Biopsia muscolare: l'istologia del muscolo mostra precocemente cambiamenti distrofici non specifici, con variabilità del diametro delle fibre, centralizzazione dei nuclei accompagnati da aspetti di tipo infiammatorio. Successivamente compaiono focolai di necrosi e di rigenerazione, ialinizzazione, e, più avanti nella malattia, deposito di tessuto grasso e connettivo. Alla fine della malattia il muscolo appare

quasi irriconoscibile, con poche fibre muscolari in vaste zone di tessuto fibroso, adiposo o fibroadiposo.

La biopsia muscolare diventa indispensabile se l'analisi genetico-molecolare risulta negativa; viene eseguita un'analisi immunoistochimica e immunologica con le tecniche di immunoblotting sulle sezioni di muscolo con anticorpi specifici anti-distrofina (contro diversi domini della molecola): negli individui normali la presenza di distrofina è evidenziata da un anello normale di immunofluorescenza che circonda tutte le fibre muscolari (vedi Fig.5); la distrofina, invece, sarà assente se il bambino è affetto, a livello del sarcolemma e mancherà la banda specifica di migrazione immunoelettroforetica. Inoltre, il Western blot è in grado di rilevare l'eventuale presenza di distrofine di lunghezza anomala, sia di ridotte dimensioni a causa di delezione, che di dimensioni maggiori del normale a causa di una duplicazione. Nei soggetti con DM di Becker la colorazione può andare da quasi normale a significativamente ridotta.

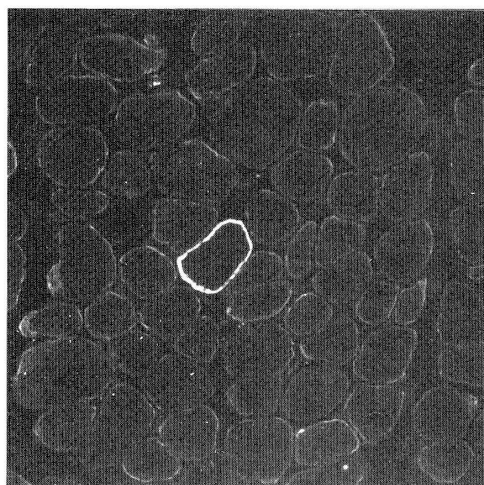
Fig.5: Biopsia muscolare

a) Normale

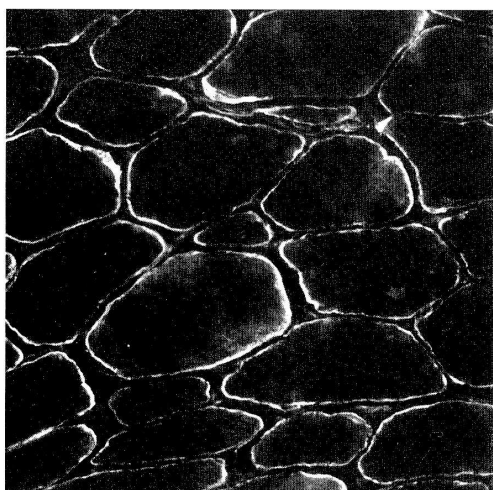


(a)

b) Duchenne

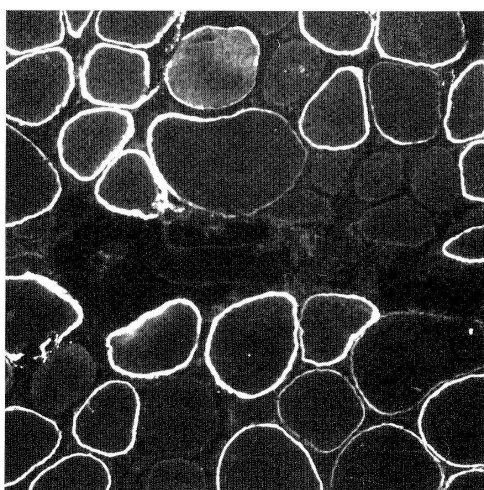


(b)



(c)

c) Becker



(d)

d) portatrice Duchenne

ANALISI CITOGENETICA-MOLECOLARE

Usi clinici dei test genetici:

- Test diagnostici
- Diagnosi di portatrice
- Diagnosi prenatale

Metodi clinici dei test genetici: questi test diagnostici hanno lo scopo di identificare le mutazioni, i più usati sono:

- Multiplex PCR, southern blotting, e FISH (con probes che coprono gli esoni DMD 3-6, 8, 12, 13, 17, 19, 32-34, 43-48, 50, 51, e 60) può essere usata per identificare le delezioni che rendono conto del 65% delle mutazioni nei DMD e dell'85% dei BMD. Circa il 98% delle delezioni sono identificate con queste metodologie.
- Southern blotting e analisi PCR quantitativa: può essere usata per identificare le duplicazioni. Le duplicazioni possono condurre a trascritti in-frame o out-frame e rappresentano circa il 6-10% delle mutazioni causanti la malattia nei maschi con DMD e BMD.
- MLPA multiple ligation probe amplification: questa metodica è stata sviluppata per l'analisi di delezioni/duplicazioni del gene DMD nei probandi e nelle femmine portatrici.

- Scanning delle mutazioni o analisi di sequenza: scoprono le piccole delezioni o inserzioni, sostituzioni di singole basi, mutazioni dei siti di splicing che spiegano circa il 30-35 % delle mutazioni del gene DMD.
- Nuove metodologie come “SCAIP” condizione simile a amplificazione interna di sequenze primer e “DGGE” elettroforesi su gel con gradiente denaturante basata sullo scanning di mutazioni sull’intero gene aiuta a identificare, con una metodica semiautomatica, rapida, accurata ed economica il rimanente 30-35% delle mutazioni in DMD.

TRATTAMENTO E TENTATIVI TERAPEUTICI

Negli ultimi decenni l’aspettativa di vita per un caso di DMD si è allungata di oltre dieci anni, grazie soprattutto al trattamento delle complicanze cardiologiche, all’assistenza respiratoria (con impiego di ventilatore meccanico durante il sonno) e alla tempestiva vaccinazione antinfluenzale. Notevoli progressi sono stati compiuti anche nella ricerca di terapie appropriate.

Fino a questo momento l’unico trattamento farmacologico dimostratosi in grado di rallentare la progressione della malattia è la somministrazione controllata di steroidi. I meccanismi d’azione degli steroidi nella distrofia muscolare sono largamente sconosciuti. Gli steroidi non provocano, infatti, un aumento della distrofina, né una diminuzione delle fibre necrotiche nelle biopsie muscolari di pazienti affetti da DM di Duchenne trattati con prednisone. In queste biopsie diminuisce, però, il numero di cellule mononucleate, in particolare cellule T e cellule CD8 citotossiche. L’ipotesi

però che abbia un effetto immunosoppressivo non è supportata dal fatto che individui trattati con azatioprina non hanno avuto un effetto benefico.

E' possibile che l'effetto benefico del cortisone sia mediato da un ridotto catabolismo proteico senza una concomitante modificazione della sintesi proteica, alternativamente i glucocorticoidi possono agire riducendo la morte programmata durante la miogenesi. Altri studi mostrano che il prednisone ha un effetto stabilizzante sulle membrane e probabilmente un effetto antinfiammatorio.

- Prednisone: in trial randomizzati a doppio cieco per sei mesi, il prednisone somministrato alla dose di 0,75 mg/Kg/die o 1,5 mg/Kg/die, aumenta la forza muscolare e riduce il corso del declino nei maschi con DMD. Il miglioramento inizia con trattamento iniziale di 10 giorni, che richiede una singola dose di 0,75 mg/Kg/die con un massimo di miglioramento che raggiunge il plateau dopo tre mesi e può essere sostenuto per un periodo di tre anni in alcuni bambini, mantenendo una dose di 0,5-0,6 mg/Kg/die. Studi effettuati dimostrano che il prednisone può prolungare la deambulazione di due anni. Sfortunatamente, accanto agli effetti benefici del prednisone sulla forza muscolare nei pazienti con DMD, è comparso anche un numero rilevante di effetti collaterali, come l'aumento ponderale, comparsa di cataratta, aspetto cushingoide, glicosuria, sintomi a carico dell'apparato gastroenterico, (alterazioni dell'alvo, dolori epigastrici ecc.), irsutismo, rash cutanei, modificazioni comportamentali, aumento della pressione arteriosa e, raramente, fratture.

Numerosi trials terapeutici sono stati eseguiti nel tentativo di trovare una dose ottimale di prednisone con diminuzione della dose a 0,3 mg/Kg/die, con dosi a giorni alterni e intermittenti o con la somministrazione della dose nei primi dieci giorni del mese; nel tentativo di dare una risposta a questi ed altri quesiti, l'European Muscular Centre ha organizzato nel 2004 un workshop sul trattamento della DMD.

Durante questi ultimi anni è stato proposto il trattamento con basse dosi di prednisone dopo che è stata fatta la diagnosi, anche se non vi sono studi adeguati sull'efficacia di questo trattamento precoce.

- Deflazacort: il deflazacort è un derivato sintetico del prednisolone, usato in Europa, ma non utilizzabile in USA. Studi controllati, in doppio cieco hanno mostrato che il Deflazacort non solo è efficace come il prednisone nel rallentare la perdita di forza muscolare e nel mantenere più a lungo la deambulazione nei pazienti affetti da DM di Duchenne, ma che comporta un minore aumento ponderale rispetto al prednisone.

Comparando due diversi protocolli di trattamento con Deflazacort in DMD, la dose di 0,9 mg/Kg/die ha più effetti di quella di 0,6 mg/Kg/die per i primi 20 giorni del mese; tuttavia il 30% dei bambini trattati con questa dose più alta sviluppano cataratta asintomatica che non richiede trattamento.

- Oxandrolone: l'oxandrolone è uno steroide anabolizzante, che in studi pilota si è dimostrato avere effetti simili al prednisone con minori effetti collaterali; esso esercita il suo effetto attraverso l'induzione di un'aumentata sintesi

proteica nel muscolo. Uno studio randomizzato, in doppio cieco, verso placebo, della durata di 6 mesi, mostra un miglioramento non significativo della forza muscolare nei pazienti trattati rispetto a quelli con placebo; tuttavia un incremento medio della forza muscolare era significativo. I ricercatori che hanno portato avanti questi studi propongono che l'oxandrolone possa essere usato prima di iniziare la terapia con corticosteroidi poiché è sicuro, nella terapia a breve termine, accelera la crescita in lunghezza, e può avere effetti benefici nel rallentamento della progressione della debolezza. Tuttavia non sono stati studiati gli effetti a lungo termine della terapia con oxandrolone nei DMD.

- Terapia genica: molte strategie di terapia genica sono state studiate e perfezionate nel corso degli anni. Sebbene negli ultimi anni si siano moltiplicate le strade percorribili, siano state estesamente riviste le strategie più tradizionali, è ancora improbabile che in un futuro vicino si trovi un effettivo trattamento della DMD. Tre innovativi metodi mostrano numerosi vantaggi comparati con gli altri approcci, i quali si dimostrano molto promettenti come strategie per condurre a un effettivo trattamento della DMD: la scoperta di mini e microdistrofina da vettori virali ricombinanti adeno-associati (rAAV); oligonucleotidi anti-sense che inducono un exon skipping nel tentativo di ripristinare la corretta lettura saltando i codoni STOP; rimpiazzamento della distrofina con upregulation dell'utrofina. Non entriamo nei particolari delle

varie tecniche che richiederebbero una trattazione a parte ma ci auguriamo in un prossimo futuro di poterle utilizzare sui nostri pazienti.

Table 1 | **Overview of strategies for Duchenne muscular dystrophy gene therapy**

Strategy	Action/effect	Advantages	Disadvantages	Prospects
Adenoviral vectors	Full-length dystrophin cDNA transfer	High transduction levels in regenerating muscle, expression of fully functional dystrophin	Viral immune response, limited persistence of transgene expression, maturation dependent	++
Herpes simplex viral vectors	Full-length dystrophin cDNA transfer	High transduction levels in regenerating muscle, expression of fully functional dystrophin	Viral toxicity and immune response, limited persistence of transgene expression, maturation dependent	+
Plasmid vectors	Full-length dystrophin cDNA transfer	Synthetic, non-infectious, relatively safe, flexible, simple engineering	Large molecule, delivery requires efficient transfection method	++
Myoblast transplantation	Introduce dystrophin-producing cells	Non-infectious, relatively safe	Low efficiencies, immune suppression required	+
Stem-cell therapy	Introduce dystrophin-producing cells	Conventional treatment, relatively safe	Low efficiencies, immune suppression required	++
Chimeric oligonucleotides	Correction of mutation at the DNA level	Cumulative, permanent effect	Low <i>in vivo</i> efficiencies	+
Gentamicin therapy	Ribosomal read-through of stop codons in mRNA	Conventional drug	Low reproducibility, risk of nonspecific adverse effects	+
rAAV vectors*	Mini- or micro-dystrophin cDNA transfer	High transduction efficiencies in muscle, non-pathogenic minimal immune responses	Unable to deliver full-length dystrophin, laborious production systems	+++
Antisense oligonucleotides*	Splicing modification of pre-mRNA	Synthetic, small-molecule drug, relatively safe, restores all isoforms	Repeated administrations and (targeting) delivery reagent needed, mutation specific	+++
Utrophin upregulation*	Replacement of dystrophin	Small-molecule drug, no immune response, relatively safe	No effective specific compound identified as yet	++

*These three relatively new strategies are most likely to lead to an effective treatment for Duchenne muscular dystrophy. The symbols in the prospects column indicate a subjective assessment of the probability of a particular strategy leading to an effective treatment, ranging from low (+) to high (+++). rAAV, recombinant adeno-associated virus.

Table 2 | **Overview of animal models for Duchenne muscular dystrophy gene-therapy studies**

Model	Mutation	Effect	Pathologic/physiologic symptoms	Gene-therapy studies
<i>mdx</i> mouse	Nonsense mutation in exon 23 (3185C>T)	Stop codon introduced, dystrophin synthesis aborted prematurely	Fibre degeneration (particularly from 2–8 weeks), replacement by centrally nucleated regenerating fibres, myopathy less severe later in life, normal lifespan	Used for most strategies owing to its relative experimental simplicity
CXMD/GRMD golden retriever dogs	3' splice-site point mutation in intron 6 (739–2a>g)	Exon 7 skipped from transcript, frame shift, dystrophin synthesis aborted prematurely	Severely affected, massive muscle degeneration, resembles human DMD best compared with other models	Chimeroplasts, adenovirus-mediated (mini-)dystrophin/utrophin transfer
HFMD	Deletion of Dp427m and Dp427p promoter regions	No muscle dystrophin expression	Large areas of muscle-fibre degeneration and regeneration, mononuclear infiltraton, hypercontracted fibres	None

Note that further mouse mutants (*mdx*^{2-50v}) that have been generated by 5 *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) mutagenesis are not often used for therapeutic studies¹³¹. CXMD, canine x-linked muscular dystrophy; DMD, Duchenne muscular dystrophy; GRMD, golden retriever muscular dystrophy; HFMD, hypertrophic feline muscular dystrophy.

CONSULENZA GENETICA

Fratelli del probando:

- Il rischio nei fratelli del probando dipende dallo stato di portatrice della madre
- Se la madre del probando ha una mutazione causante il difetto, il rischio di trasmissione nella sua prole è del 50 %; i fratelli maschi che ereditano la mutazione saranno affetti; le femmine che ereditano la mutazione saranno portatrici.
- Se la madre non ha una mutazione evidenziabile nel suo DNA è probabile che il probando abbia una mutazione de-novo nel gene. Tuttavia, poiché l'incidenza di mutazioni germinali nella madre è del 15-20%, il fratello del probando ha un rischio aumentato di ereditare la mutazione DMD.
- Se la madre ha un concomitante mosaicismo somatico e germinale, il rischio dei fratelli di ereditare una mutazione DMD può essere più alto che se la madre ha solo un mosaicismo germinale.

Discendenti del probando:

- I maschi con DMD usualmente muoiono prima dell'età riproduttiva o sono troppo debilitati per riprodursi.
- I maschi con BMD e con DMD associata a cardiomiopatia dilatativa possono riprodursi. Tutte le figlie sono portatrici, nessuno dei figli erediterà la mutazione del padre.

DISTROFIE MUSCOLARI DEI CINGOLI

Distrofia muscolare dei cingoli (LMGD) è un termine per lungo tempo utilizzato per descrivere distrofie muscolari ad inizio in età infantile o adulta che si distinguevano dalle più comuni distrofinopatie X-linked .

Prima dell'avvento della genetica molecolare, l'entità clinica denominata "Distrofia dei cingoli" (LGMD) era considerata un contenitore di forme unificate solo dalla relativa somiglianza del fenotipo con la Distrofia di Becker, dalla localizzazione ai cingoli del deficit di forza più importante, dalla progressione generalmente lenta e dalla ereditarietà di tipo Autosomico, per lo più Recessivo.

Le distrofie muscolari dei cingoli o limb-girdle muscular dystrophies (LGMD) comprendono un gruppo eterogeneo di disordini progressivi riguardanti principalmente la muscolatura del cingolo scapolare o pelvico, che vanno da forme più gravi con insorgenza nella prima decade di vita e rapida progressione, con perdita della deambulazione prima dei trent'anni, a forme più lievi ad insorgenza tardiva e lenta progressione e forme addirittura scarsamente sintomatiche.

In alcune forme di distrofie dei cingoli è presente un interessamento cardiaco.

Vi è una marcata variabilità clinica intra ed inter-familiare.

Data l'eterogeneità delle DM dei cingoli e la mancanza di specificità diagnostica, ci sono pochi studi sulla prevalenza di LGMD, questa è stimata variare da 1:14.500 a 1:123.000.

L'attuale classificazione risulta sostanzialmente dagli studi di genetica, in base al tipo di eredità autosomica dominante (LGMD1) o recessiva (LGMD2), e nell'ambito di questi sottogruppi sono indicate con lettere maiuscole dell'alfabeto, forme geneticamente distinte, individuate attraverso l'identificazione del gene coinvolto e della proteina coinvolta dalla mutazione (vedi Tab2).

L'eterogeneità è notevole: in alcune forme il difetto riguarda proteine della membrana plasmatica come i sarcoglicani del complesso transmembrana che lega la distrofina, in altre il difetto riguarda proteine del sarcomero (miotilina, disferlina, teletonina), un enzima citoplasmatico e persino una proteina dell'involucro nucleare (lamina).

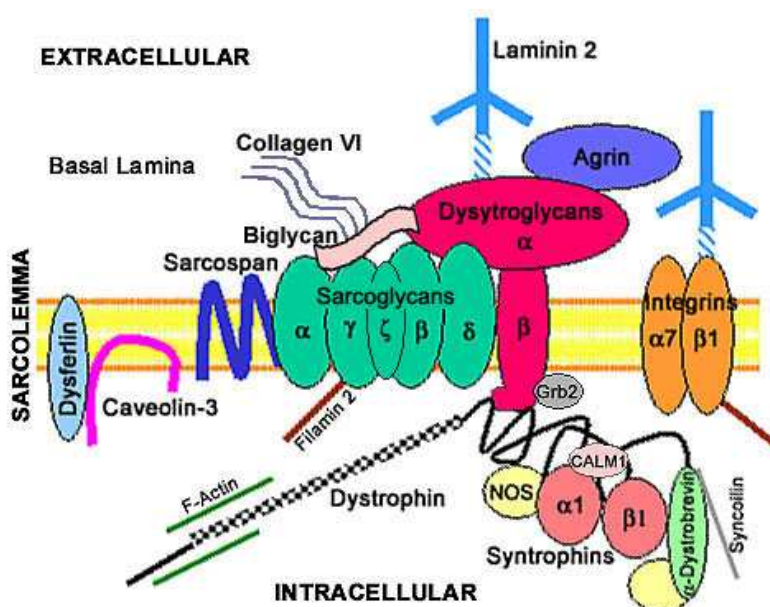


Fig 6

LMGD ad ereditarietà Autosomica Recessiva

Tabella 2. Distrofia Muscolare dei Cingoli (LGMD) autosomica recessiva

% di individui con AR LGMD	Nome della Malattia	Popolazioni con Mutazioni con effetto Fondatore	Nome del Locus	Gene	Localizzazione del Locus	Proteina prodotta	Test molecolare
Più del 68% di individui con inizio in età infantile e ~10% con inizio in età adulta	Alpha-sarcoglycanopatia	Nessuno	LGMD2D	<i>SGCA</i>	17q12-q21.3	Alpha-sarcoglycano	Clinico
	Beta-sarcoglycanopatia	Amish	LGMD2E	<i>SGCB</i>	4q12	Beta-sarcoglycano	Clinico
	Gamma-sarcoglycanopatia (SCARMG)	Nord Africani; Rom	LGMD2C	<i>SGCG</i>	13q12	Gamma-sarcoglycano	Clinico
	Delta-sarcoglycanopatia	Brasiliani;	LGMD2F	<i>SGCD</i>	5q33	Delta-sarcoglycano	Clinico
~10-30%	Calpainopatia	Amish, Isola di Reunion, Paesi Baschi, Turchia	LGMD2A	<i>CAPN3</i>	15q15.1-q21.1	Calpaina 3	Clinico
~10%	Dysferlinopatia Myopatia distale di Miyoshi	Libici,Ebrei	LGMD2B	<i>DYSF</i>	2p13.3-p13.1	Dysferlina	Clinico
Rara	Telethoninopatia	Italiani	LGMD2G	<i>TCAP</i>	17q12	Telethonina	Solo per scopi di Ricerca
Sconosciuto	LGMD2H	Manitoba Hutteriti	LGMD2H	<i>TRIM32</i>	9q31-q34.1	Proteina Zinc-finger HT2A	
Sconosciuto	LGMD2I	Sconosciuto	LGMD2I	<i>FKRP</i>	19q13.3	Proteine Fukutina-correlate	Clinico

Tabella 3. LGMD Autosomico Recessiva: Quadro clinico

Nome della Malattia	Presentatione		Altri segni		Età	
	Sintomi	Deficit di forza	Muscoli dei polpacci	Contratture / Scoliosi	Inizio	Perdita autonomia deambulatoria
Sarcoglicanopatia	Deficit completo: difficoltà a correre, camminare	Prossimale	Ipertrofia	Tardivi	3-15 aa (8.5 aa)	~15 aa
	Deficit parziale: crampi, intolleranza all'esercizio				Adolescenti – giovani adulti	
Calpainopatia	Difficoltà a correre, camminare, camminare sulle punte	Prossimale (normali gli estensori e adduttori dell'anca), scapole alate	Atrofia	Precoci	2-40 aa (8-15 aa)	11-28 aa dall'esordio
Dysferlinopatia	Inabilità a mettersi in punta di piedi; difficoltà a correre, camminare	Distale e/o pelvico-femorale(non scapole alate)	Transitoria ipertrofia (rara)		17-23 aa	
Telethoninopatia (LGMD2G)	Difficoltà a correre, camminare, piede cadente	Prossimale e distale negli arti inferiori; prossimale negli arti superiori			Primi 10 anni	~18 aa dall'esordio
LGMD2H	Deficit dei muscoli facciali con sorriso piatto(orizzontale); andatura anserina difficoltà a salire le scale	Prossimale negli arti inferiori; collo	Distruzione muscolare	Non riportati	1-9 aa	Tardi
LGMD2I	Difficoltà a correre, camminare	Prossimale; arti superiori > arti inferiori	Ipertrofia	Rari, tardivi	1.5-27aa (11.5 aa)	23-26 aa dall'esordio

Le forme recessive di LGMD hanno messo in luce il ruolo patogenetico fondamentale dei sarcoglicani e del complesso distrofina/sarcoglicani.

Dal punto di vista clinico si tratta di processi distrofici e amiotrofici che interessano in modo abbastanza specifico la muscolatura del cingolo scapolare e pelvico, con incostante pseudoipertrofia dei polpacci o della regione deltoidea, senza coinvolgimento dei muscoli della faccia e dell'orofaringe; l'interessamento cardiaco è variabile, ma senza dubbio meno frequente che nella distrofinopatia. Le prestazioni mentali sono normali.

Gli enzimi muscolari sono generalmente aumentati e l'EMG è incostantemente miogeno.

L'istologia del muscolo è di tipo distrofico, con degenerazione/rigenerazione, ma la distrofina è normale o solo lievemente ridotta.

In alcuni casi (sarcoglicanopatie, calpainopatie, disferlinopatie) si può effettuare una diagnosi biochimica con la ricerca delle proteine specifiche sulla biopsia muscolare.

SARCOGLICANOPATIE (LGMD2C, 2D, 2E, 2F)

Le sarcoglicanopatie rappresentano le cause più frequenti di DM dei cingoli.

I sarcoglicani sono un complesso di quattro proteine intramembranose (tetrameriche), chiamate alfa, beta, gamma, delta, con peso molecolare di 50, 43, 35, e 25 kD rispettivamente.

I quattro sarcoglicani funzionano come un'unica proteina, nel senso che un difetto a carico di uno di essi comporta la degenerazione secondaria di tutti gli altri. L'alfa sarcoglicano o "adalina" ha il terminale COOH rivolto verso l'interno della fibra, a differenza del beta e gamma-sarcoglicano, che si orientano verso il citoplasma con il terminale amminico NH₂.

I sarcoglicani legano la distrofina con i "terminali interni" che sembrano svolgere un ruolo fondamentale nella composizione vera e propria del sarcolemma.

Questo complesso stabilizza l'associazione della distrofina con i sarcoglicani e contribuisce alla stabilità del citoscheletro della membrana plasmatica.

Coinvolge, infatti, il "complesso Distrofina-Glicoproteine" (DGC) nella membrana della fibra muscolare.

I sarcoglicani insieme alle Sintrofine giocano un ruolo nella stabilità del DGC, dimostrati da studi su modelli animali. Le sintrofine (alfa, beta1 e beta2) sono presenti alla superficie citoplasmatica del sarcolemma e si legano al terminale carbossilico COOH della distrofina. Tramite le sintrofine il complesso distrofina-glicoproteine non solo controlla il funzionamento della membrana della fibra

muscolare, ma regola, unitamente ad altre proteine citoplasmatiche muscolari, anche il flusso di informazioni verso l'interno della cellula e le informazioni neuromotorie che raggiungono la placca neuromuscolare in tutti i suoi componenti. I 4 geni dei sarcoglicani sono correlati l'un l'altro strutturalmente e funzionalmente, ma ognuno ha un distinto locus cromosomico. Mutazioni in ogni gene portano ad una completa o parziale perdita del complesso e a volte alla riduzione della Distrofina.

La frequenza relativa delle patologie dei 4 geni va in decrescendo dall'alfa al beta al gamma e al delta (8:4:2:1). La mutazione più comune è la R77C che interessa il 50% circa degli alleli mutati dell'alfa sarcoglicano.

La diagnosi si fa con l'uso di anticorpi antisarcoglicani nel muscolo, seguito dallo studio molecolare. Mutazioni di un singolo gene dei sarcoglicani conducono a deficienza secondaria di tutte le proteine. Tipicamente un singolo anticorpo (alfa-sarcoglicano) è usato per classificare individui che hanno completa o parziale deficienza di sarcoglicani nel muscolo. In popolazioni specifiche isolate geograficamente o per etnia, certe mutazioni possono avere un'alta frequenza. Ciò si spiega ammettendo una deriva genetica in popolazioni di modeste dimensioni, seguita da inincrocio causato inizialmente da isolamento genetico per ragioni geografiche o culturali ed incrementato ulteriormente dalla pratica di matrimoni tra consanguinei per ragioni economiche o sociali.

Mutazioni dei beta-sarcoglicani con effetto fondatore sono state osservate negli Amish. Specifiche mutazioni dei gamma-sarcoglicani causano la maggioranza di casi

di LGDM in Egitto e in Nord-Africa. Una specifica mutazione del delta-sarcoglicano è relativamente comune in Brasile.

La prevalenza delle **Sarcoglicanopatie** è approssimativamente di 1:178.000

I sintomi clinici variano da esordio precoce nell'infanzia con progressione severa (simile alla Distrofia muscolare di Duchenne) a esordio più tardivo con progressione più lieve (simile alla Distrofia muscolare di Becker).

Il coinvolgimento cardiaco è di solito non severo come nelle distrofinopatie, sebbene sia variabile; circa il 30% degli affetti mostrano alterazioni cardiache all'ECG ed Ecocardiogramma.

Molti individui con severa LGDM ad inizio precoce mostrano mutazioni dei geni dei sarcoglicani, in contrasto il 10% degli individui con LGDM lieve (con esordio in adolescenza o nell'adulto hanno una sarcoglicanopatia.

LGMD2C: questa forma a trasmissione AR è dovuta a mutazioni nel gene che codifica per il **gamma-sarcoglicano** localizzato sul cromosoma 13q12, interessa i muscoli prossimali più che i distali ed è caratterizzata da scapole alate e ipertrofia dei polpacci, l'esordio avviene di solito prima dei 10 anni e il decorso è variabile tipo Duchenne o Becker. In circa il 20% dei casi è coinvolto il cuore. I livelli di CPK nel siero sono sempre elevati. L'intelligenza è normale e si ha perdita della deambulazione fra i 10 e i 37 anni; la morte è in genere nella 2° decade. Alla biopsia si ha assente o ridotto gamma-Sarcoglicano e normali o ridotti gli altri Sarcoglicani. La Distrofina è normale o ridotta.

La prevalenza dei casi di questa forma AR e sporadica è stata stimata in 1:200.000, ma è molto più elevata in almeno due gruppi di pazienti: la popolazione di Roma (C238Y) e quella mediterranea (del525T). E' stato stimato che meno del 10% dei pazienti che hanno la forma AR originano da mutazioni del locus 13q.

Non è noto un trattamento specifico, tuttavia molti pazienti si sottopongono a chinesiterapia per prevenire il peggioramento delle contratture.

LGDM2D: questa forma si trasmette con modalità AR ed è causata da mutazioni del gene **Adalina** che mappa sul cromosoma 17q21 e codifica per l'**alfa-sarcoglicano** una glicoproteina associata alla distrofina; la gravità del fenotipo correla con il grado di deficit di alfa-sarcoglicano nel muscolo.

Il fenotipo può essere severo o lieve e l'età di esordio è compresa fra i 2 e i 15 anni, il quadro clinico è sovrapponibile a quello della DMD con prevalente interessamento dei cingoli e pseudoipertrofia dei polpacci. Il cuore è coinvolto nel 20% dei casi.

Contrasta con la gravità del quadro clinico la normalità delle prestazioni mentali.

Nella biopsia muscolare si ha assente o ridotto alfa-Sarcoglicano e ridotti o assenti gli altri Sarcoglicani. Il CPK è molto alto (>5000).

La prevalenza dei casi recessivi e sporadici di LGDM è stata stimata in 5,7: 1.000.000, è relativamente frequente nei paesi nordoccidentali. Tra le forme autosomiche recessive, si calcola che il 17% siano causate da mutazioni del gene adalina.

LGDM2E: questa forma AR è dovuta a mutazioni nel gene che codifica per il **beta-sarcoglicano**, localizzato sul cromosoma 4q12, che deriva dalla espressione di una

forma “tronca” di beta-sarcoglicano. Il fenotipo è per lo più severo, con esordio sotto i 3 anni ad interessamento prossimale e prominente ipertrofia muscolare e della lingua. In genere si ha perdita della deambulazione ai 25 anni e occasionale cardiomiopatia. Il CPK è molto alto (>5000) e alla biopsia muscolare in genere si ha assenza di tutti i Sarcoglicani e assente o ridotta Distrofina.

LGDM2F: questa forma AR è dovuta a mutazioni nel gene che codifica per il delta-sarcoglicano localizzato sul cromosoma 5q33-34, è stata recentemente descritta in pazienti Brasiliani ed è dovuta alla produzione di una proteina “tronca” con arresto della sintesi al quinto codon. Ha un quadro clinico grave, con esordio fra i 2 e i 10 anni ed interessamento simmetrico dei muscoli prossimali, ipertrofia dei polpacci, crampi e perdita della deambulazione fra i 9 e i 16 anni e morte fra i 9 e i 19 anni. Occasionalmente si ha cardiomiopatia dilatativa che può presentarsi anche senza interessamento dei muscoli scheletrici. Il CPK è molto alto (10-50 volte la norma), alla biopsia si ha assenza del delta, alfa e beta-Sarcoglicani e ridotto o assente gamma-Sarcoglicano, presente, ma ridotta la Distrofina.

CALPAINOPATIE (LGMD2A)

Nella LGDM2A si è identificato un difetto nel gene 15q15 che codifica per un enzima, la calpaina 3 specifica per il muscolo, è stato il primo gene delle distrofie muscolari recessive ad essere mappato.

Questo enzima appartiene alla grande famiglia delle calpaine, proteasi citosoliche attivate dal calcio, a sua volta regolato dalla calciomodulina. La calpaina 3 sembra localizzarsi nel nucleo, a differenza delle altre calpaine note; è possibile che anche la sua funzione differisca da quella delle calpaine citosoliche, che quando attivate dal calcio e iperespresse, costituiscono una via importante di danno cellulare, mentre in questo caso è il suo difetto o la sua mancanza a provocare la malattia neuromuscolare.

La calpaina 3 lega anche la titina, proteina centrale nella struttura sarcomerica, il cui difetto provoca una miopatia AD ad esordio tardivo, la distrofia muscolare tibiale; questo legame suggerisce un ruolo della calpaina 3 nel turnover miofibrillare e, forse, anche nucleare, dal momento che anche la titina si localizza nel nucleo. E' una proteasi calcio-dipendente con funzione sconosciuta nelle miofibre, ma probabilmente opera un taglio delle proteine in corti polipeptidi (azione proteolitica) ed è localizzata sia nel nucleo, sia nel citoplasma. Processa proteine coinvolte nei processi di segnale, fattori di trascrizione muscolo-specifici, proteine del citoscheletro modulandone le attività. Nel muscolo deficiente di Calpaina 3 è descritto un aumento dell'apoptosi.

È la forma più frequente di LGMD, rappresentando circa il 40% di tutte le LGMD.

La frequenza varia dal 10% negli USA al 26% in Giappone, al 50% in Turchia, all'80% nei Paesi Baschi ed in Russia.

In Italia ha una frequenza di circa 1:100.000 con frequenza di portatori di 1:160.

La penetranza è pressochè completa in età adulta.

Sono note circa un centinaio di mutazioni del gene LGDM2A e sono causate dalla perdita di funzione per delezione, mutazione frameshift, missenso.

La malattia esordisce in genere tra gli 8 e i 15 anni, ma può variare dai 2 ai 40, consentendo uno sviluppo normale nei primi anni di vita; la muscolatura prossimale del cingolo pelvico è la prima ad essere interessata, ma si instaurano precocemente anche la retrazione dei tendini di Achille; l'ipertrofia dei polpacci è relativamente rara. Il livello di CPK è sempre aumentato.

Si dimostra un difetto secondario di calpaina 3 nelle disferlinopatie.

Il primo sintomo è in genere la tendenza a camminare sulle punte; sono frequenti nei primi stadi difficoltà nella corsa, andatura anserina, scapole alate e lieve iperlordosi.

Il deficit di forza è simmetrico maggiormente a carico dei muscoli prossimali degli arti, tronco e area periscapolare. E' presente marcata lassità dei muscoli addominali, maggiore compromissione del gluteo massimo, adduttori e comparto posteriore degli arti con brevità del tendine di Achille, spina rigida e scoliosi. A volte dolori muscolari e intolleranza all'esercizio. Risparmio dei muscoli della faccia e collo, a volte macroglossia. Più tardi compare difficoltà nel salire le scale, nell'alzarsi dalla sedia o, se sdraiati, dal pavimento. Sono frequenti contratture articolari all'anca, ginocchio, gomito e dita e a volte spina rigida. L'interessamento della muscolatura respiratoria è lentamente progressivo, ma rari casi possono esordire con cuore polmonare acuto/subacuto e arresto cardiaco. L'intelligenza è normale.

La malattia è progressiva e la perdita deambulatoria si ha dopo 10-30 anni dall'inizio (fra i 10 e i 48 anni di età).

In base alla distribuzione del deficit di forza ed all'età di esordio si distinguono 3 fenotipi:

- **Fenotipo Pelvi-Femorale (Leyden-Moebius)** (76%), è il più frequentemente osservato, il deficit di forza è primariamente evidente nel cingolo pelvico ed in seguito in quello scapolare. L'età di esordio è prima dei 12 anni, in età giovanile o dopo i 30 anni. L'esordio precoce è il più frequente e si accompagna ad un decorso più rapido con contratture.
- **Fenotipo Scapolo-Omerale (Erb)** (10%) in cui il deficit di forza è primariamente evidente nel cingolo scapolare ed in seguito in quello pelvico. Raro l'esordio precoce e di solito il decorso è più lieve del precedente.
- **IperCPKemia** usualmente osservata in bambini o giovani nei quali il solo sintomo è l'aumento della concentrazione di CPK nel siero, può essere considerata uno stadio presintomatico della malattia.

La Calpainopatia va sospettata nei soggetti con :

- Deficit di forza prossimale (del cingolo pelvico e/o scapolare) simmetrico con precoce esordio (prima dei 12 anni) o in età giovanile o seguente (dopo i 30 anni)
- Atrofia dei muscoli degli arti, tronco, ipertrofia dei gastrocnemi
- Scapole alate, scoliosi, contratture del tendine di Achille o di altre articolazioni (anche, ginocchia, gomiti, dita, colonna)
- Andatura anserina, sulle punte, difficoltà nella corsa, nel salire le scale o nel drizzarsi in piedi da posizione seduta o coricata

- Risparmio dei muscoli facciali, oculari, della lingua e collo
- Assenza di cardiomiopatia e ritardo mentale
- Storia familiare indicativa per trasmissione A.R.

Il dosaggio della CPK è elevato (5-80 volte la norma) precocemente nell'infanzia e durante gli stadi attivi della malattia e diminuisce con la progressione della stessa.

Può essere elevato anche nei portatori.

La TAC e RMN muscolare mostrano l'interessamento predominante nei comparti posteriori degli arti. La differente distribuzione dell'interessamento muscolare tra la calpainopatia e altre LGDM (sarcoglicanopatie e disferlinopatie) messa in evidenza dal CT scan è un importante elemento per la diagnosi clinica.

EMG è tipicamente miopatico, ma può essere normale negli stadi iniziali e presintomatici.

Biopsia muscolare : le alterazioni morfologiche sono variabili in rapporto all'età dell'individuo al momento della biopsia. Molti individui hanno tipiche alterazioni di un processo distrofico con aumento della variabilità delle fibre, aumento della fibrosi, rigenerazione e degenerazione; altri hanno lievi e aspecifici reperti miopatici quali l'aumento dei nuclei centrali, fibre lobulate e strappate con predominanza delle fibre tipo I. L'immunoblot per la Calpaina-3 è diagnostico. Circa l'80% dei soggetti con mutazioni della CAPN3 hanno livelli variabili di Calpaina-3 (58%: assente, 22% con riduzione parziale) e il 20% hanno normali livelli di Calpaina che presenta diminuita funzione. Ci possono essere falsi positivi con riduzione della Calpaina-3 in altre distrofie muscolari, quali la Disferlinopatia o la Titinopatia (distrofia muscolare di

Udd) o in condizioni che promuovono l'autolisi della Calpaina-3 quali conservazione o trattamento.

DISFERLINOPATIE (LGMD2B e Miyoshi myopathy)

La disferlinopatia è causata da mutazione del gene DYSF che include uno spettro di disordini muscolari caratterizzati da due fenotipi.

La Miyoshi myopathy con debolezza primariamente distale e la LGDM2B con debolezza primariamente prossimale.

Il gene responsabile (DYSF) è stato identificato nel 1998 (2p13.3- p13.1) (la seconda forma di distrofia dei cingoli A.R ad essere mappata) è il solo gene associato a disferlinopatia; DYSF ha 55 esoni e 6.243 pb e codifica per una proteina di 2080 aminoacidi, approssimativamente di 230 kDa.

E' stata identificata una mutazione 1624delG in 12 famiglie di Ebrei Libici con LGDM2B; tra i Giapponesi con Miyoshi myopathy quattro mutazioni (C1939G, G3370T, 3746delG, e 4870delT) che contano circa il 60% di tutte le mutazioni. E' stata recentemente riportata la possibile esistenza di un effetto fondatore per la mutazione C2785T nella popolazione Italiana. Non esiste una correlazione tra il tipo di mutazione e il fenotipo, tuttavia la mutazione G3510A, associata con una forma severa di Miyoshi myopathy, è localizzata attorno alla regione di relativa idrofilia e si è ipotizzato che questa regione possa essere importante per la funzione della proteina. Gli affetti mostrano mutazioni con perdita di funzione (missenso) della disferlina con perdita della proteina nella superficie della membrana cellulare. Molti pazienti

mostrano un completo deficit della proteina alla biopsia muscolare, ma altri hanno un deficit parziale. E' degno di nota anche il riscontro di evidenti segni di infiammazione endomisiale e perivascolare all'istoenzimologia e immunocitologia muscolare con presenza di linfociti CD8, CD4 e macrofagi, senza linfociti B.

La Disferlina è correlata alla proteina C.elegans con cui ha un'elevata omologia, coinvolta nella maturazione dello sperma e nella sordità non sindromica (otoferlina).

La Disferlina, localizzata nella membrana della fibra muscolare, può avere un ruolo nei processi di integrazione delle vescicole con la membrana sarcolemmatica. La funzione della Disferlina è sconosciuta, ma in sua assenza sono nettamente deficitari i processi di riparazione del sarcolemma, peraltro emergenti come processi attivi Ca^{++} mediati. La proteina disferlina possiede un breve dominio C-terminale che attraversa la membrana sarcolemmatica a tutto spessore, e un lungo dominio citoplasmatico idrofilo coinvolto nei processi di trasmissione di segnali intracellulari Ca^{++} dipendenti; questi 2 domains sono importanti per la fusione di membrana calcio-mediata e recentemente è stato riportato che possa avere un ruolo essenziale nel riparo della membrana delle fibre dei muscoli scheletrici.

Esiste una possibile interazione tra la disferlina e la Caveolina 3 che contribuisce a favorire la funzione di segnale delle caveole.

L'evoluzione può essere anche molto rapida e invalidante.

La sintomatologia clinica è variabile anche nella stessa famiglia in soggetti con la stessa mutazione; in genere la progressione è lenta con deambulazione conservata

fino ai 30 anni, a volte fino ai 60 anni. L'interessamento muscolare può essere asimmetrico e non si associa cardiomiopatia.

Comprende 2 fenotipi clinici:

Miopatia di Miyoshi con interessamento primitivamente **distale**, caratterizzata da

- Età di esordio in genere in età tardo infantile e giovane adulto (19-20 anni)
- Primitivo interessamento dei gastrocnemi e solei con atrofia, difficoltà a camminare sulle punte e possibile andatura sui talloni. Raro il coinvolgimento del comparto anteriore.

Dopo un periodo di anni, l'atrofia si estende ai glutei con difficoltà nella deambulazione. Le braccia possono essere lievemente atrofiche con risparmio dei piccoli muscoli delle mani. In seguito può essere interessato il cingolo scapolare .

- Progressione lenta con perdita della deambulazione circa 10 anni dopo l'esordio
- Valori di CPK 10-100 volte la norma (in genere 8-9000)
- EMG miogeno
- Biopsia muscolare che mostra una miopatia cronica attiva

LGMD2B con interessamento primitivamente **prossimale**, caratterizzata da

- Età di esordio nella tarda adolescenza o giovane adulto
- Primitivo interessamento con atrofia dei muscoli del cingolo pelvico e scapolare

- Progressione lenta
- Elevatissimi valori di CPK
- Coinvolgimento subclinico dei muscoli distali in alcuni individui

Tabella 4. Comparazione tra Miopatia di Miyoshi and LGMD2B

	Miopatia di Miyoshi	LGMD2B
Età media all'esordio (range)	21.8 ± 7.4 aa (14-37 aa)	26.2 ± 9.2 aa (14-41 aa)
Età media dell'uso del bastone (anni dopo l'esordio)	35.5 aa (16 aa)	39.3 aa (13.6 aa)
Età media della perdita dell'autonomia deambulatoria (anni dopo l'esordio)	42.8 aa (22.8 aa)	45.1 aa (21.4 aa)

La biopsia muscolare mostra una variabilità random delle fibre con predominanza delle fibre tipo I, con degenerazione e rigenerazione. Spesso sono presenti segni di infiammazione che pongono difficile D.D. con Polimiosite.

Anticorpi anti-disferlina mostrano che questa proteina è localizzata nella membrana muscolare e soggetti con mutazioni nel gene DYSF mostrano completa parziale o assenza. Tali anticorpi non sono rilevabili nei monociti del sangue periferico.

L'immunoblot è considerato il migliore metodo diagnostico. Si può avere una riduzione secondaria della Calpaina 3 all'immunoblot.

TELETONINOPATIE (LGMD2G)

Questa forma è dovuta a un difetto di teletonina, proteina presente nel disco Z del muscolo cardiaco e scheletrico, codificata in posizione 17q12.

La teletonina co-localizza con il terminale carbossilico C della Titina, ed è presumibile una sua attivazione da parte della titin kinasi attraverso un processo di fosforilazione; ma altre proteine ancora saranno identificate come partners della teletonina.

Una singola mutazione è stata trovata nel gene che codifica per la teletonina, una proteina del sarcomero in 2 famiglie brasiliane.

L'esordio si situa tra i 9 e i 15 anni e tutti i pazienti affetti mostrano una importante compromissione **prossimale degli arti sup. e prossimale e distale degli arti inf.** con debolezza muscolare, piede cadente e perdita deambulatoria nel 40% nella 3°-4° decade. Nel 55% si ha interessamento cardiaco con cardiomiopatia dilatativa. Il CPK aumenta da 3 a 30 volte la norma. La biopsia muscolare mostra un gran numero di vacuoli, segno non comunemente riportato nelle LGMD AR. e anticorpi anti-teletonina mostrano una sua assenza.

LGMD2H

Causata dalla mutazione in omozigosi D487N nel gene TRIM32 in 9q31-33.

Questa mutazione con effetto fondatore è stata osservata solo nella popolazione Hutterite del Nord America (Manitoba). Il gene codifica per una ligasi E3-Ub responsabile della regolazione post-translazionale dei livelli di proteina.

L'esordio è fra gli 8 e i 27, anni con interessamento prossimale degli arti inferiori e lenta progressione. Gli affetti possono restare deambulanti fino all'età adulta ed è descritta una deambulazione autonoma, anche se difficoltosa, anche nella sesta decade.

Caratteristico è il segno di interessamento della muscolatura facciale con un sorriso piatto che ricorda la FSH e un tardivo interessamento dei muscoli prossimali degli arti superiori. Il CPK è alto (250-4500). Questa patologia è stata descritta solo nella popolazione degli Hutteriti.

LGMD2I

Causata dal difetto del gene FKRP (proteina Fukutina correlata) che mappa sul cromosoma 19q13.3. Tutti gli individui riportati mostrano omozigosità o sono composti eterozigoti di comuni mutazioni (C826A, Leu276Ileu) che non si trovano mai nelle forme severe di distrofia muscolare congenita date da mutazione del gene FKRP. Gli omozigoti per queste comuni mutazioni sono più lievi dei composti eterozigoti. La biopsia muscolare mostra una riduzione della Laminina alfa 2 e una variabile espressione dell'alfa distroglicano con normale pattern del beta distroglicano.

Malattia allelica alla Distrofia muscolare congenita 1C (MDC1C) entrambe causate dalla mutazione nel gene FKRP. Il fenotipo varia da forme simili alla Distrofia di Duchenne con inizio nel 1° anno di vita e possibile deambulazione autonoma fino alla seconda decade a forme lievi, simili alla Distrofia muscolare di Becker con inizio più tardivo dai 6 ai 23 anni e deambulazione autonoma nella terza decade, anche se

difficoltosa con progressione molto lenta. Si ha interessamento del cingolo pelvico e dei muscoli prossimali degli arti inferiori seguito dopo qualche anno dai muscoli prossimali degli arti superiori. Si ha ipertrofia dei polpacci e lingua, crampi, contratture e scoliosi. Il CPK va da 1000 a 10000. Nel 30-50% dei casi può esserci interessamento cardiaco specialmente cardiomiopatia dilatativa. Nella biopsia si ha riduzione dell'alfa-Sarcoglicano e dell'alfa2-Laminina.

LMGD ad ereditarietà Autosomica Dominante

Tabella 5. Autosomico Dominante LGMD: Quadro clinico

Nome	Età di inizio	Presentazione		Sintomi tardivi
		Sintomi	Altri segni	
LGMD1A	18-35 aa	- Deficit di forza Prossimale - Deficit di forza Prossimale	- retrazione tendine di Achille - Disartria	Deficit di forza Distale
LGMD1B	4-38 aa (~1/2 inizio in età infantile)	Deficit di forza Prossimale negli arti inferiori		- Contratture dei gomiti - Aritmia e altre complicanze cardiache (25-45 aa) - Morte improvvisa
LGMD1D	<25 aa	- Cardiomiopatia Dilatativa - Difetti di conduzione cardiaca - Deficit di forza Prossimale		Tutti gli affetti conservano la deambulazione autonoma
LGMD1E	9-49 aa (30)	Deficit di forza Prossimale negli arti inferiori e superiori	anomalia di Pelger-Huet	- Contratture - Disfagia
LGMD1C Caveolinopatia	~5 aa	- Crampi - Lieve-moderato deficit di forza Prossimale	Ipertrofia dei polpacci	

Tabella 6. LGMD Autosomico Dominante: genetica molecolare					
Nome della malattia	Nome del Locus	Gene	Localizzazione del Locus	Proteina Prodotta	Test Molecolare
	LGMD1A	<i>TTID</i>	5q31	Myotilina	Solo per scopi di Ricerca
	LGMD1B	<i>LMNA</i>	1q21.2	Lamina A/C	Clinico
Caveolinopatia	LGMD1C	<i>CAV3</i>	3p25	Caveolina-3	Solo per scopi di Ricerca
	LGMD1D	Sconosciuto	7q	Sconosciuto	
	LGMD1E	Sconosciuto	6q23		
	LGMD1F	Sconosciuto	7q32.1-32.2		Solo per scopi di Ricerca
	LGMD1G	Sconosciuto	4p21		Solo per scopi di Ricerca

Le forme dominanti sono più rare di quelle recessive, costituiscono il 10% delle LGMD, e sono molto meno note, tranne il fatto che il loro quadro clinico tende ad essere generalmente meno grave con progressione lenta; si accompagnano spesso ad interessamento cardiaco e, contrariamente alle forme AR, le CPK sono raramente aumentate più di 5 volte.

MIOTILINOPATIE (LGMD1A)

La Miotilina è una proteina del sarcomero che si lega direttamente all'alfa-actina e ne mantiene il corretto assemblaggio all'interno della fibra muscolare (disco Z).

Sono state descritte due mutazioni missenso (T57I e S55F) nel gene *TTID* (5q31) che codifica per la Miotilina in 2 grandi alberi genealogici.

Sono state riportate mutazioni in due grandi pedigree in Nord Americani con antenati tedeschi e argentini del gene TTID che codifica per la Miotilina.

Gli individui affetti mostrano un interessamento della muscolatura prossimale simmetrico degli arti superiori e inferiori, un'età media di esordio di 27 anni e in seguito una progressione distale. Circa la metà degli affetti mostra un caratteristico linguaggio disartrico e nasale (per deficit muscolatura palatale) retrazione del tendine di Achille e riduzione dei riflessi tendinei rotulei e al gomito. Nel 50% si ha cardiomiopatia. La progressione è lenta con rari casi di perdita della deambulazione. La conduzione nervosa è normale ed il CPK è lievemente elevato.

LAMINOPATIE (LGMD1B)

Causata da mutazioni del gene Lamina A/C mappato sul cromosoma 1q11-23 e che codifica per le lamine A e C, entrambe proteine della superficie interna della membrana nucleare e appartenenti alle lamine tipo A. Le lamine A e C partecipano alla organizzazione della cromatina periferica, all'integrità della membrana nucleare e, all'assemblaggio della membrana stessa durante le mitosi.

Ha molte interazioni con le proteine strutturali della membrana interna nucleare (LAP2 β , LAP2 γ , LAP2 δ , LAP22, Emerina, MAN1). La Lamina gioca un ruolo nella selettiva ritenzione delle proteine che entrano attraverso i pori nucleari interagiscono con la Lamina e la cromatina. Le altre proteine entrate attraverso i pori nucleari che non hanno questa interazione tornano libere attraverso la membrana nucleare al

Reticolo Endoplasmatico. E' costituita da Lamina di tipo A (gene LMNA) e Lamina di tipo B (gene LMNB1 e LMNB2).

La Lamina e le proteine della membrana nucleare interna influenzano la trascrizione, la replicazione del DNA, la struttura della cromatina e la migrazione nucleare.

Approssimativamente, metà degli individui con LGDM1B hanno un inizio in età infantile con interessamento dei muscoli prossimali degli arti inferiori, accompagnato da interessamento cardiaco (difetto di conduzione atrioventricolare che può progredire ad un blocco di 2° grado che può richiedere il pacemaker, in una minoranza dei casi cardiomiopatia dilatativa : l'8% delle cardiomiopatie dilatative hanno mutazioni nel gene LMNA localizzato su 1q21.2) nella 3°-4° decade si può avere un interessamento degli arti superiori. Comune è la morte improvvisa cardiaca e le contratture dei gomiti in età adulta.

Il CPK può essere normale o lievemente aumentato.

Questa condizione è allelica ad altre forme, lo stesso difetto di lamina A/C infatti può causare altre malattie neuromuscolari (distrofia muscolare di Emery-Dreifuss AD, cardiomiopatia dilatativa) o fenotipi non-neuromuscolari (lipodistrofia ereditaria, sindromi da invecchiamento precoce).

La diagnosi si basa sulla ricerca delle mutazioni nel gene della Lamina A/C perché la proteina non è alterata nella biopsia muscolare.

CAVEOLINOPATIE (LGMD1C)

Il gene CAV3 mappato sul cromosoma 3p25, codifica per la Caveolina 3, una proteina integrale transmembrana coinvolta nel traffico di membrana delle miofibre e nei segnali di traduzione, che normalmente ha sede nelle caveole. Queste ultime sono minuscole fossette nella membrana sarcolemmatica, la cui formazione è direttamente dipendente dalla quantità e integrità di Caveolina 3. E' espressa durante la differenziazione dei mioblasti scheletrici e gioca un ruolo importante nella regolazione della glicolisi muscolare. La caveolina 3 si lega preferenzialmente alle molecole di segnale intracellulare, tra cui anche la nNOS, che utilizza per legarsi al complesso proteico distroglicani DG (con sintrofina e distrofina) e sarcoglicani SG (con sintrofina e distrobrevina); in sua assenza nei soggetti omozigoti si assiste a una formidabile attivazione della nitrossido sintasi.

Solo in un esiguo numero di individui sono state trovate mutazioni di questo gene. La sua mutazione, identificata per la prima volta in un piccolo numero di pedigree italiani, porta ad un accumulo di Caveolina 3 nel Golgi e ad un difetto biochimico dominante-negativo.

Il fenotipo è variabile, le CPK sono aumentate da 4 a 25 volte, qualche individuo mostra solo CPK elevato asintomatico. Inizia circa all'età di 5 anni con deficit di forza moderato dei muscoli prossimali e Gowers positivo in età adulta. Presente l'ipertrofia dei polpacci e crampi dopo esercizio. Nella biopsia muscolare si dimostra una riduzione della Caveolina 3. Grande attenzione va posta alla possibile compromissione cardiaca, in assenza di qualsiasi segno di ischemia miocardica.

Le mutazioni di questo gene causano non solo la LGDM1C, ma anche altre tre forme cliniche: la RMD (Ripple Muscle Disease, una miopatia caratterizzata da segni di aumentata irritabilità muscolare, soprattutto alla percussione, senza debolezza muscolare), una miopatia distale, e una iperCPKemia idiopatica familiare .

LGMD1D

E' stato riportato un singolo pedigree con difetti di conduzione cardiaca (blocco, tachicardia ventricolare, fibrillazione parossistica atriale), cardiomiopatia dilatativa e/o interessamento muscolare prossimale più che distale interessante gli arti inferiori più che i superiori. A volte disfagia (20%). L'inizio è in età tardo giovanile (in media 38anni) ed il CPK è 2-4 volte la norma.

LGMD1E

Descritta una grande famiglia franco-canadese con inizio nella 2° decade di deficit di forza prossimale e lenta progressione. Tutti i pazienti sono deambulanti. Si associa aritmia con inizio fra i 20 e 25 anni e insufficienza cardiaca nella 3°-5° decade e morte improvvisa. Il CPK aumenta da 2 a 4 volte.

LGMD1F

E' stata riportata 1 famiglia spagnola linked al cromosoma 7. L'inizio è circa nella 2° decade e l'interessamento muscolare simmetrico riguarda le regioni prossimali degli

arti inferiori più che superiori con tardivo interessamento dei muscoli distali. Il CPK è normale nel 40% o lievemente elevato.

LGMD1G

Descritta in una famiglia brasiliana. Inizio da 30 a 47 anni con interessamento prossimale degli arti superiori e inferiori e lenta progressione. Il 50% è deambulante dopo 10 anni dall'inizio. Il CPK è alto (più di 9 volte la norma).

DIAGNOSI

Stabilire il subtipo di LMGD è utile per una corretta valutazione della prognosi e la consulenza genetica.

Per stabilire il subtipo si utilizza l'anamnesi, l'esame clinico, la storia familiare ed i test di laboratorio che includono i livelli di CPK e la biopsia muscolare per l'esame istologico e immunoistochimico seguiti poi dallo studio delle mutazioni quando possibile.

Tabella 7 Test Usati per stabilire il subtipo di LGMD

Tipo	CK	Biopsia Muscolare	Test Molecolare
		Studi Proteine	
Autosomico Recessivo			
Sarcoglicanopatia	Lievemente fino a molto elevato	Anticorpi anti-Sarcoglicano; absent DGC (test mostra poca specificità)	Clinico
Calpainopatia	>10 volte la norma	Assenza di calpaina 3 all’immunoblotting (test con poca specificità)	Solo per scopi di Ricerca
Disferlinopatia	Spesso severamente elevato >100 volte la norma	Assenza di disferlina all’ immunoblotting	Clinico
Telethoninopatia	3-17 volte la norma	Assenza di telethonina all’ immunoistochimica	Non disponibile
LGMD2H	4-30 volte la norma	Non riportata	Non disponibile
LGMD2I	Normale fino a molto elevato	Variabile espressione dell’ alpha dystroglycano, lieve riduzione della laminina alpha 2 (test con poca specificità)	Solo per scopo di ricerca
Autosomico Dominante			
LGMD1A	Normale o lievemente elevato	Normale myotilina all’immunoistochimica o immunoblotting	Non disponibile
LGMD1B	Normal o lievemente elevato		Clinico
LGMD1D	2-4 volte la norma		Non disponibile
LGMD1E	1-3 volte la norma		Non disponibile
Caveolinopatia	4-25 volte la norma	Caveolina3 ridotta o immunofluorescenza e Western blotting	Solo per scopi di Ricerca

CONSULENZA GENETICA

Distrofie Muscolari dei Cingoli Autosomiche Recessive

I genitori sono eterozigoti obbligati asintomatici con rischio di ricorrenza del 25%.

I fratelli del probando hanno il 25% di probabilità di essere affetti, il 50% di essere non affetto e portatore e il 25% di essere non affetto e non portatore.

Se un fratello non è affetto, ha la possibilità di essere portatore dei 2/3. La severità ed il fenotipo clinico di soggetti con la stessa mutazione varia e quindi l'età di esordio e la progressione in fratelli affetti non può essere predetta.

Tutti i figli di un affetto saranno portatori obbligati. In popolazioni con alta consanguineità, il rischio di ricorrenza di un probando può essere calcolato in base alla frequenza dei portatori in quella popolazione.

I figli di un portatore hanno il 50% di probabilità di essere portatori.

Distrofie Muscolari dei Cingoli Autosomiche Dominanti

Molti affetti hanno uno dei 2 genitori affetto; sebbene la sintomatologia può essere variabile anche nella stessa famiglia, il genitore affetto può essere deceduto prima dell'esordio della malattia o l'esordio può essere molto tardivo e non ancora dimostrabile.

Occasionalmente la storia familiare può essere negativa, si tratta allora di una nuova mutazione. La frequenza di mutazioni de novo è sconosciuta.

Il rischio di ricorrenza è del 50%.

La severità e la progressione varia fra soggetti con la stessa mutazione quindi non si può predire l'età di esordio e la progressione.

Se i genitori non sono affetti, il rischio di ricorrenza è basso, anche se si deve considerare il possibile mosaicismo germinale.

TRATTAMENTO

Non esiste un trattamento definitivo per le Distrofie muscolari di cingoli, ma un “management” può essere “confezionato” per ciascun individuo e per ciascun subtipo specifico. Un appropriato management può prolungare la sopravvivenza e migliorare la qualità di vita. Questo approccio generale si basa sulla tipica progressione delle complicazioni negli individui con LGDM:

- Controllo del peso corporeo e prevenzione dell'obesità
- Fisioterapia e esercizi di stretching per promuovere la mobilità e prevenire le contratture
- Uso di aiuti meccanici, come stampelle, protesi, deambulatori, e sedia a rotelle per aiutare la deambulazione e la mobilità
- Monitoraggio degli interventi chirurgici effettuati per le complicazioni ortopediche, come la deformità dei piedi e la scoliosi
- Monitoraggio della funzione respiratoria con aiuto di respiratori

- Monitoraggio della cardiomiopatia in quei subtipi con conosciuta evidenza di interessamento cardiaco
- Supporto sociale ed emozionale per stimolare il senso sociale aumentando la produttività e riducendo il senso di isolamento sociale, comune in questi disordini
- Consigliato ricorrere agli anestetici prescritti per la profilassi dell'ipertermia maligna

Le prospettive terapeutiche per le DM dei cingoli dipendono in larga misura dai progressi nella comprensione della patogenesi molecolare delle distrofinopatie, soprattutto per quanto riguarda lo sviluppo di strategie innovative per superare i danni indotti dal difetto primario: per molte distrofie dei cingoli il difetto riguarda il complesso transmembrana a cui partecipa la distrofina. Eventuali metodi di transgenici nelle cellule muscolari scheletriche, che avessero successo per curare le distrofinopatie, tanto più facilmente potrebbero essere in teoria utilizzati per trasferire all'interno delle cellule muscolari altri geni, di dimensioni relativamente modeste, implicati nelle distrofie dei cingoli.

DISTROFIA MUSCOLARE FACIO-SCAPOLO-OMERALE (FSH)

La distrofia muscolare facio-scapolo-omeroale è la terza malattia in ordine di importanza, per quanto riguarda la prevalenza di miopatie ereditarie nella popolazione. La sua prevalenza nella popolazione è dell'ordine di 2:100.000.

La malattia coinvolge inizialmente i muscoli della faccia e del cingolo scapolare con un pattern progressivo di deficit di forza muscolare dei muscoli facciali, stabilizzatori della scapola, degli arti superiori, e successivamente, dei muscoli peroneali e del cingolo pelvico; il deficit muscolare degli arti e delle spalle può essere asimmetrico. L'esordio è dopo i 10 anni, ma è variabile, il 90% è sintomatico ai 20 anni. Individui con forme severe infantili di FSHD hanno ipotonìa alla nascita. Al contrario, qualche individuo può rimanere asintomatico per tutta la vita. La progressione è in genere lenta con periodi alterni di stazionarietà e di esacerbazione. Il 20% perde l'autonomia deambulatoria.

La scapola alata è il più comune segno iniziale con interessamento soprattutto del trapezio inferiore che risulta nel caratteristico sollevamento della scapola quando si flettono o adducono le braccia. Le spalle si inclinano in avanti con atrofia dei pettorali.

Gli affetti mostrano un difetto dei muscoli facciali, specie della parte inferiore della faccia, a volte prima della comparsa dei segni a carico del cingolo scapolare. Si ha difficoltà a fischiare, a chiudere completamente gli occhi durante il sonno, a increspare le labbra e nel riso gli angoli della bocca non vanno all'insù, ma restano orizzontali. Sono risparmiati i muscoli extraoculari, palpebrali e bulbari.

Il deltoide resta minimamente colpito fino alle fasi avanzate della malattia, mentre i bicipiti e tricipiti sono selettivamente coinvolti, risultando in atrofia delle braccia e risparmio degli avambracci. Il quadro finale presenta un fenotipo tipo “braccia di Braccio di Ferro”.

La debolezza dei muscoli addominali porta ad una protuberanza dell’addome e ad una iperlordosi. Lo specifico interessamento della muscolatura addominale inferiore porta al segno di Beevor che consiste nel posizionamento verso l’alto dell’ombelico, quando il paziente in posizione supina, flette il collo.

Gli arti inferiori sono colpiti in modo variabile con interessamento dei muscoli peroneali con o senza interessamento del cingolo pelvico. Spesso i riflessi sono ridotti. La funzione respiratoria è normale. Il muscolo cardiaco è indenne e l’intelligenza è normale.

Sono state riportate varianti atipiche di FSHD in individui con delezione del cromosoma 4q35. Sono state descritte famiglie con lenta e progressiva FSHD accompagnata da progressiva oftalmoplegia esterna.

Altre manifestazioni sono:

- Vasculopatia retinica con teleangectasie e microaneurismi dimostrabili con l’angiografia con fluorescina, presente nel 40-60% degli affetti e che in genere non si accompagna a difetti visivi
- Sordità neurosensoriale per i toni alti, e anomalie dell’audiogramma presente in circa il 60% degli affetti
- Tachiaritmia atriale rara.

DIAGNOSI

FSHD è sospettata in individui con debolezza muscolare che coinvolge prevalentemente i muscoli facciali, stabilizzatori della scapola, dorsiflessori del piede senza interessamento dei muscoli bulbari e oculari, altri elementi sono:

- CPK normale o elevato ma non più di 3-5 volte la norma. Se il CPK è > 1500 occorre pensare ad un'altra diagnosi
- EMG miopatico
- Biopsia muscolare mostra aspecifici segni miopatici. In circa il 40% sono presenti segni di infiammazione (DD con miopatia infiammatoria). Si esegue solo in quei soggetti con sospetta FSH, ma non confermata dal test genetico.

Diagnosi Differenziale:

- Miopatia Miofibrillare (Miopatia da accumulo di Desmina)
- Miopatie mitocondriali
- Miopatie congenite
- Polimiositi
- Distrofie muscolari dei cingoli

GENETICA

Sono state finora identificate due forme: FSHMS1A, in cui il gene implicato, ancora sconosciuto, mappa in 4q35-ter e, FSHMD1B, con lo stesso fenotipo clinico, ma nella quale la malattia non segrega associata ai marcatori della regione 4q35; anche in questo caso il gene non è ancora noto.

Il 95% -100% degli affetti presenta una delezione nella regione polimorfica di sequenze ripetute in tandem D4Z4 di 3.3kb sul cromosoma 4q35. Il numero delle unità ripetute varia nella popolazione da 10 a oltre 100, mentre nei pazienti con FSH si riscontrano ripetizioni in numero inferiore a 10. Questo porterebbe ad un silenziamento del gene-malattia per un effetto di posizione perché sarebbe più vicino al telomero che porta ad un silenziamento. Le delezioni su 4q35 sarebbero conseguenti a scambi di unità ripetute tra 4q35 e 10q26, si è infatti visto che la frequenza di delezione nella regione 4q35 è in rapporto con il numero di ripetizioni nella regione ad alta omologia (>98%) sul cromosoma 10q26. Queste traslocazioni subtelomeriche dinamiche fra il 4q35 e il 10q26 accadono frequentemente nella popolazione generale. La delezione di D4Z4 porta a malattia se avviene sul 4q35, mentre non è patogenetica se avviene sul 10q26. L'analisi del DNA è legata allo studio degli aplotipi mediante marcatori della regione contigua a D4Z4 e si basa su Southern blot dopo digestione con enzima di restrizione EcoRI che identifica la delezione del frammento in 4q35 secondario a traslocazioni di sequenze ripetute fra il 4 e il 10.

I risultati comprendono:

- Frammenti di 42kb o più sono considerati normali
- Frammenti di 38-41kb (zona grigia) sono considerati borderline e richiedono un forte supporto clinico per la diagnosi.
- Frammenti di 34kb o più piccoli sono presenti nel 95% degli affetti.

Mosaicismo risultante da una mutazione *de novo* postmitotica al locus D4Z4, precocemente nell'embriogenesi. Circa la metà dei casi di FSH *de novo* è secondario ad un evento mitotico e la gravità del fenotipo è legata alla proporzione delle cellule portatrici della mutazione.

Si ritiene che la regione ripetuta si trovi in prossimità del gene implicato più centromerico rispetto alla regione, ma non si conosce ancora il gene nella regione responsabile della malattia.

Oltre il 10% dei casi è rappresentato da nuove mutazioni, probabilmente più frequenti nella gametogenesi femminile. Come è da attendersi in base all'elevato tasso di mutazione è stato descritto mosaicismo sia a livello germinale che somatico.

Un piccolo gruppo di famiglie affette non mappano in 4q35 e la localizzazione di questo secondo locus è sconosciuta. Queste 2 condizioni rendono ragione di quel 5% degli affetti che non presenta una delezione di D4Z4 identificabile.

E' riportata correlazione genotipo-fenotipo con quadri più gravi associati a frammenti più piccoli e viceversa.

Più piccoli frammenti si associano a FSH congenita, grandi delezioni con 2-3 sequenze ripetute (frammento di 10-13kb) si associano ad un esordio precoce (1-16 anni) e fenotipo severo. Delezioni intermedie con 4-7 sequenze ripetute (frammento > 16kb) si associano ad un'età di esordio di 8-22 anni e quadro classico mentre più piccole delezioni con 8-10 sequenze ripetute (frammento >35kb) si associano ad un esordio più tardivo fra i 15 e i 23 anni. Il frammento di 35-48kb si associa a fenotipi subclinici mentre i frammenti di 42kb o più sono considerati normali.

Descritti casi di doppia eterozigosi molto rari, perché si suppone sia una condizione letale.

MANAGEMENT

- Esame fisico per stabilire la limitazione funzionale
- Fisioterapia per aiutare le limitazioni
- Studio dell'udito
- Valutazione oftalmologia per la presenza di teleangiectasie retiniche

TRATTAMENTO DELLE MANIFESTAZIONI

- Interventi ortopedici su anche e piedi
- Fissazione chirurgica della scapola
- Corticosteroidi con scarsi risultati se si considera la storia naturale dopo 12 settimane di trattamento.
- Trattamento standard della sordità neurosensoriale, se presente.
- Lubrificanti oculari per prevenire secchezza della sclera e cheratiti.

CONSULENZA GENETICA

L'FSHD è ereditata in maniera Autosomico Dominante.

Il 70-90% hanno un genitore con la delezione di D4Z4, mentre il 30-10% sono delezioni *de novo*; quindi, è importante analizzare clinicamente e molecularmente i genitori dell'affetto (possono essere paucisintomatici, possono essere deceduti prima dell'esordio della malattia o l'esordio può essere tardivo)

Rischi di Ricorrenza:

Se un genitore è affetto, il rischio sarà del 50%, se no il rischio sarà molto basso (rischio di mosaicismo germinale la cui incidenza è sconosciuta).

PAZIENTI E METODI

Il lavoro si è svolto presso l'unità operativa di Genetica Clinica e Malattie Rare dell'Ospedale Microcitemico di Cagliari.

L'iter diagnostico per questi pazienti è spesso lungo e complicato dalla difficoltà nel reperire casistiche per studi clinici ed epidemiologici; il motivo dell'ingresso è in genere: una semplice elevazione dei valori delle CPK, la presenza di segni di debolezza muscolare, o la familiarità per patologie neuromuscolari.

Il processo di valutazione di un bambino che entra per la prima volta nel nostro centro è così articolato:

- **Studio dell'albero genealogico e anamnesi familiare** accurata atto a raccogliere, anche nelle diverse generazioni, dettagli utili per ottenere informazioni in grado di contribuire alla definizione del disturbo in esame.
L'albero genealogico deve contenere informazioni anche relativamente agli aborti, alle morti perinatali, alla consanguineità frequente in molti paesi della Sardegna, alla presenza di sintomi neurologici nel contesto della famiglia, come astenia muscolare, contratture, disturbi della deambulazione e di morti improvvise per eventuali problemi cardiaci.
- **Anamnesi personale**, compreso il periodo della gravidanza, malattie materne durante tale periodo, eventuali minacce d'aborto, la presenza di poli- o di oligoidramnios; particolare attenzione va posta per i movimenti fetali in utero,

ridotti in forme gravi di malattie neuromuscolari come le Distrofie Muscolari Congenite. Bisogna indagare inoltre su eventuali farmaci o sostanze assunte , fumo, alcolici, infezioni o altre noxe patogene. Per questi fattori è importante saperne il preciso periodo della gravidanza, in correlazione con lo sviluppo embriologico.

Sono fondamentali le informazioni riguardanti il periodo perinatale, soprattutto nei casi associati a ritardo dello sviluppo psicomotorio, nelle para o tetraparesi, la valutazione del punteggio Apgar e la presenza o meno di sofferenza o convulsioni.

E' importante, inoltre, ricostruire in maniera precisa le tappe dello sviluppo psicomotorio, bisogna soffermarsi sull'età in cui il bambino ha cominciato a sorridere, a stare seduto, a camminare da solo, ad andare con il triciclo o la bicicletta, e via via tutte le informazioni necessarie per inquadrarlo. Queste informazioni sono fondamentali nella distinzione tra un processo statico e progressivo; se un processo è progressivo il bambino avrà sviluppato normalmente, poi comincerà a bloccarsi nelle nuove acquisizioni e successivamente comincerà a perderle, diversamente da un bambino partito da una condizione di base di ritardo.

- **Anamnesi patologica e neurologica remota:** deve essere dettagliata e deve raccogliere nella maniera più precisa possibile tutte le informazioni utili per orientarci verso una diagnosi e per l'impostazione degli esami e dei test genetici necessari per poterla definire. Deve essere rilevata l'eventuale

presenza di sintomi associati, come crampi o dolori muscolari, più frequenti nei disturbi metabolici o infiammatori, astenia, frequenti cadute, difficoltà a salire le scale ad alzarsi o a sollevare le braccia . Sono importanti anche le informazioni riguardanti la scuola e l'apprendimento, la partecipazione, il comportamento e il rapporto con i compagni, preziosi per identificare la personalità del paziente.

- **Esame obiettivo:** accurato per ricercare anche i segni minori che in combinazione possono essere determinanti per l'orientamento diagnostico.

L'esame clinico si fonda sull'osservazione perspicace e abilmente indirizzata del bambino durante l'attività spontanea o specifiche occupazioni; la parte più rilevante dell'esame neurologico del bambino, infatti, consiste nella semplice osservazione, in parte mirata su diverse situazioni particolari. L'esame obiettivo di un paziente affetto da una malattia neuromuscolare deve comprendere una valutazione generale, oltre a un esame neurologico più focalizzato in base al disturbo lamentato. E' importante la valutazione della forza muscolare, l'osservazione dei movimenti spontanei o durante piccoli esercizi, come sollevare le braccia, inchinarsi toccandosi la punta dei piedi, sollevarsi da terra etc. L'esame del tono e della forza dei muscoli comporta l'osservazione della simmetria delle masse muscolari, di eventuali deformità degli arti o di disparità di lunghezza. Non sempre è possibile una determinazione classica della forza, ma può essere eseguita una valutazione funzionale. Per esempio, si possono definire le capacità motorie facendo giocare i bambini e inducendoli a correre. La forza

delle estremità inferiori può essere valutata osservando se il bambino è in grado di camminare sulle punte o sui talloni. Si può chiedere al bambino di arrampicarsi su un mobile o, se sa camminare, di sdraiarsi prono o supino sul pavimento e di alzarsi rapidamente. La manovra di Gowers può determinare la presenza di ipostenia o di un'anomalia del tono, se vi sono dubbi in proposito. Il “segno di Gowers” è positivo se il bambino ha bisogno di usare le braccia per sollevare il corpo, o di appoggiarsi a un oggetto per alzarsi dal pavimento; ciò indica una debolezza dei muscoli prossimali del cingolo pelvico. Benché non si tratti di un segno specifico di alcun disturbo muscolare particolare, esso indica la necessità di un'ulteriore valutazione della forza e della funzionalità dei muscoli. Un altro efficace metodo manuale per determinare la forza muscolare prossimale consiste nel sollevare il paziente sostenendolo per le ascelle: se il bambino scivola fra le mani, è presente un'ipostenia del cingolo scapolare. L'esame dei riflessi deve essere eseguito di routine. E' utile la semplice valutazione della presenza, assenza o eccessiva vivacità dei riflessi. L'approccio all'esame neurologico dei neonati è in parte differente e in questi è necessario valutare le risposte riflesse primitive che, man mano che i bambini maturano, vengono sostituite da riflessi difensivi e successivamente da reazioni volontarie; nei neonati e nei bambini piccoli la valutazione del tono neuro-muscolare può essere fatta già dall'esame della postura, questi, inoltre possono manifestare debolezza muscolare con scarsa suzione, pianto flebile, insufficienza respiratoria o mancanza di movimenti spontanei. Determinando se la distribuzione della debolezza è focale, multifocale,

o diffusa, si possono ottenere elementi importanti per la diagnosi. Una debolezza muscolare diffusa deve essere ulteriormente caratterizzata in base al coinvolgimento prevalente di gruppi muscolari prossimali (cingoli pelvico e scapolare) o distali (mani e piedi). La distribuzione prossimale della debolezza ha di solito un'origine miopatica, mentre una debolezza selettiva che coinvolge alcuni segmenti di un arto è più spesso di natura neuropatica.

Come abbiamo visto, l'esame clinico è un elemento importante nell'inquadramento diagnostico ma, visto che fenotipi clinicamente simili possono riconoscere una causa diversa, prima di porre la diagnosi devono essere attentamente considerate tutte le possibilità e devono essere effettuati tutti gli altri accertamenti necessari.

Inoltre, alcuni pazienti sono molto più gravemente affetti di altri con la stessa condizione e quindi può essere difficile porre una diagnosi precisa.

Per molti pazienti raccogliamo materiale fotografico o filmati che documentano la progressione di determinate patologie muscolari e che ci permettono di studiare il caso in maniera più precisa.

- **Enzimi sierici CPK:** le fibre muscolari danneggiate o in degenerazione liberano numerosi enzimi che possono essere misurati nel siero. La CPK rappresenta l'enzima chiave per studiare queste malattie, nel senso che, mentre tutti gli altri enzimi sono aspecifici in quanto possono venire da tutti gli organi (cuore, fegato, rene), la creatinfosfochinasi (CPK) si trova solo in tre organi e può essere separato nei corrispondenti isoenzimi : MM per il muscolo

scheletrico, MB per il muscolo cardiaco, BB per l'encefalo; trovando nel siero un aumento dell'isoenzima MM si è sicuri che è di origine muscolare. Altri enzimi muscolari quali l'aldolasi, la fosfo-frutto-chinasi, la lattico-deidrogenasi e le transaminasi possono essere aumentate durante i processi di degenerazione muscolare, ma sono meno specifiche perché, come abbiamo visto, hanno un'origine molto più vasta. La CPK è caratteristicamente elevata nella maggior parte delle distrofie muscolari, come si può vedere nella descrizione specifica, e l'entità dell'incremento è caratteristica di alcune forme.

- **L'esame elettromiografico (EMG)** e gli studi di conduzione nervosa motoria e sensitiva (VCNM e VCNS) rappresentano indagini strumentali di importanza cruciale nella diagnosi di malattie del sistema nervoso periferico e nella distinzione tra un processo miopatico e neuropatico. L'EMG consiste nella registrazione dell'attività elettrica del muscolo mediante introduzione di ago-elettrodo concentrico. Le due metodiche, EMG e VC, possono essere uno strumento di valore primario nella diagnosi delle malattie dei vari costituenti dell'unità motoria, mentre non è altrettanto valido il loro significato nelle lesioni centrali o, comunque, del 1° motoneurone. Nelle miopatie distrofiche il numero delle fibre muscolari è diminuito e il tessuto muscolare primitivo è in parte sostituito da tessuto adiposo e fibroso; l'eccitazione neurogena, perciò, tende a disperdersi in modo asincrono all'interno del muscolo malato, al punto che buona parte dei MUP residui rischia di annullarsi reciprocamente anziché sommarsi. Il MUP rappresenta la somma dei potenziali di un certo numero di

fibre muscolari che appartengono a quell'unità motoria. Si registra facendo contrarre il muscolo delicatamente. Lo studio dei MUP permette una distinzione fra sofferenza neurogena e miogena. In corso di sofferenza neurogena la durata e l'ampiezza del MUP sono aumentate per i processi di reinnervazione presenti; sono aumentate anche nelle miopatie croniche. Nei processi miogeni per la perdita delle fibre muscolari sia la durata che l'ampiezza dei MUP sono ridotti. Tuttavia, questi dati non sono specifici, ma si ritrovano in tutti i disordini miogeni, pertanto è di fondamentale importanza l'esecuzione di ulteriori indagini.

- **Biopsia muscolare:** Abbiamo visto nella descrizione dei singoli difetti che la biopsia muscolare rappresenta l'esame più importante e specifico ai fini diagnostici; esso, infatti, permette in molti casi mediante indagini specifiche di identificare una specifica forma di distrofia muscolare. Sul muscolo vengono effettuate indagini specifiche con colorazioni istologiche e tecniche immunoistochimiche e con anticorpi specifici. I test biochimici sulla biopsia muscolare sono attuabili solo per le Distrofinopatie, Sarcoglicanopatie, Calpainopatie, Disferlinopatie, Teletoninopatie. La dimostrazione di completo o parziale difetto di una particolare proteina può essere seguito dallo studio del corrispondente gene.

Distrofinopatie: come abbiamo visto precedentemente, viene eseguita un'analisi immunoistochimica e immunologica con le tecniche di immunoblotting eseguita sulle sezioni di muscolo con anticorpi specifici anti-distrofina (contro diversi

domini della molecola). Inoltre , il Western blot è in grado di rilevare l'eventuale presenza di distrofina di lunghezza anomala, sia ridotte di dimensioni a causa di delezione, che di dimensioni maggiori del normale a causa di una duplicazione.

Sarcoglicanopatie : La mutazione di ogni singolo gene porta ad un secondario difetto biochimico di tutti i Sarcoglicani. Per esempio, individui con mutazioni nel gene dell'alfa-sarcoglicano mostrano marcato difetto o assenza dell'alfa, beta, gamma e delta sarcoglicani all'immunoistochimica del muscolo. Con l'uso degli anticorpi per tutti i 4 sarcoglicani si può identificare più precisamente il difetto. Poiché tutti gli individui con distrofinopatia primitiva mostrano una deficienza di sarcoglicani, nello stesso campione di muscolo va eseguita l'immunoistochimica per la distrofina.

Calpainopatie: L'immunoblot non è altamente specifico o sensibile, la Calpaina 3 può essere instabile nel muscolo e ciò porta a difficoltà nell'interpretazione. La diagnosi si può effettuare con lo studio diretto della mutazione o con l'immunoblot della Calpaina 3 seguita dallo studio molecolare.

Disferlinopatie: L'immunoblot è accurato e sensibile e può essere usato come test di routine.

- **Studio molecolare**: gli enormi passi avanti della biologia molecolare compiuti negli ultimi due decenni, hanno determinato un consistente progresso delle conoscenze nel campo delle malattie neuromuscolari ereditarie : non solo sono stati identificati i loci corrispondenti alle principali forme cliniche e spesso caratterizzati i relativi geni, ma è stata messa in luce la forte eterogeneità

genetica sottostante la classificazione tradizionale; ulteriori progressi sono attualmente in corso con l'identificazione di tutti i difetti genetici responsabili di una determinata forma clinica e chiarendo la patogenesi e le relazioni funzionali tra le varie componenti in gioco. L'analisi genetica viene effettuata per quanto riguarda le Distrofinopatie e le DM facio-scapolo-omerali presso i laboratori di Biologia Molecolare dell'ospedale Microcitemico di Cagliari; lo studio della lamina viene effettuato nel laboratorio presso il Centro regionale per la diagnosi e la cura della sclerosi multipla di Cagliari, mentre per quanto riguarda le altre DM dei cingoli il DNA viene inviato in vari laboratori di genetica molecolare presenti nel continente; ci si avvale per questo dell'ausilio del computer con programmi specifici quali Orpha-net o Gene-test .

- La nostra attività si svolge interagendo con altri specialisti per quanto di loro competenza e nel caso specifico delle distrofie Muscolari (neuro-fisiologo, ortopedico, psicologo, cardiologo, fisiatra, pneumologo etc) per eseguire un adeguato Follow-up dei pazienti.

In presenza di casi complicati ci avvaliamo della consulenza di specialisti ad alta professionalità presenti nel territorio nazionale o internazionale con i quali comunichiamo via mail per lo studio del caso.

- **“Consulenza genetica”**: una volta posta la diagnosi, si pone il problema della prognosi e del rischio di ricorrenza che per la valenza dei temi trattati (salute, malattia, procreazione, aspettative e qualità di vita) ha forti connotazioni

psicologiche ed etiche. Il medico in questo processo deve aiutare l'individuo o la famiglia a:

- 1) comprendere le informazioni mediche, che includono la diagnosi, la prognosi e il trattamento disponibile;
- 2) capire il modo in cui l'ereditarietà contribuisce alla malattia e il rischio di ricorrenza in alcuni familiari;
- 3) essere informati circa tutte le alternative disponibili per affrontare il rischio di ricorrenza;

La corretta comprensione delle informazioni è essenziale perché il consultando prenda decisioni appropriate concernenti situazioni di vita personali.

RISULTATI

DISTROFINOPATIE

Per quanto riguarda le distrofinopatie abbiamo seguito presso il nostro centro 33 pazienti, dei quali 15 presentano un fenotipo classico di DM di Duchenne, 8 un fenotipo classico di DM di Becker.

Altri 9 pazienti presentano un fenotipo attenuato, compresi alcuni clinicamente silenti, nonostante la presenza di mutazioni del gene della distrofina, e definiti come Distrofinopatie.

I nostri pazienti sono stati studiati con metodica PCR multiplex con la quale è possibile identificare più del 90% delle delezioni più frequenti. Utilizzando questa metodica è possibile ottenere un primo quadro esplicativo delle condizioni del gene nelle regioni hot-spot (cioè le regioni maggiormente esposte a mutazioni). Sui campioni nei quali è stata riscontrata la delezione di uno o più esoni sono state eseguite singole PCR degli esoni fiancheggianti, in modo da delimitare l'estensione della delezione ed il suo frame.

L'analisi molecolare del gene della distrofina ha mostrato i seguenti risultati:

Nei pazienti con fenotipo classico di DM di Duchenne sono state riscontrate Delezioni out-frame in 6 pazienti, negli altri 9 pazienti non è stata trovata nessuna delezione nel gene.

Nei pazienti con fenotipo classico di DM di Becker sono state trovate mutazioni in 5 (3 delezioni, 1 mutazione puntiforme, 1 inserzione/duplicazione).

Nei 9 pazienti oligo-asintomatici sono state trovate 6 mutazioni del gene della distrofina, dei quali 2 con una mutazione out-frame.

TAB 8: Casistica Clinica Pediatrica II: Patologia Molecolare

	Numero	Delezioni N°	%	Mutazioni puntiformi N	%
DM di Duchenne	15	6	37	0	/
DM di Becker	9	3	33,3	2	22
Distrofinopatie asintomatiche	9	6	66,6	0	/

DISTROFIA MUSCOLARE DI DUCHENNE

In questi anni sono stati seguiti 15 pazienti con Distrofia Muscolare di Duchenne; una volta posta la diagnosi, diventa infatti fondamentale seguire questi pazienti dal punto di vista clinico per prevenire o trattare precocemente le complicanze che inevitabilmente compaiono con la progressione della malattia.

Questo viene fatto con un approccio multidisciplinare, in collaborazione con altri specialisti.

Tutti i pazienti eseguono periodicamente una valutazione fisiatrica con una programmazione di un trattamento fisioterapico, al fine di evitare o ritardare le contratture, che nella DM di Duchenne sono costanti e gravi e accelerano l'evoluzione verso un'invalidità permanente; sono favorite dallo squilibrio muscolare e dall'immobilità. Si presentano più costantemente a livello dei muscoli del polpaccio

e dei flessori della coscia, per mantenere la statica nella forzata andatura in punta di piedi .

La retrazione muscolare, inoltre, contribuisce all'instaurarsi delle deformità articolari insieme alla degenerazione muscolare specifica, ed è determinata da uno squilibrio della gravità del deficit fra i diversi gruppi muscolari. Dal punto di vista chinesilogico, le deformità articolari rappresentano un danno di entità addirittura preminente rispetto alla malattia stessa, perché rendono progressivamente impossibili la deambulazione e la stazione eretta molto prima che ciò venga prodotto dalla specifica perdita di forza muscolare. Quando il paziente non riesce più a stare in piedi o a camminare, le deformità articolari si aggravano molto più rapidamente, rendendo impossibile qualunque tentativo di ripresa, e si fissano in atteggiamenti viziati e asimmetrici. Per questo motivo i nostri pazienti vengono seguiti in maniera ravvicinata anche da uno specialista ortopedico di riferimento; infatti, la scoliosi compare già durante la fase di deambulazione dipendente o subito dopo la perdita del cammino. Inizialmente possono esistere atteggiamenti scoliotici di debole ampiezza, ma dopo la perdita dell'autonomia deambulatoria, progredisce rapidamente e proporzionalmente al danno simmetrico dei muscoli dorsali con una curva toracico-lombare ad ampio raggio, inizialmente riducibile sotto trazione, ma che progressivamente tende a fissarsi. La rotazione vertebrale è particolarmente marcata a livello della colonna lombare. Anche la morfologia dei corpi vertebrali viene rapidamente deformata. La distorsione toracica e l'astenia dei muscoli paraspinali contribuiscono allo sviluppo di un'insufficienza respiratoria cronica; pertanto, questi

pazienti devono essere monitorati eseguendo una spirometria accompagnata dalla misura della saturazione di ossigeno nel sangue; alcuni pazienti negli stadi avanzati della malattia richiedono l'uso di ventilatori meccanici per l'ausilio respiratorio.

Altro aspetto fondamentale è il monitoraggio cardiaco, poichè con l'avanzare della malattia si instaura una cardiopatia ipocinetica che può portare al decesso per insufficienza cardiaca.

Un fatto da non trascurare è, inoltre, l'aspetto psicologico, in quanto la limitazione della mobilità può sfociare in manifestazioni aggressive, tendenza al rifiuto del contatto con l'esterno e alla depressione; diventa cruciale seguire questi pazienti con un supporto psicologico e con una terapia occupazionale per aiutarli ad inserirsi nella società.

TAB 9 e 10: Casistica Clinica Pediatrica II DM di Duchenne

Età attuale	DNA	CPK all'ing	Età di ingresso	Esordio	EMG	Biopsia muscolare
Paz.1: 23	Non delezioni	3519	3aa	Ipertrofia polpacci Gower incompleto Familiarità per DM di Duchenne	Miogeno	Non eseguita per familiarità
Paz. 2: 18	Non delezioni	25436	8aa	Ipertrofia dei polpacci Gowers incompleto Andatura sulle punte	Miogeno	Quadro tipico di DM di Duchenne con Distrofina assente Grado elevato di fibre atrofiche
Paz.3: 19	Delezione dell'esone 49-50-51	6324	8aa	Da sempre goffaggine motoria, dai 7 aa andatura anserina con facili cadute	Non eseguito	Assenza di Distrofina
Paz.4: 24	Delezione degli esoni 48-52		12aa	Diagnosi occasionale a 11 mesi in seguito a ricovero per gastroenterite	Non eseguito	Familiarità per DM di Duchenne 3 fratelli della madre deceduti per DMD
Paz.5: 14	Non delezioni	7902	6mesi	Occasionale riscontro di iperCPKemia	Miogeno	Nel 92.quadro prepatologico di DMD Nel 03 grave quadro distrofico con assenza di distrofina
Paz.6: 22	Delezione 43-45	7179	7aa	Diagnosi occasionale per iperCPKemia in seguito a intervento Deambulazione anserina sulle punte Atrofia cingolo scapolare e pelvico		Eseguiti in altra sede
Paz.7: 14	Non delezione	10.000	1aa	Familiarità (2 fratelli della madre con DMD)	Dubbio quadro miogeno	Alterazioni tipiche della DMD con distrofina assente
Paz.8: 18	Non delezione	10236	5aa	Fratello del precedente Andatura sulle punte, facili cadute difficoltà alla stazione eretta	Non eseguito	Quadro istologico di DM e immunoistochimico caratteristico di DM di Duchenne
Paz.9: 12	Non delezione	12044	4aa	Diagnosi a 17 mesi in seguito a ricovero, iperattività deficit attentivo IperCPKemia	Non eseguito	Quadro di sofferenza di tipo distrofico, assenza di marcatura all'analisi immunoistochimica Distrofinopatia
Paz.10: 18	Delezione degli esoni 12-13	13650	4aa	Dall'età di 1 aa ritardo motorio (difficoltà a salire le scale, mettersi in piedi)	Miogeno	Anticorpi N e C terminali:totale assenza di immunoreattività con entrambi; DMD

Età attuale	DNA	CPK all'ing	Età di ingresso	Esordio	EMG	Biopsia muscolare
Paz.11: 19	Non delezione	18156	6aa	Riscontro occasionale di IperCPKemia per int. Chirurgico. Pseudoipertrofia dei polpacci, Gowers incompleto	Miogeno	Reperto istologico e immunoistochimico di DMD, grande maggioranza di fibre neg. con entrambi gli Ac
Paz.12: 17	Delezione degli esoni 47-52	Molto elevate	6aa	Riscontro occasionale di IperCPKemia in preparazione a int. Chirurgico. Ritardo del linguaggio, andatura anserina		Distrofia muscolare severa DM di Duchenne
Paz.13: 22	Delezione 3-8	26724	7aa	Deambulazione anserina. Equinismo bil. Difficoltà a salire le scale. Gowers incompleto	Miogeno	Quadro istologico di DM Quadro immunoreattivo che suggerisce un fenotipo intermedio tra DMD e BMD
Paz.14: 12	Delezione dell'esone 50	22976	2aa	In seguito a ricovero per broncopolmonite all'età di 2aa IperCPKemia. Frequenti cadute ipertrofia dei polpacci	Normale (all'ing.)	Alterazioni tipiche di DM di Duchenne
Paz.15: 15	Non delezione	3689	8aa	Dai primi mesi di vita ipotonia e dall'inizio della deambulazione frequenti cadute. Anomalo esordio tipo miopatia cong. Ipotrofia cingolo scapolare, pseudoipertrofia dei quadricipiti	Miogeno	Chiare alterazioni di tipo distrofico, totale assenza di distrofina

Età attuale	Terapia cortisonica	Cuore (cardiomiopatia dilatativa)	Torace (deficit restrittivo di grado grave)	Perdita deambulatoria	Scoliosi grave (da int. Ch.)	Int. per allungamento tendine di Achille	Q.I.
Paz.1 23 aa	NO	15 aa	14 aa	9-10 aa	13 aa	No	
Paz.2 18aa	SI	17aa	11 aa	15 aa	13 aa	12 aa	80
Paz.3 19aa	SI	14 aa	14 aa	12 aa	14 aa	No	76
Paz.4 24 aa	SI	14 aa	Deceduto nel 2006 per insuff. Resp. Esordita a 17 aa	13 aa	Operato a 17 aa	No	
Paz.5 14 aa	NO	13 aa	No	13 aa	No	12aa	Lieve ritardo
Paz.6 22 aa	NO	16 aa	17 aa	10 aa	15 aa	11 aa	
Paz.7 14aa	NO	Aorta lievemente dilatata	13 aa	9 aa	12 aa	No	
Paz.8 18aa	NO	17 aa	9 aa	10 aa	12 aa	No	
Paz.9 12 aa	NO	NDR	NDR	10 aa	No	No	Ritardo cognitivo, iperattività, deficit attentivo
Paz.10 18 aa	SI	17 aa	10 aa	9 aa	14 aa	9 aa	
Paz.11 19 aa	NO	10 aa (ipertrofia ventricolo sn.)	12 aa	12 aa			
Paz.12 17 aa	SI	14 aa		10 aa e mezzo	Intervento a 14 aa	No	Sviluppo globale lievemente inferiore alla norma
Paz.13 22 aa	NO	A 21 aa iniziale funzionalità ai limiti inf. della norma	15 aa	11 aa	15 aa	No	QI superiore alla norma Aggressività
Paz.14 12 aa	NO	NDR	8aa poco collaborante	11 aa	No	No	QI 70
Paz.15 15 aa	SI	Tachicardia sinusale	8 aa	9 aa	13 aa	No	

DISTROFIA MUSCOLARE DI BECKER

Per quanto riguarda i pazienti con Distrofia muscolare di Becker è più difficile l'inquadramento in quanto il quadro clinico è molto più variabile, andando da quadri più gravi a quadri più lievi o, addirittura, pauci o nullisintomatici.

Come per la DM di Duchenne, i pazienti sono sottoposti a follow-up che dipende dalla gravità della sintomatologia; è importante eseguire periodicamente una visita fisiatrica e una visita ortopedica per valutare la presenza di retrazioni tendinee o deformità ossee come la scoliosi legate all'andatura o alla debolezza muscolare e attuare un trattamento riabilitativo precoce, al fine di evitare o ritardare le complicanze.

E' fondamentale, anche nei pazienti oligosintomatici con distrofinopatia, eseguire periodicamente un controllo cardiologico, in quanto l'alterazione cardiaca con cardiomiopatia dilatativa è una comune causa di morbidità e la più frequente causa di morte .

Includiamo nei pazienti con DM di Becker anche i pazienti oligo-asintomatici, ma con quadro immunoistochimico o analisi genetica di Distrofinopatia.

TAB 11: Casistica Clinica Pediatrica II DM di Becker

Età	CPK	DNA	Esordio	Evoluzione	Cuore	Biopsia muscolare	EMG
Paz.16 7aa	1160 2	Delezione esone 13-41	Diagnosi prenatale Zio materno DMB	Tendenza a camminare sulle punte Gowers +/-	NDR	Processo distrofico in fase iniziale, quadro immunoistochimico di DMB	Miogeno
Paz.17 16 aa	▲▲	Non delezioni	IperCPKemia In occasione di intervento	Articolarità e forza muscolare nei limiti, non scoliosi	NDR	Quadro distrofico di modesta entità DMB	Normale
Paz.18 12 aa	4368	Delezione esone 3-9	IperCPKemia in occasione di ricovero	Iperlordosi lombare, andatura sulle punte	NDR	Segni miopatici di modesta entità, quadro immuno- istochimico di DMB	
Paz.19 18aa	8338	Non delezione	Andatura anserina, iper- trofia dei polpacci, ipo- trofia mm dei cingoli	All'età di 20 aa perdita della deambulazione autonoma. T. cortisonica	NDR	Quadro di sofferenza di tipo distrofico	
Paz.20 11aa	4176	Delezione 45- 51	ipertrofia dei polpacci, frequenti cadute	Andatura anserina, equinismo	NDR	Alterazioni istologiche di tipo miopatico, quadro immuno-istochimico di DMB	Miogeno
Paz.21 15 aa	9033	Mutazione Puntiforme non senso esone 72	Ipertrofia dei polpacci Riflessi poco evocabili Gowers+/-	Retrazione ischio- crurale, modesto deficit di forza cingolo scapolare, scoliosi	NDR	Reperto immunoistochimico con bassi livelli di distrofina con colorazione assente	Miogeno
Paz.22 aa 12	1319	Non delezioni	IperCPKemia in occasione di macro- ematuria, dolori muscolari con impotenza funz.	Lieve impaccio motorio, lieve ipertrofia dei polpacci	NDR	DM in fase iniziale. La ridotta espres- sione della distrofina fa propendere per una DMB	Normale
Paz.23 13 aa	6630	duplicazione di 7 nt nell'esone 28 (presente in altri fami-liari affetti	Familiarità per DM di Becker Ipertrofia dei polpacci Gowers +	Ridotta forza muscolare agli arti sup. Ipotrofia dei quadricipiti. Dolori alle gambe soprattutto ai piedi	NDR	Non eseguita	

Età	CPK	DNA	Esordio	Evoluzione	Cuore	Biopsia muscolare	EMG
Paz.24 8aa	1263	Delezione degli esoni 32-44	Ipertrofia dei polpacci	Asintomatico	NDR	Quadro miopatico, distrofinopatia DMB	
Paz.25 21 aa	995	Delezione degli esoni 48-51	Scoliosi dorso-lombare	Forza muscolare conservata, deficit ventilatorio restrittivo di grado lieve	DIA tipo ostium secundum	Lievi alterazioni miopatiche, distrofinopatia di grado lieve	Normale
Paz.26 14 aa	695	Non delezioni	Completamente asintomatico	Dorso curvo e lieve retrazione ischio-crurale	Lieve insuf.polmonare fisiologica	Distrofina continua e ridotta	Normale
Paz.27 24 aa	748	Delezione degli esoni 32-44	Asintomatico	Lieve deviazione scoliotica, forza muscolare conservata	NDR	Eseguita nel cugino	Normale
Paz.28 22 aa	1392	Delezione degli esoni 32-44	Cugino del precedente Asintomatico	Asintomatico Forza muscolare conservata	NDR	Lievi segni di sofferenza miopatia, non anomalie specifiche a carico della distrofina	Modica riduzione di voltaggio
Paz.29 10 aa	1063	Delezione out-frame dell'esone 2	Clinicamente silente	Condizioni ottime, asintomatico, pratica Sport	NDR	Lieve miopatia, quadro immunoistochimico di DMB	Normale
Paz.30 17 aa	378	Delezione out-frame dell'esone 2	Cugino del precedente Clinicamente silente	E.O. normale Asintomatico	NDR	Eseguita nel cugino	Normale
Paz.31 14 aa	1484	Non delezioni	QI ai limiti inferiori della norma	Grave dorso curvo, retrazione ischio-crurale Forza muscolare conservata	NDR	Quadro istologico di DM in fase iniziale	
Paz.32 43 aa	333	Non delezioni	Lieve ipertrofia dei polpacci,	assenza riflessi patellari bil., lieve retrazione tendine di Achille	NDR	Lievi alterazioni miopatiche, ridotta espressione della distrofina che suggerisce una lieve distrofinopatia	
Paz.33 20 aa	2000	Non delezioni	Nessuna obiettività clinica	Gibbo costale, lieve scoliosi Buon trofismo muscolare, pratica attività sportiva	NDR	Immunoreattività antidistrofina continua ma di intensità ridotta, alterazioni minime della distrofina	Normale

DISTROFIE MUSCOLARI DEI CINGOLI

Paziente 34: figlio unico di genitori non consanguinei, padre deceduto in età giovanile per cause tumorali, nato dopo una gravidanza fisiologica con parto eutocico, sviluppo psicomotorio regolare, con deambulazione a 12 mesi e linguaggio nella norma.

Il paziente, attualmente di 19 anni, si è presentato in clinica per la prima volta all'età di 3 aa per la presenza di disturbi della deambulazione sin poco dopo l'acquisizione della stessa. Il piccolo presentava frequenti cadute, difficoltà a salire e scendere le scale, difficoltà a sollevarsi da terra senza sostegno.

All'E.O. all'ingresso si metteva in evidenza un accrescimento regolare, uno sviluppo psico-motorio nei limiti della norma, un'ipotonìa muscolare generalizzata con iperlassità ligamentosa e lassità cutanea, ginocchio valgo bilaterale, e segno di Gowers positivo. Le CPK erano aumentate con valori di 660 U/l.

All'EMG si metteva in evidenza un tracciato miopatico.

La valutazione cardiologia con l'ecocardiogramma è risultata nella norma.

La Biopsia muscolare eseguita nel 1990 metteva in evidenza un quadro istologico di un processo distrofico di lieve entità, con lieve atrofia delle fibre di tipo I; il pattern immunoistochimico con anticorpi C-terminali anti-distrofina è risultato normale.

Tali reperti, soprattutto quello biotico, hanno fatto propendere per una diagnosi provvisoria di DM congenita, anche se l'assenza di contratture ed il quadro clinico e istologico più lieve lasciavano qualche perplessità sulla diagnosi definitiva.

Da allora ha praticato riabilitazione motoria.

Il paziente si è ripresentato presso il nostro centro nel mese di Novembre 2005:

presentava un'andatura anserina e da circa 6-7 aa un interessamento del cingolo scapolare con impossibilità a sollevare le braccia e contratture dei gomiti.

All'E.O.:

Difetto del cingolo scapolare con scapole alate, difficoltà a portare in alto le braccia, deficit di forza negli arti superiori, contratture nell'articolazione del gomito, ipotrofia dei muscoli delle braccia e del pettorale con assenza dei riflessi.

Difetto del cingolo pelvico con andatura anserina, ipotrofia dei muscoli della gamba, ginocchio valgo, arto inferiore dx in equinismo e adduzione del metatarso, piede cavo bilaterale e assenza dei riflessi. Riso asimmetrico e incapacità a fischiare.

Gli esami di laboratorio mettono in evidenza valori di **CPK di 748 U/l**, un lattato oltre i limiti superiori della norma e nient'altro di rilevante.

La visita fisiatrica riscontra una deambulazione autonoma caratterizzata da pendolo frontale con un'iperlordosi, un'asimmetria degli arti inferiori con il sinistro inferiore di tre cm, compensata da andatura sulle punte con equinismo strutturato.

La visita ortopedica non rileva scoliosi, ma consiglia intervento di allungamento del tendine di Achille che verrà effettuato nel mese di Giugno 2006.

La visita oculistica non mette in evidenza niente di rilevante.

La valutazione cardiologica risulta ai limiti della norma, l'ECG mostra un emiblocco anteriore sn, l'ecocolordoppler cardiaco non mette in evidenza niente di rilevante; la PA è di 135/90 ; viene consigliata vita e trattamento normali con monitoraggio della PA.

Una nuova biopsia muscolare eseguita nel retto femorale di sinistra, mostra reperti di tipo distrofico: ampia variabilità di calibro delle fibre, con fibre in splitting e fibre atrofiche. E' presente fibrosi con tessuto connettivo e adiposo, alterazione del pattern miofibrillare, in alcune fibre aree core-like. Il rapporto tra fibre I e II è anormale, con netta prevalenza delle fibre tipo I (95% del totale) con fibre atrofiche di entrambi i tipi. Viene avviato lo studio del gene della Lamina A/C.

L'indagine genetico-molecolare sul DNA estratto da sangue periferico del gene LAMINA A/C sul cromosoma 1q21.2-q21.3 viene effettuata con una metodica di sequenziamento "dye terminator cycle sequencing" su sequenziatore capillare MegaBace 1000; PCR e digestione con l'enzima di restrizione Msp I. Vengono esaminati tutti i 12 esoni componenti il gene.

L'analisi della sequenza del DNA ha evidenziato la presenza di una mutazione in eterozigotà in posizione: Esone 4: 788T/C CTG**788**CGC (Leu263Pro); è stato inoltre evidenziato un polimorfismo (SPNs) in eterozigotà : Esone 10: 1698 **C/T**.

La presenza di questa mutazione, insieme al quadro clinico ci permette di concludere per una laminopatia. E' stato analizzato anche il DNA della madre nel quale non sono state trovate mutazioni del gene della lamina. Per la precisazione diagnostica

tra LGMD1B e Emery Dreifuss AD, si rimanda alla parte successiva con la discussione del caso.

Paziente 35: figlia unica di genitori non consanguinei, nata dopo gravidanza fisiologica e parto eutocico. L'anamnesi familiare non rivela patologie importanti e l'esame obiettivo dei genitori mostra nel padre solo una lieve ipertrofia dei polpacci con CPK di 199 U/l con VN di 160. L'esame obiettivo e le CPK della madre sono normali. Lo sviluppo psicomotorio della bambina è risultato nella norma.

La piccola attualmente dell'età di 11 anni si è presentata nel nostro centro nel mese di Maggio 2005 in quanto, in seguito a un episodio di tonsillite non febbrile per la quale è comparsa una tumefazione in regione sottomandibolare, ha eseguito Esami di Laboratorio che mettevano in evidenza: AST 138 (U/l) ALT 173 (U/l) e **CPK 5659 U/l**. Ha comunque proseguito la sua attività sportiva pre-agonistica in assenza di sintomi muscolari quali crampi o debolezza.

L'EO si è rivelato completamente normale .

L'EMG ha dato reperti normali.

La valutazione cardiologica con EGC ed ecocolordoppler cardiaco sono risultati nei limiti della norma, tranne un soffio sistolico non patologico.

La biopsia muscolare eseguita nel retto femorale rivela un quadro moderatamente distrofico, con ridotta e/o assente espressione della disferlina in numerose fibre all'immunoistochimica . Sono inoltre presenti infiltrati infiammatori

prevalentemente pervasali, con fibrosi e tessuto connettivo presente a livello endo e perimisiale. La distribuzione e il rapporto tra Fibre I e II sono normali, anche se in un fascicolo è presente una prevalenza di tipo II; la fosfatasi acida e alcalina presentano un'aumentata attività.

E' stato effettuato un Western blot per lo studio della disferlina che ha evidenziato una banda corrispondente alla disferlina di peso molecolare più basso del normale e intensità lievemente ridotta; l'alterata espressione della disferlina è compatibile con una diagnosi di distrofia dei cingoli tipo LGMD2B o Miopatia distale di Miyoshi.

L'analisi del gene ha permesso di identificare una mutazione eterozigote nella sequenza codificante, tale dato potrebbe confermare la diagnosi, anche se andrebbe cercata una seconda mutazione in qualche punto che altera lo splicing.

Tale studio è tuttora in corso .

Paziente 36: nata a termine, dopo una gravidanza fisiologica e parto eutocico, dall'anamnesi familiare risulta che i genitori sono consanguinei.

Dall'anamnesi personale si rivela un ritardo della deambulazione per il quale è stata valutata presso un centro di NPI all'età di 20 mesi. Non si mise in evidenza niente di patologico. La piccola inizia a camminare all'età di 21 mesi.

La paziente, attualmente dell'età di sette anni, si presenta presso il nostro centro all'età di 2aa e mezzo per la tendenza a deambulare con l'avampiede addotto, e per una facilità alle cadute. Da una visita ortopedica eseguita nello stesso periodo,

si evidenziava una ipostenia muscolare, con deambulazione falciante, ginocchio valgo, veniva consigliato un plantare per l'avampiede addotto. Visitata da un altro ortopedico, si evidenziava un'antiversione del collo femorale di grado marcato, con apparente ipertono del tricipite surale bilaterale.

L'esame obiettivo all'ingresso metteva in evidenza: addome globoso, antiversione del collo femorale, ipertrofia dei polpacci con tendenza ad andare sulle punte, Gowers positivo, riflessi patellari e degli arti superiori difficilmente evocabili. L'andatura è anserina con facile stancabilità e facilità alle cadute. L'aspetto generale è tipo Duchenne-like. Il valore delle **CPK** è risultato intorno a **7000 U/l**.

L'EMG, pur eseguito con scarsa collaborazione della paziente, non mostra caratteristiche neurogene, ma piuttosto modicamente miopatiche.

La biopsia muscolare mostra un muscolo chiaramente patologico, con forte fibrosi e presenza di fibre rotondeggianti con elevata espressione di miosina fetale che fanno pensare a una forma di DM congenita merosino-positiva.

All'immunoistochimica si rileva una lieve riduzione generale della spettina, della distrofina, e dei sarcoglicani, verosimilmente artefattuali.

Lo studio molecolare del gene della distrofina e dei sarcoglicani non hanno messo in evidenza la presenza di mutazioni.

La valutazione cardiologica con ECG ed ecocolordoppler cardiaco mostra una lieve insufficienza tricuspidalica, ma l'esame cardiologico risulta ai limiti della norma.

La RMN encefalo nel sospetto di una DM congenita non ha messo in evidenza alcuna alterazione.

Una valutazione psicologica eseguita all'età di sette anni, mostra uno sviluppo cognitivo nella norma, se pur di livello medio inferiore, con discrepanza significativa tra rendimento nelle prove verbali, di punteggio inferiore e prove di performance. In particolare sarebbero emerse difficoltà nella capacità di immagazzinare, comprendere e utilizzare l'informazione, così come nell'attenzione e concentrazione.

Lo studio molecolare ha messo in evidenza una mutazione omozigote missense della **FKRP (Met 427 Ile)**, facendo propendere per una diagnosi di Distrofia muscolare dei cingoli tipo LGDM2I o la sua forma allelica Distrofia muscolare congenita tipo 1 C .

Paziente 37 : Nato da genitori non consanguinei a termine, da parto eutocico, anamnesi familiare negativa, tranne una lieve rigidità alla flessione della colonna nella madre.

Il paziente, attualmente dell'età di 11 anni, è entrato nel nostro reparto circa un anno fa per la presenza di un difetto di apprendimento, con tendenza all'isolamento e, da circa due anni, tendenza alla deambulazione sulle punte, con difficoltà alla flessione del tronco e all'elevazione degli arti superiori. Aveva eseguito una RMN del midollo e una visita ortopedica che non hanno messo in evidenza niente di rilevante.

All'esame obiettivo all'ingresso si metteva in evidenza: tendenza alla "spina rigida" con incompleta flessione del tronco, difetto di elevazione e abduzione degli arti

superiori, tendenza a camminare sulle punte con riflessi vivaci agli arti inferiori e modesto ipertono.

Tra gli esami praticati, viene fatto uno screening metabolico per i ritardi mentali (Esame del lattato, piruvato, aminoacidemia, aminoaciduria, aciduria organica, CDT, enzimi lisosomiali) tutti risultati nella norma. Il DNA per la ricerca del sito Fragile nel cromosoma X è risultato normale.

Il valore delle **CPK** è risultato **normale**.

Viene eseguita una RMN dell'encefalo risultata nella norma

La visita fisiatrica mostra una andatura tendenzialmente in appoggio sull'avampiede; rigidità della colonna; la forza muscolare è conservata su tutti i distretti, fatta eccezione per un modesto deficit di forza al cingolo pelvico e scapolare.

L'EMG mostra reperti con carattere miogeno, più evidente nei muscoli degli arti superiori.

La biopsia muscolare mostra un muscolo normale.

Viene effettuata l'analisi del gene della Lamina che non ha messo in evidenza nessuna mutazione ma solo un polimorfismo. E' attualmente in corso lo studio del gene COL VI per la diagnosi molecolare di miopatia da collagene VI (Bethlem miopatya).

Paziente 38: nato nel 1937, seguito presso il nostro centro da circa tre anni. Il paziente ha avuto uno sviluppo normale sino all'età di 35 anni, quando ha iniziato a lamentare alterazioni nella deambulazione con atassia e sospetta labirintite; valutato

da un neurologo che eseguiva gli esami del caso, tra cui il dosaggio delle **CPK** con valori di **2258 UI/l**. Si concludeva per miopatia dei cingoli. Nel '91 è stato ricoverato presso una clinica neurologica per ipotrofia della muscolatura dorso-lombare, glutea e delle cosce bilaterale e interessamento più lieve dei muscoli del cingolo scapolare, con riduzione della forza segmentaria. All'EMG si evidenziava una modesta sofferenza miopatica. Dalla biopsia muscolare si evidenziavano lievi segni miopatici compatibili con la diagnosi di miopatia dei cingoli.

All'ingresso presso il nostro centro, il paziente presentava deambulazione lievemente anserina con baricentro spostato all'indietro, ipotrofia della muscolatura del cingolo scapolare, con riflessi OT presenti e simmetrici.

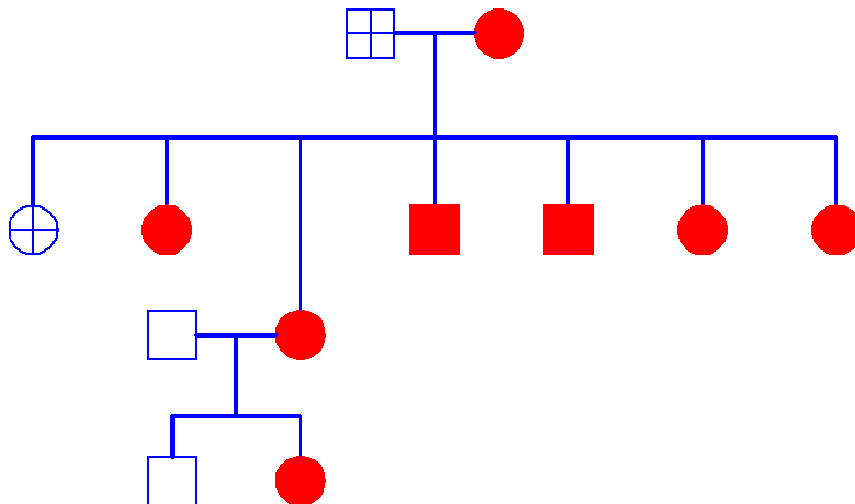
All'Ecocardiogramma è presente un ventricolo sinistro lievemente dilatato con lieve riduzione della funzionalità sistolica. Alterazioni del rilasciamento nella diastole con lieve insufficienza mitralica.

L'EMG evidenziava reperti di tipo miogeno, specialmente sui muscoli del cingolo scapolare. Alla biopsia muscolare si metteva in evidenza una variabilità di calibro delle fibre con presenza di fibre distrofiche e ipotrofiche, fibrosi lieve con aumento del tessuto connettivo. All'immunoistochimica si evidenziava una riduzione degli alfa e beta sarcoglicani. Lo studio del DNA per la ricerca delle mutazioni più comuni dei sarcoglicani ha dato esito negativo. Rimane quindi in sospeso la diagnosi di DM dei cingoli da difetto dei sarcoglicani.

DISTROFIA MUSCOLARE FACIO-SCAPOLO-OMERALE

Descriviamo 6 pazienti con quadri clinici differenti:

Paziente 39: familiarità per FSH presente nella famiglia materna (vedi albero genealogico). Dallo studio familiare emerge che due fratelli e una sorella della madre hanno manifestato la malattia in forma grave con inizio della sintomatologia all'età di 13 aa e con deambulazione gravemente compromessa, mentre la loro madre ha perso l'autonomia deambulatoria con confinamento in sedia a rotelle all'età di 55 anni.



La paziente, attualmente dell'età di 22 aa, si presenta per la prima volta nel nostro centro all'età di 11 aa per la presenza di Ritardo mentale con lievi note dismorfiche. L'inizio della deambulazione è avvenuto all'età di 18 mesi e il linguaggio all'età di 3aa, all'ingresso presentava un lieve ritardo dello sviluppo psicomotorio, con scarso rendimento scolastico. L'EO metteva in evidenza una bassa attaccatura dei capelli,

bocca sempre aperta, scoliosi e dorso curvo, riflessi OT nella norma. Le CPK mostravano valori nei limiti della norma o lievemente aumentate.

Alla valutazione psicologica si evidenziava un ritardo mentale lieve, con QI di 72.

All'EMG si mettevano in evidenza reperti di tipo miopatico.

La biopsia muscolare evidenziava minime alterazioni miopatiche con minimi segni patologici, caratterizzati da variabilità di calibro delle fibre, con fibre modicamente atrofiche.

Le prove audiometriche sono risultate normali.

La visita fisiatrica mostra un lieve deficit di forza al cingolo scapolare.

Lo studio del DNA mostra un frammento anomalo di 19,5 Kb al locus 4q35; dopo doppia digestione enzimatica EcoRI-Bnll tale frammento si riduce a 16 Kb, dimostrando la sua appartenenza al locus 4q35 implicato nella malattia.

Attualmente la paziente, abbastanza stazionaria dal punto di vista muscolare, ha mostrato un'involuzione depressiva, accompagnata dall'evolvere della malattia anche nella madre, con QI di 45 e autolesionismo.

La madre dopo i 40 aa ha iniziato a peggiorare dal punto di vista muscolare, non riuscendo a estendere verso l'alto le braccia, facendo le scale con sempre maggiore difficoltà, con incapacità a camminare sulle punte e sui talloni.

Presentava un'andatura con lieve steppage bilaterale che ha necessitato l'ausilio di apparecchi ortesici per contenere le cadute del piede. La ridotta forza muscolare risulta più evidente nell'emisoma di sn.

Paziente 40: il paziente, attualmente dell'età di 25 aa, si presenta per la prima volta presso il nostro istituto all'età di 20 aa in quanto presenta una familiarità per FSH. L'esame obiettivo all'ingresso mostrava ipotrofia dei muscoli del cingolo scapolare, con impossibilità a sollevare soprattutto l'arto sn., un'asimmetria toracica con scoliosi. Le **CPK** mostravano valori di **1003 UI/l**. All'EMG si mettevano in evidenza reperti di tipo miopatico. La valutazione cardiologica con l'ecocardiogramma è risultata normale.

Lo studio del DNA mediante sonda molecolare p13E11 ha evidenziato, in seguito a digestione del DNA con l'enzima EcoRI, un frammento anomalo di circa 19 Kb. Tale frammento, dopo doppia digestione enzimatica (EcoRI-blnI), si riduce a circa 16 Kb, dimostrando la sua appartenenza al locus 4q35 implicato nella malattia.

Paziente 41: il paziente, attualmente dell'età di 40 aa, si è presentato presso il nostro istituto all'età di 32 aa perché da circa 6aa presentava un'ipotrofia del quadricipite dx, con senso di peso e debolezza della muscolatura dell'arto inferiore dx maggiormente localizzata nella porzione distale del quadricipite e nella porzione distale dei muscoli della sura; una miopatia dei cingoli con quello scapolare maggiormente interessato di quello pelvico e un'andatura con steppage. Un fratello presentava una sintomatologia simile ma più grave e veniva diagnosticato come polimiosite. Dall'anamnesi familiare emerge che il nonno materno, forse in seguito a un infortunio, presentava alterazioni della deambulazione non precisate, con facili cadute e impossibilità a salire e scendere le scale.

All'EO si metteva in evidenza una miopia con chiusura palpebrale incompleta ad occhi chiusi, una facies lievemente amimica con sorriso orizzontale, interessamento del cingolo scapolare con spalle cadenti, ipotrofia dei muscoli pettorali e riflessi OT difficilmente evocabili, andatura a piede cadente.

L'EMG mostrava reperti di tipo miopatico.

Alla biopsia muscolare si mettevano in evidenza alterazioni miopatiche aspecifiche con lieve quadro distrofico.

Lo studio del DNA con sonda molecolare p13E11 ha evidenziato, in seguito a digestione del DNA con enzima EcoRI un frammento anomalo di circa 23 Kb (presente anche nella madre e nel fratello). Tale frammento con doppia digestione enzimatica EcoRI-BlnI, si riduce a 20 Kb dimostrando l'appartenenza al locus 4q35 implicato nella malattia.

Paziente 42: il paziente, attualmente dell'età di 36 anni, si è presentato presso il nostro centro all'età di 32 perché presentava facile stancabilità con impossibilità a sollevare le braccia sul capo. Tale sintomatologia, esordita all'età di 18 aa, sarebbe peggiorata nel tempo. Dall'anamnesi familiare emerge che una sorella dall'età di 31 aa presentava un difetto di forza muscolare del cingolo scapolare con tendenza alle scapole alate; e un fratello dell'età di 45 aa presenta difficoltà all'elevazione di un arto superiore.

All'EO si evidenziavano scapole alate con deficit muscolare più marcato nell'arto superiore sn, riflessi normali.

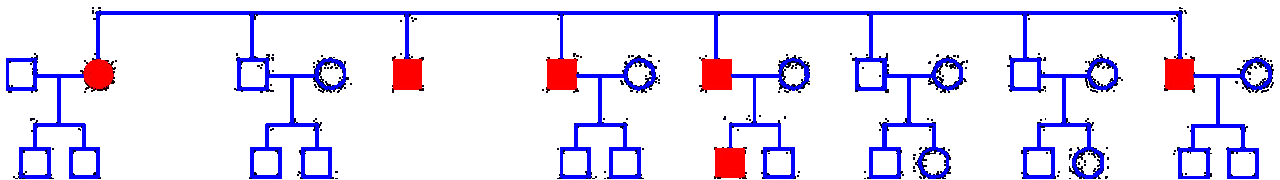
Il dosaggio delle CPK mostrava valori di 377 UI/l.

L'EMG mette in evidenza reperti miopatici.

La biopsia muscolare mostra modeste alterazioni miopatiche con rapporto anormale tra fibre I e II.

L'analisi del DNA mostra un frammento al limite della risoluzione (35-40 Kb) che sembra lievemente ridursi di dimensione dopo doppia digestione enzimatica EcoRI-BnlI. E' importante sottolineare che un frammento di tali dimensioni cade nella fascia di transizione tra quelli associati alla malattia (10-35 Kb) e quelli polimorfici della popolazione normale (35-300 Kb).

Lo studio della famiglia mostra la mutazione anche in fratelli asymptomatici.



Paziente 43: nipote (figlio del fratello) del paziente che abbiamo descritto precedentemente con FSH (paziente 42).

Il paziente, attualmente dell'età di 19 anni, si è presentato nel nostro centro all'età di un anno per un ritardo dello sviluppo psico-motorio con ritardo dell'accrescimento

statur-ponderale. Dall'anamnesi personale emerge una sofferenza perinatale con lieve bradicardia alla nascita e Apgar 5 e 8. Ricoverato alla nascita per ipertono assiale con ipotonia del capo, viene dimesso con diagnosi di Sdr da sofferenza neonatale ad impronta neurologica. L'ipertono persisteva sino ai tre mesi di età.

L'EO all'ingresso mostrava ritardo di accrescimento staturo-ponderale, con lieve ritardo dello sviluppo psico-motorio, ipermobilità articolare con cute iperelastica, ernia inguinale dx, spalle cadenti e facies particolare con micrognazia. Presentava inoltre 2 fossette in regione sacrale.

Dalla valutazione cardiologica si mette in evidenza una stenosi sopralvalvolare aortica, emodinamicamente non significativa.

Tale reperto, insieme alla facies caratteristica, pone il sospetto clinico di sdr di Williams.

Lo studio citogenetico con la FISH (Fluorescent in situ hybridization) utilizzando una sonda specifica per il locus D7S486, per il sospetto di sdr di Williams, mostrano un cariotipo maschile con delezione del gene dell'elastina nel cromosoma 7 (46XY.ish del(7)(9q11.23)(D7S486). Con questa tecnica interi cromosomi o parti di cromosoma possono essere identificati utilizzando sonde di DNA coniugate con sostanze fluorescenti, che riconoscono sequenze complementari a quelle presenti su quel cromosoma o su quel segmento di cromosoma. Questa tecnica si applica solo nei casi in cui il sospetto clinico suggerisca l'opportunità di un approfondimento diagnostico. Tale indagine ci permette di confermare il sospetto clinico.

La sindrome di Williams è caratterizzata da una microdelezione della regione 7q11.23 che contiene il gene dell'elastina (ELN). ELN è una proteina della matrice extracellulare, che forma il 90% della massa elastica dei vasi. Molti di questi pazienti mostrano all'esame cardiografico un restringimento dell'aorta sopralvalvolare, occasionalmente associata alle stenosi periferiche delle arterie polmonari (SPAP), alla (SA) e altro. Il 10% di questi pazienti presenta inoltre prollasso mitralico e il 60% sviluppa ipertensione prima dei 22 anni. E' presente anche ipercalcemia idiopatica.

Il fenotipo è caratteristico con la facies da elfo con labbro superiore prominente, dorso del naso piatto, il naso è rivolto verso l'alto, ipertelorismo, ritardo mentale con comportamento caratteristico da "party" e sviluppo linguistico particolarmente evoluto rispetto alle capacità cognitive generali.

La sindrome di Williams è considerata una "sindrome dei geni contigui", dovuta all'emizigosi dei geni che mappano nel segmento di circa 2cM comunemente deletato.

Tuttavia, mentre da un lato molti sintomi clinici, comprese le cardiopatie, appaiono riconducibili alla delezione di ELN, l'effetto sul fenotipo degli altri geni presenti nella regione non è ancora stato definito.

La peculiarità di questo caso è che all'età di circa 10 anni si mette in evidenza una paresi del facciale sn con lacrimazione occhio sn e deviazione della rima buccale verso dx.. All'età di circa 13aa si mette in evidenza un atteggiamento scoliotico, dorso curvo, torace carenato e ipotrofia del cingolo scapolare.

Un EMG eseguito in questo periodo mette in evidenza segni di sofferenza di tipo assonale sui muscoli gran dentato dx e sn, da verosimile mononeurite multipla.

Dopo circa 2aa si mette in evidenza un netto peggioramento della situazione del cingolo scapolare con notevole ipotrofia del cingolo scapolare sn, scapole alate e impossibilità a sollevare le braccia sul piano orizzontale.

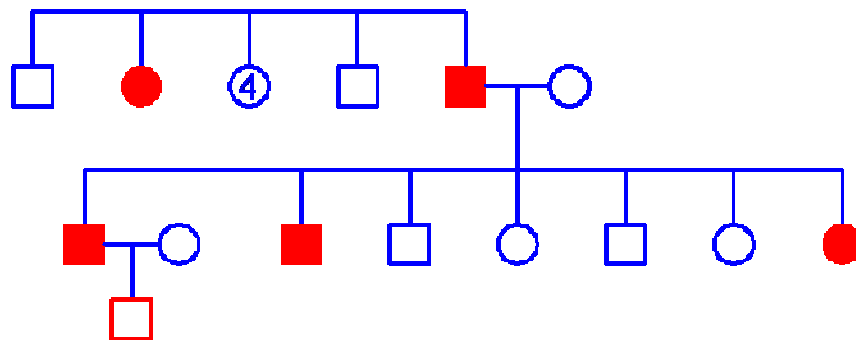
Lo studio del DNA, con il sospetto clinico di DM facio-scapolo-omerale, mette in evidenza un frammento al limite della risoluzione (35-40 Kb) che sembra lievemente ridursi di dimensione dopo doppia digestione enzimatica EcoRI-BnlI. E' importante sottolineare che un frammento di tali dimensioni cade nella fascia di transizione tra quelli associati alla malattia (10-35 Kb) e quelli polimorfici della popolazione normale (35-300 Kb).

Tale dato permette di porre diagnosi di FSH in paz. con Sdr di Williams.

Paziente 44: il paziente, attualmente dell'età di 13 anni, si è presentato presso il nostro reparto circa un anno fa perché il padre è affetto da FSH.

Dall'anamnesi familiare (vedi albero genealogico) emerge FSH nel nonno paterno con esordio all'età di 18-20 aa, con interessamento del cingolo scapolare e zoppia.

Nel padre la sintomatologia è esordita all'età di 32 aa, con debolezza del cingolo scapolare e lievi alterazioni dei muscoli facciali, l'EMG mostrava alterazioni miopatiche.



Dall'anamnesi personale emergono convulsioni febbrili all'età di 18 mesi e nient'altro di rilevante.

All'EO si mette in evidenza una scoliosi dorsale con lieve gibbo a dx, non deficit di forza o segni di ipotonia muscolare. Il valore delle CPK è di poco superiore alla norma con valore di 190 UI/l (VN 30-190). L'EMG è normale.

L'analisi del DNA viene effettuato mediante studio di linkage mediante polimorfismi del DNA (VNTR e microsatelliti) con loci polimorfici D4S139 (sonda pH 30) e D4S171 (sonda Mfd 22) in linkage con la delezione D4Z4 al locus 4q35. Con tale metodica si è messa in evidenza la presenza dell'allele associato alla delezione D4Z4 al locus 4q35.

L'analisi di linkage presenta un rischio di errore diagnostico di circa il 3% dovuto alla frequenza di ricombinazione tra i loci polimorfici e il locus della malattia.

DISCUSSIONE

DISTROFINOPATIE:

Per quanto riguarda le Distrofinopatie la diagnosi è in genere abbastanza agevole nel caso di DM di Duchenne, in quanto il quadro clinico è tipico con esordio nella prima infanzia, andamento progressivo, valore delle CPK che può essere più di dieci volte la norma; il reperto bioptico tipico di Distrofinopatia confermato, anche se non sempre, dalle indagini molecolari con la ricerca delle mutazioni permette di formulare una diagnosi in tempi ragionevoli. Nel caso delle DM di Becker si deve rimanere cauti per quanto riguarda la prognosi, in quanto la clinica può essere molto diversa, includendo distrofinopatie oligo-asintomatiche, con occasionale mioglobinuria o asintomatiche, ma con iperCPKemia. Come abbiamo visto nella nostra casistica, in 6 dei 9 pazienti oligo-asintomatici con conferma bioptica di Distrofinopatia sono state trovate mutazioni puntiformi del gene della distrofina; in due cugini primi (figli di due sorelle) clinicamente silenti è stata trovata una delezione out-frame dell'esone 2 del gene della Distrofina che altera il quadro di lettura dell'mRNA (dato confermato dall'analisi dell'mRNA). Questo fatto rappresenta un'eccezione, e può essere spiegato in due modi: 1) la presenza di un nuovo sito di traduzione ATG a valle della delezione, che permette la trascrizione della proteina (nell'esone 8 sono presenti tre ATG in frame); 2) un'altra possibilità è che ci sia un secondo promoter a valle della delezione, come si verifica in altri geni;

3) la presenza di eventuali splicing alternativi che potrebbero eliminare degli esoni riportando in frame il codice di lettura; alcuni dei casi di non conformità al modello del frame potrebbero essere dovuti ad alterazioni del processo di splicing a causa di mutazioni puntiformi o al processo di “exon skipping” immediatamente a monte o a valle della delezione.

Si vede in letteratura che larghi riarrangiamenti del gene della Distrofina sono stati trovati in circa 2/3 dei pazienti con DMD, con il 60% di delezioni e il 5-10% di duplicazioni.

Approssimativamente, il rimanente 30% dei pazienti con Distrofia muscolare di Duchenne ci si aspetta abbia piccole sostituzioni nucleotidiche, inserzioni o delezioni.

L'analisi del DNA, eseguita mediante PCR della serie di esoni più frequentemente coinvolti in delezioni intrageniche, consente di ottenere molto rapidamente l'informazione relativa alla presenza di una delezione, ma non alla sua ampiezza, che deve essere definita successivamente mediante l'amplificazione degli esoni contigui da entrambi i lati. L'amplificazione PCR semi-quantitativa e l'amplificazione “real-time PCR” sono in grado di individuare, sia con qualche imprecisione, la presenza di duplicazioni intrageniche.

Nella nostra casistica, più del 60% dei pazienti ha mutazioni non definite del gene della distrofina; è difficoltoso identificare singole variazioni del DNA usando le correnti tecniche diagnostiche e questo rappresenta un grosso ostacolo nell'analisi genetica dei pazienti e nel consiglio genetico alle loro famiglie. In questi pazienti la

diagnosi è basata sulla storia clinica e familiare, sull'alto valore delle CPK, e sull'istologia del muscolo con l'analisi immunoistochimica e di immunoblotting.

La mancata individuazione di delezioni o di duplicazioni nel gene distrofina di un soggetto, la cui biopsia mostra alterazioni significative della colorazione immunoistochimica con anticorpi anti-distrofina, pone seri problemi.

Data l'estrema complessità del gene della distrofina, con 79 esoni distribuiti in 2,4 Mb di DNA, e per il fatto che le mutazioni puntiformi possono trovarsi in tutta la lunghezza del gene, un efficiente scanning delle microlesioni è difficoltoso, richiede molto tempo ed è dispendioso. Attualmente in diversi laboratori la ricerca delle mutazioni viene compiuta mediante dHPLC a partire da amplificati lunghi 250-500 nucleotidi. La percentuale di falsi negativi, in indagini standard, è tra il 10% e il 20%, valore che viene considerato accettabile, se si considera che la tecnica è molto rapida, semi-automatica ed applicabile a serie numerose di campioni. Nuove tecniche di scanning delle mutazioni sono la DGGE (semiautomated denaturing gradient gel electrophoresis).

L'individuazione di una mutazione patogena in un soggetto affetto è fondamentale non solo in termini diagnostici, permettendo un più preciso inquadramento, ma anche prognostici (in particolare nei casi di DMB); inoltre, per i nuovi approcci terapeutici correntemente in studio è essenziale conoscere esattamente la mutazione. Una ottimale consulenza genetica alle famiglie con DMD e BMD può essere offerta solo quando la mutazione patogena è stata trovata, questa è un elemento fondamentale per poter affrontare il problema della identificazione di donne eterozigoti imparentate in

linea materna con l'affetto e per poter eventualmente offrire loro la possibilità di una diagnosi prenatale precoce.

Non si può stabilire nella nostra casistica un rapporto genotipo-fenotipo, infatti la delezione più frequentemente trovata nei nostri pazienti, cioè quella degli esoni 47-52 (regione hot spot) si accompagna a quadri clinici non distinguibili da quelli nei quali non è stata trovata alcuna delezione.

E' stata proposta la Terapia cortisonica a tutti i nostri pazienti con DM di Duchenne, ma solo 6 hanno attuato un trial terapeutico con protocollo Dubowitz, cioè la somministrazione di prednisolone (Deltacortene) alla dose di 0,75 mg/Kg/die nei primi 10 gg del mese; tutti i pazienti riferiscono un miglioramento del quadro clinico, con aumento della forza muscolare nel primo periodo del trattamento ma, se andiamo a guardare l'età della perdita dell'autonomia deambulatoria, non vi sono sostanziali differenze tra i nostri pazienti che hanno assunto la terapia cortisonica da quelli che non l'hanno assunta, con un'età media di circa 11 anni, ad eccezione di un caso che ha assunto la terapia e che ha continuato a deambulare sino all'età di 15 anni .

Al momento attuale l'unico mezzo veramente in grado di ritardare l'evoluzione clinica è legato alla medicina riabilitativa che, pur non riuscendo a ottenere trattamenti eclatanti, migliora parzialmente la funzionalità motoria prevenendo o ritardando l'insorgenza di ulteriori problemi funzionali. Il trattamento deve essere particolarmente diretto verso la prevenzione delle deformità e la promozione della deambulazione.

Per quanto riguarda la DM di Becker, si vede che il quadro clinico è molto variabile e che molti dei nostri pazienti sono oligo-asintomatici. In questi pazienti, un aiuto dal punto di vista prognostico può essere dato dalle informazioni sui familiari soprattutto nel caso si trovi la mutazione. Abbiamo il caso di un paziente oligosintomatico con delezione in frame del gene della distrofina negli esoni 48-49-50-51, il cui nonno materno con la stessa delezione ha attualmente 86 anni, ed è stato un agricoltore sino a pochi anni fa, senza nessun sintomo di deficit muscolare o cardiologico.

Anche nei pazienti con DM di Becker è, comunque, necessario un buon follow-up, per monitorare le eventuali complicanze e, quando necessario un trattamento riabilitativo, per migliorare al massimo la forza muscolare ed evitare le contratture. Fondamentale in questi pazienti un attento monitoraggio cardiaco, anche se nessuno dei nostri pazienti con DM di Becker ha ancora sviluppato cardiomiopatia.

DM DEI CINGOLI:

Nel campo delle distrofie muscolari dei cingoli, da quanto emerge dalla descrizione dei casi clinici, risulta a volte complicato porre una diagnosi precisa; fino a qualche anno fa, infatti, prima dell'avvento della genetica molecolare, la diagnosi era semplicemente clinica, in base alla localizzazione del deficit di forza muscolare; oggi, grazie ai progressi ottenuti in campo biochimico e genetico, risulta necessario individuare precisamente il tipo di LGDM mediante analisi immunoistochimiche e genetiche. Una nuova strategia per la ricerca delle mutazioni nelle DM dei cingoli è data dall'impiego combinato di metodi immunoistochimici ed analisi di DNA.

Ciascuna forma è relativamente rara, ma, come abbiamo visto, si riscontrano concentrazioni di casi in specifiche popolazioni o insediamenti umani.

Il tasso di mutazione per le DM dei cingoli non è mai elevato ed i difetti riguardano sostituzioni di singoli nucleotidi o duplicazioni di piccole dimensioni.

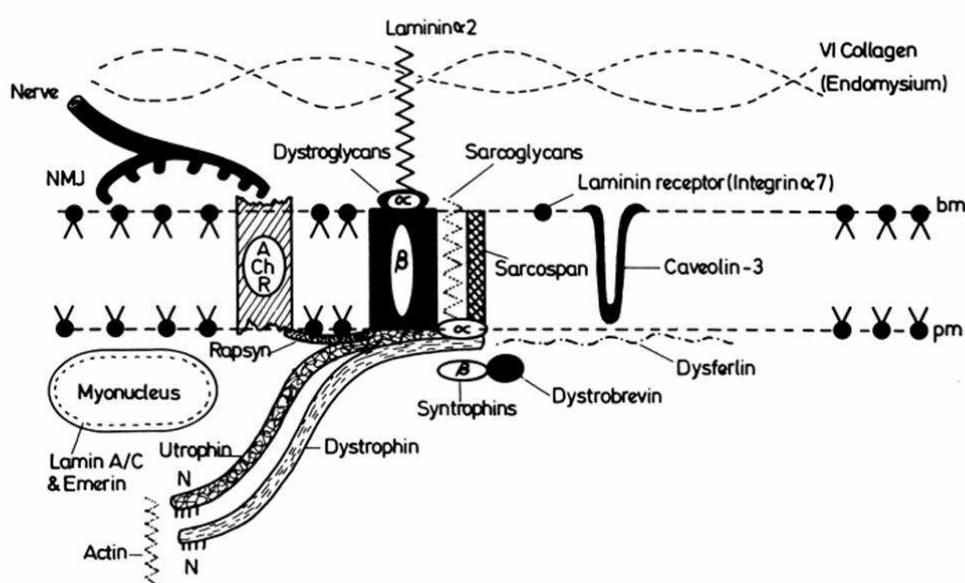


Fig. 3. Diagrammatic representation of various proteins involved directly or indirectly in different forms of muscular dystrophy. The precise relationship of these proteins to each other is not yet entirely clear. bm, basement membrane (basal lamina); pm, plasma membrane (plasmalemma); NMJ, neuromuscular junction; AChR, acetylcholine receptor.

La ricerca delle mutazioni è però un procedimento lungo, laborioso e costoso e può non fornire il risultato atteso.

Inoltre, come abbiamo visto, l'eterogeneità è veramente notevole, anche per quanto riguarda la funzione dei prodotti dei geni mutati; in alcune forme il difetto riguarda i sarcoglicani del complesso transmembrana che lega la distrofina, in altre il difetto riguarda proteine del sarcomero (myotilina, disferlina, telethonina), un enzima citoplasmatico (calpaina) e persino una proteina dell'involucro nucleare (lamina).

In alcuni casi il ritrovamento di una mutazione non è sufficiente per la diagnosi, in quanto vi sono condizioni all'eliche; discutiamo infatti tre casi che mostrano questa caratteristica.

Il primo caso (paziente 34) presenta una **mutazione del gene della LAMINA A/C** sul **cromosoma 1q21.2-q21.3** per la quale si possono considerare due forme alleliche: la LGDM1B e la variante autosomica dominante della distrofia muscolare omero peroneale di Emery-Dreyfuss.

La Distrofia muscolare di Emery-Dreifuss è caratterizzata dalla presenza della triade clinica di:

- Contratture precoci dei flessori dei gomiti, dei tendini di Achille e degli estensori del collo risultando in una limitazione della flessione del collo, seguita dalla limitazione dell'estensione dell'intera spina dorsale.
- Progressivo e lento deterioramento con debolezza dei muscoli omero-peroneali e scapolo-peroneali negli stadi precoci.
- Disturbi cardiaci con difetti della conduzione e aritmie: fibrillazione atriale, flutter, aritmie ventricolari e sopraventricolari, blocco atrio-ventricolare.

L'EMG usualmente mostra alterazioni miopatiche, anche è stato descritto un pattern neuropatico. La concentrazione delle CPK sieriche è normale o lievemente aumentata, mentre la biopsia muscolare mostra alterazioni distrofiche miopatiche non specifiche, includendo variazione del calibro delle fibre, aumento dei nuclei interni, aumento del tessuto connettivo endomisiale e fibre necrotiche.

I due geni conosciuti essere associati con EDMD sono EMD che codifica per l'emerina, e LMNA che codifica per la lamina A e C.

- Le mutazioni del gene EMD causano XL-EDMD, e nel 95% dei casi sono mutazioni nulle (larghe delezioni, mutazioni nonsense, piccole delezioni o inserzioni, e mutazioni del sito di splicing) che inducono uno frameshift e un prematuro arresto della trascrizione che porta ad assenza dell'emerina. Nel 5% dei casi le mutazioni di EMD sono missense e delezioni in-frame e portano a una diminuita espressione di emerina o a una espressione normale o a una proteina non funzionale.
- Le mutazioni del gene LMNA causano AD-EDMD e AR-EDMD: molte mutazioni sono mutazioni missense con normale espressione della lamina A/C. Sono state osservate piccole delezioni o inserzioni, mutazioni non senso e mutazioni del sito di splicing che inducono uno frameshift con prematuro arresto della trascrizione. La forma AR di EDMD è stata descritta in un solo individuo con severa distrofia muscolare.

Il gene LMNA codifica per la Lamina A e C con splicing alternativi. La lamina A/C forma parte della lamina nucleare, situata tra lo strato fibroso nucleoplasmico e la membrana nucleare interna. Interagisce con la cromatina e con altre proteine della membrana nucleare interna per i vari siti di legame (lamina proteine associate LAPs ed emerina).

.

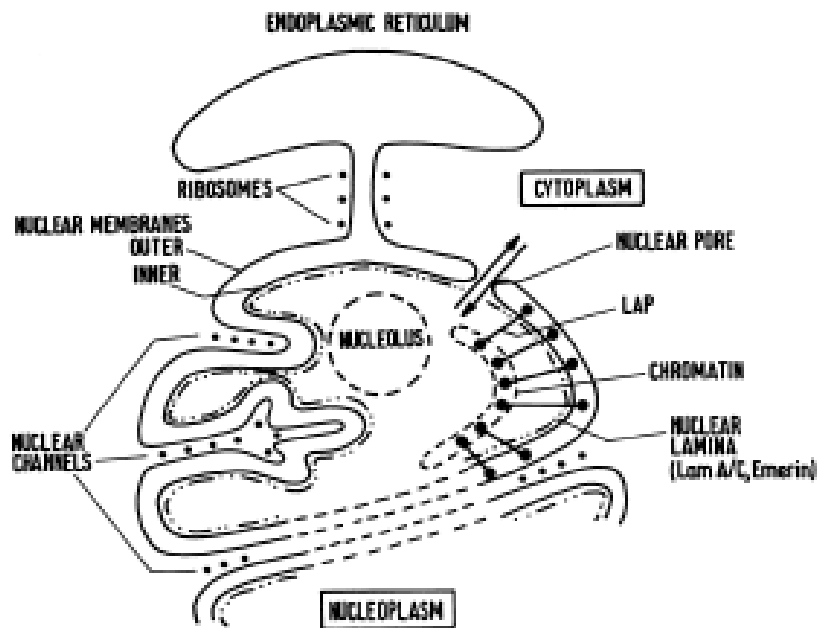


Fig. 7. Arrangement of the proteins associated with the nuclear lamina
(LAP, lamina associated protein).

I disordini causati dalla mutazione di LMNA sono chiamati “laminopatie” ed includono:

- Disordini dei muscoli striati, come la LGMD1B una forma di distrofia muscolare dei cingoli autosomica dominante associata a difetti di conduzione atrio-ventricolare; questa forma può non essere considerata un disordine veramente allelico alla EDMD in quanto vi è un overlap tra i due fenotipi. Altri disordini dei muscoli scheletrici, associati a mutazioni del gene della lamina, sono la CMD1A o DCM-CD una forma di cardiomiopatia AD con difetti di conduzione cardiaca; una forma di cardiomiopatia dilatativa con aneurisma apicale del ventricolo sinistro senza blocco atrio-ventricolare o precoce fibrillazione atriale; una forma

di miopatia dei quadricipiti AD associata a cardiomiopatia dilatativa e difetti di conduzione cardiaca .

- Disordini dei nervi periferici, CMT2B1, una forma AR di disturbo assonale Charcot-Marie associata alla mutazione R298C.
- Disordini del tessuto adiposo, una forma familiare AD di lipodistrofia parziale (FPLD) causata nella maggioranza dei casi da mutazioni del codone R482 indotte da diverse sostituzioni aminoacidiche.
- Disordini che coinvolgono diversi tessuti

Le mutazioni di LMNA non mostrano una chiara correlazione clinica tra il genotipo e il fenotipo: è stata osservata una marcata variabilità intra e interfamiliare per la stessa mutazione di LMNA; per esempio, nella stessa famiglia la stessa mutazione può determinare AD-EDMD, LGMD1B o isolata DCM-CD.

Le due forme di Distrofia muscolare di Emery-Dreyfuss AD e XL hanno un involuzione neuromuscolare e cardiaca simile, ma non identica: le contratture compaiono precocemente nella prima infanzia in entrambe le forme, ma mentre nella forma XL sono il primo segno, nella forma AD compaiono dopo l'inizio della debolezza muscolare. La debolezza muscolare è lentamente progressiva e il deterioramento muscolare è usualmente lento nelle prime tre decadi di vita dopo le quali diventa più rapido. La perdita dell'autonomia deambulatoria può accadere nella forma AD, mentre è rara nella forma XL. Per quanto riguarda l'interessamento cardiaco, nella forma AD il rischio di tachiaritmia ventricolare e cardiomiopatia

dilatativa che si manifesta con dilatazione e disfunzione del ventricolo sn è più alta che nella forma XL.

Nella forma di Distrofia muscolare dei cingoli tipo 1B vi è una lenta, progressiva distrofia dei cingoli, con disturbi di conduzione cardiaca atrio-ventricolare e cardiomiopatia dilatativa, età correlati in assenza di contratture precoci.

Sono state descritte 52 differenti mutazioni del gene della lamina, nella maggior parte missense. 32 differenti mutazioni sono state viste associate alla forma di AD-EDMD, 4 mutazioni sono state descritte come causa di LGMD1B, 11 sono state associate a cardiomiopatia dilatativa (CMD1A), e 7 a lipodistrofia parziale familiare, senza sintomi cardiaci o con cardiomiopatia dilatativa e difetti di conduzione. Molto recentemente, una quinta laminopatia con mutazione di LMNA è stata descritta associata a sintomi neurologici che determinano una forma recessiva di neuropatia assonale (Charcot-Marie-Tooth tipo II). In aggiunta, una mutazione in LMNA è stata vista responsabile di una forma di EDMD-AR.

L'identificazione di 3 mutazioni specifiche del gene della Lamina A/C in pazienti con LGMD1B dimostra che LGMD1B e AD-EDMD sono disordini allelici.

Come abbiamo visto, AD-EDMD è un disordine caratterizzato da contratture precoci dei tendini di Achille, gomiti e muscoli cervicali, deterioramento lento e progressivo con distribuzione della debolezza muscolare a livello omero-peroneale, e cardiomiopatia con difetti di conduzione. In contrasto, la LGMD1B si presenta con debolezza lentamente progressiva del cingolo pelvico, con solo tardivo interessamento dei muscoli omerali e risparmio dei muscoli peroneali e tibiali. Le

contratture precoci del collo, della colonna, dei gomiti e dei tendini di Achille, caratteristiche salienti nella EDMD, sono assenti nei pazienti con LGMD1B.

Tuttavia, esiste una marcata variabilità inter e intra-familiare nella espressione clinica delle mutazioni di LMNA, la stessa mutazione può essere alla base di entrambi i difetti; ciononostante, il fenotipo differente è dovuto a fattori addizionali, sia genetici che non genetici, con il punto verso un possibile ruolo significativo di geni modificatori nel corso del disturbo.

Gli stessi fattori sono stati postulati per le condizioni legate al cromosoma 2p, come vedremo più avanti, dal momento che entrambi i fenotipi di LGMD2B e Miyoshi myopathy segregano con lo stesso aplotipo e hanno mutazioni del gene della Disferlina. Tuttavia, i pazienti con LGMD2B si presentano con una miopatia prossimale, mentre quelli con Miyoshi myopathy manifestano in maniera predominante deterioramento e debolezza dei muscoli distali. In due famiglie sono stati trovati entrambi i fenotipi.

Nel nostro paziente (paziente 34) il quadro clinico presenta alcune caratteristiche per cui vale la pena di discutere: all'ingresso del piccolo, all'età di tre anni, era presente un'ipotonìa muscolare generalizzata con difetto del cingolo pelvico messo in evidenza da un segno di Gowers positivo. Tali reperti, soprattutto quello bioptico, hanno fatto propendere per una diagnosi provvisoria di DM congenita, anche se l'assenza di contratture ed il quadro clinico e istologico più lieve lasciavano qualche perplessità sulla diagnosi definitiva.

A un nuovo ingresso, dopo circa 15 anni, permaneva il difetto del cingolo pelvico con andatura anserina, ma all'età di circa 11 anni comparivano contratture dei gomiti e del tendine di Achille di dx, con ipotrofia dei muscoli della gamba, nello stesso periodo è comparso anche un difetto del cingolo scapolare, con impossibilità a sollevare le braccia, ipotrofia dei muscoli delle braccia e del pettorale con assenza dei riflessi. Le CPK permanevano aumentate da valori di 640 a valori di 748 U/l.

Il prevalente interessamento della muscolatura dei cingoli, con il suo esordio con debolezza del cingolo pelvico, potrebbero far pensare a una miopatia dei cingoli, ma la presenza di contratture dei gomiti e del tendine di Achille, con l'interessamento dei muscoli peroneali, fa propendere la diagnosi verso una forma di **EDMD-AD**.

Questa condizione può avere inizio nella prima infanzia e sono stati riportati bambini con quadro severo che diventavano sintomatici nel secondo anno di vita, con difficoltà nella deambulazione per la combinazione di debolezza prossimale e distale con frequenti cadute. Questi bambini hanno anche un deterioramento significativo dei muscoli omero-peroneali e si possono presentare con accorciamento del tendine di Achille; per la forma LGDM l'età d'inizio varia da 4 a 38 anni, e le maggiori caratteristiche sono il deterioramento simmetrico, con debolezza dei muscoli del pelvico che causa una moderata invalidità nella sesta o settima decade. La debolezza degli arti superiori è osservata all'età di circa 30 anni.

L'analisi della sequenza del DNA ha evidenziato la presenza di una mutazione in eterozigotità in posizione: Esone 4: 788T/C CTG**788**CCG (Leu263Pro); è stato inoltre evidenziato un polimorfismo (SPNs) in eterozigotità : Esone 10: 1698 **C/T**.

A

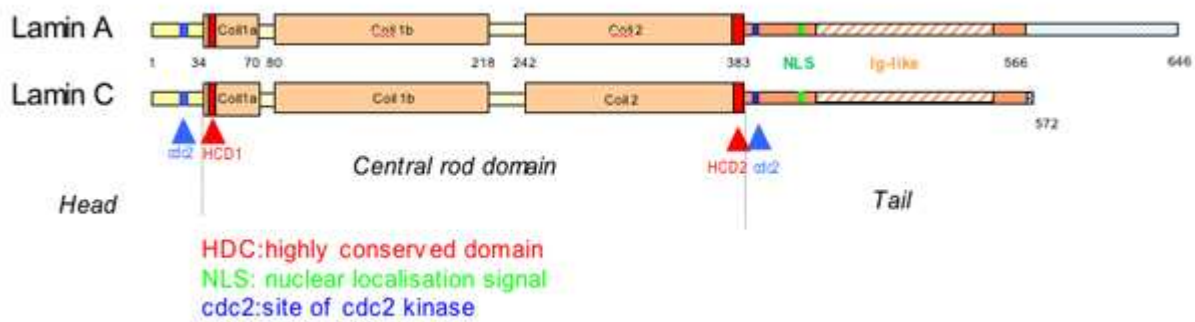
Diagram illustrating the domain organization of the lamin A protein. The protein is divided into three main regions: Amino-terminal head domain (exons 1-6), Central rod domain (exons 7-9), and Carboxy-terminal tail domain (exons 10-12). Key features include the Nuclear location signal (NLS) in exon 7, the Splice site lamin A/lamin C in exon 10, and the CAA box for isoprenylation of prelamin A in exon 12.

B

Diagram illustrating the domain organization of the progerin protein, which is identical to lamin A but lacks the CAA box. Mutations are indicated by arrows pointing to specific exons and amino acid positions. Mutations in the head domain include O6X, Y45C, R50P, R60G, and I116dE. Mutations in the rod domain include T150P, N195K, E203G, I208dK, Q294P, R336Q, R358K, R366K, R377H, R453W, E456K, W520S, E527P, T528K, and I530P. Mutations in the tail domain include R571S, R582H, R644C, G465D, I397delA, K465N, and R482W.

126

for the isoprenylation of prelamin A are indicated by arrows. Black areas indicate the sequences identical for both lamin A and lamin C. Regions coding for lamin C specific amino acids are indicated by vertical stripes. Regions coding for prelamin A specific amino acids are indicated by diagonal stripes. The 3prime; untranslated region is shaded white. **B:** Linear representation of LMNA mutations, their location, and the corresponding phenotype. Abbreviations used are: DCM, dilated cardiomyopathy; EDMD, Emery-Dreifuss muscular dystrophy; LGMD1B, limb-girdle muscular dystrophy; FPL, familial partial lipodystrophy.



Le lamine A e C sono proteine di massa molecolare di 74 kD e 65 kD, rispettivamente. L'analisi di sequenza rivela che nella specie umana le lamine A e C sono identiche per i primi 566 aminoacidi; la pre-lamina A contiene in più 98 aminoacidi che corrispondono approssimativamente a 9 kD, in posizione C-terminale, dei quali gli ultimi 18 vengono rimossi da enzimi proteolitici per produrre la lamina A matura. La lamina C ha unicamente 6 aminoacidi C-terminali. Entrambe le lamine A e C contengono di 360 residui alfa-elica con omologia che corrisponde al rod-dominio alfa-elica caratteristica strutturale dei filamenti intermedi delle proteine. Le lamine A e C derivano da splicing alternativi dello stesso gene e sono componenti dei filamenti intermedi, contribuiscono all'integrità strutturale della membrana nucleare e forniscono un supporto meccanico per il nucleo.

I meccanismi patogenetici da difettosa Lamina sono dati da :

1. Ipotesi strutturale: il nucleo con difettosa Lamina è più fragile e le forze esercitate durante la contrazione muscolare o nel lavoro cardiaco portano a rottura della membrana nucleare difettosa di Lamina con conseguente morte cellulare.
2. Ipotesi sull'espressione genica: la Lamina influenza l'organizzazione dell'eterocromatina che generalmente è silente, ma le alterazioni della Lamina possono portare a cambiamenti nell'espressione genica ed ad effetti dannosi.

TABLE 12. List of LMNA Mutations

Exon	Nucleotide change ^a	Effect on coding sequence ^b	Mutation	Phenotype	Reference
Missense mutations					
1	134 A→G	Y45C	Try45Cys	EDMD	Bonne et al. [2000]
1	149 G→C	R50P	Arg50Pro	EDMD	Bonne et al. [2000]
1	178 C→G	R60G	Arg60Gly	DCM	Fatkin et al. [1999]
1	188 T→G	I63S	Ile63Ser	EDMD	Bonne et al. [2000]
1	254 T→G	L85R	Leu85Arg	DCM	Fatkin et al. [1999]
2	448 A→C	T150P	Thr150Pro	EDMD	Felice et al. [2000]
3	585 C→G	N195K	Asn195Lys	DCM	Fatkin et al. [1999]
3	608 A→G	E203G	Glu203Gly	DCM	Fatkin et al. [1999]
4	644 C→T	H222Y	His222Tyr	EDMD	Di Barletta et al. [2000]
4	645 A→C	H222P	His222Pro	EDMD	Bonne et al. [2000]
4	695 G→A	G232E	Gly232Glu	EDMD	Bonne et al. [2000]
4	746 G→A	R249Q	Arg249Gln	EDMD	Di Barletta et al. [2000]
5	881 A→C	Q294P	Gln294Pro	EDMD	Bonne et al. [2000]
6	1007 G→A	R336Q	Arg336Gln	EDMD	Di Barletta et al. [2000]
6	1072 G→A	E358K	GLu358Lys	EDMD	Bonne et al. [2000]
6	1112 T→A	M371K	Met371Lys	EDMD	Bonne et al. [2000]
6	1130 G→A	R377H	Arg377His	LGMD1B	Muchir et al. [2000]
6	1157 G→A	R386K + frameshift	Arg386Lys,FS 386	EDMD	Bonne et al. [2000]
7	1357 C→T	R453W	Arg453Trp	EDMD	Bonne eal.[1999]DiBarletta
7	1395 C→A	N456K	Asn456Lys	EDMD	Bonne et al. [2000]
8	1394 G→A	G465D	Gly465Asp	FPL	Speckman et al. [2000]
8	1406 T→C	I469T	Ile469Thr	EDMD	Di Barletta et al. [2000]
8	1444 C→T	R482W	Arg482Trp	FPL	Shackleton et al. [2000]
8	1445 G→A	R482Q	Arg482Gln	FPL Cao et al. [2000];	Shackleton et
8	1445 G→T	R482L	Arg482Leu	FPL	Shackleton et al. [2000]
8	1458 G→C	K486N	Lys486Asn	FPL	Shackleton et al. [2000]
8	1458 G→T	K486N	Lys486Asn	FPL	Shackleton et al. [2000]
9	1559 G→C	W520S	Trp520Ser	EDMD	Bonne et al. [2000]
9	1580 G→C	R527P	Arg527Pro	EDMD	Bonne et al. [1999]DiBarletta
9	1583 C→A	T528K	Thr528Lys	EDMD	Di Barletta et al.[2000];Bonne
9	1589 T→C	L530P	Leu530Pro	EDMD	Bonne et al. [1999]
10	1711 C→A	R571S	Arg571Ser	DCM	Fatkin et al. [1999]
11	1745 G→A	R582H	Arg582His	FPL	Speckman et al. [2000]
11	1930 C→T	R644C	Arg644Cys	DCM	Genschel et al. [2000];
Nonsense mutations					
1	16 C→T	Q6X	Gln6Stop	EDMD	Bonne et al. [1999]
Deletions					
1	334-336delGAG	In-frame deletion of codon 112	112delGlu	EDMD	Bonne et al. [2000]
3	622-624delAAG	In-frame deletion of codon 208	208delLys	LGMD1B	Muchir et al. [2000]
4	781-783delAAG	In-frame deletion of codon 261	261delLys	EDMD	Felice et al. [2000]
6	960delT	Frameshift and stop codon	FS 321	DCM	Brodsky et al. [2000]
8	1397delA	Frameshift and stop codon	FS 466	DCM	Genschel et al. [2000]
Splice site mutations					
9	1608+5G→C	3' splice site of exon 9		LGMD1B	Muchir et al. [2000]
Polymorphisms					
5	861 T→C	A287A	Ala287Ala		Speckman et al. [2000];
7	1338 T→C	D446D	Asp446Asp		Speckman et al. [2000]
10	1698 C→T	H566H	His566		His Genschel

^aNucleotide numbers refer to the cDNA sequence (Genebank Accession No. #L12399, #L12400, #L12401).

^bThe first codon of the initiation methionine = codon No. 1. .

DCM, dilated cardiomyopathy; EDMD, Emery-Dreifuss muscular dystrophy; LGMD1B, limb-girdle muscular dystrophy; FPL, familial partial lipodystrophy

LMNA

Normal allelic variants: An incomplete list of normal allelic variants is available on Leiden Muscular Dystrophy pages[©] (<http://www.dmd.nl/>).

Table 13. Normal LMNA Allelic Variants		
cDNA Change	Protein	Reference
51C→T	S17S	Sebillon et al 2003
357C→T	R119R	
438C→T	A146A	Bonne, unpublished data
612G→A	L204L	Eriksson et al 2003
645G→T	L215L	Bonne, unpublished data
861T→C	A287A	Speckman et al 2000
1028G→A	R343Gln	Vytopil et al 2002
1098G→A	K366K	Sebillon et al 2003
1299C→T	H433H	
1338T→C	D446D	Speckman et al 2000
1580G→A	R527H	Novelli et al 2002
1584G→A	T528T	Bonne, unpublished data
1698C→T	H566H	Genschel & Schmidt 2000
1761G→A	L587L	Bonne, unpublished data
1930C→T	R644C	Speckman et al 2000

Non è chiaro perchè mutazioni nell'emerina (anch'essa proteina nucleare) o mutazioni nelle lamine A/C causano AD-EDMD, come anche DCM-CD, LGDM1B e FPLD. Non pare nemmeno esserci una correlazione tra la localizzazione delle mutazioni nel gene LMNA e la severità clinica del disturbo, ma, al contrario,

identiche mutazioni possono condurre a sostanziali differenze nella severità del fenotipo.

Il coinvolgimento di due proteine nucleari, emerina e lamina A/C, in EDMD solleva una nuova questione sul meccanismo di degenerazione delle cellule muscolari, che è differente da quello delle distrofie muscolari da difetto delle proteine di membrana.

Il secondo caso (paziente 35) presenta una disferlinopatia, e anche qua ci si pone il problema della diagnosi differenziale tra le due varianti alleliche, la distrofia muscolare dei cingoli tipo 2B (LGMD2B), e la Miyoshi myopathy.

Come abbiamo visto precedentemente, entrambe esordiscono in età giovanile ma, la Miyoshi myopathy interessa primariamente la muscolatura distale, mentre la LGMD2B interessa primariamente la muscolatura prossimale.

Comparando la LGDM2B e la MM, si nota che esiste una concordanza tra l'età di inizio e il livello di elevazione delle CPK. I due quadri clinici differiscono definitivamente dai primi sintomi descritti, nei pazienti con LGDM2B compare la debolezza dei muscoli prossimali degli arti inferiori, mentre nei pazienti con MM debolezza dei muscoli distali degli arti inferiori. Il pattern di interessamento muscolare negli stadi precoci del disturbo differisce anche riguardo all'assenza di interessamento dei muscoli anteriori delle gambe nella LGDM2B mentre è presente nella MM. L'interessamento dei muscoli prossimali della coscia è molto più prominente nei pazienti con LGDM2B che nei pazienti con MM. La MM può avere un decorso clinico più rapido, con circa un terzo dei pazienti che diventano

dipendenti dalla sedia a rotelle dopo 10 anni dall'inizio della sintomatologia, mentre mai i pazienti con LGDM2B diventano dipendenti così precocemente.

Il locus per la LGDM2B e la MM si localizza nella stessa area del cromosoma 2p13, queste due forme di distrofia muscolare sono considerate alleliche, entrambe le forme sono ereditate in maniera autosomica recessiva.

Sono state riportate famiglie in cui la stessa mutazione determina entrambi i fenotipi . Identiche mutazioni possono, infatti, produrre più di un fenotipo miopatico.

Le differenze nel fenotipo sono dovute a fattori modificatori addizionali, si postula la presenza di geni modificatori che contribuiscono alla presentazione del fenotipo clinico nei pazienti con disferlinopatia.

Nella nostra paziente il riscontro casuale dell'elevazione delle CPK, costante nelle Disferlinopatie, ha permesso di effettuare la diagnosi in epoca pre-sintomatica, ma pone delle difficoltà, soprattutto nella comunicazione alla famiglia sulla possibile evoluzione della malattia. Molti pazienti descritti, come nel nostro caso, sono dei bravi atleti nella prima decade di vita e partecipano attivamente allo sport nel periodo adolescenziale; i primi sintomi, infatti, compaiono dopo la seconda metà della seconda decade o più tardi.

Nei pazienti con LGDM2B l'analisi accurata della distribuzione della debolezza muscolare, combinata con l'analisi della marcia, mostra delle caratteristiche distintive che sono chiamate "disferlin gait" che sono chiaramente differenti da quelle osservate nelle distrofinopatie e nelle sarcoglicanopatie.

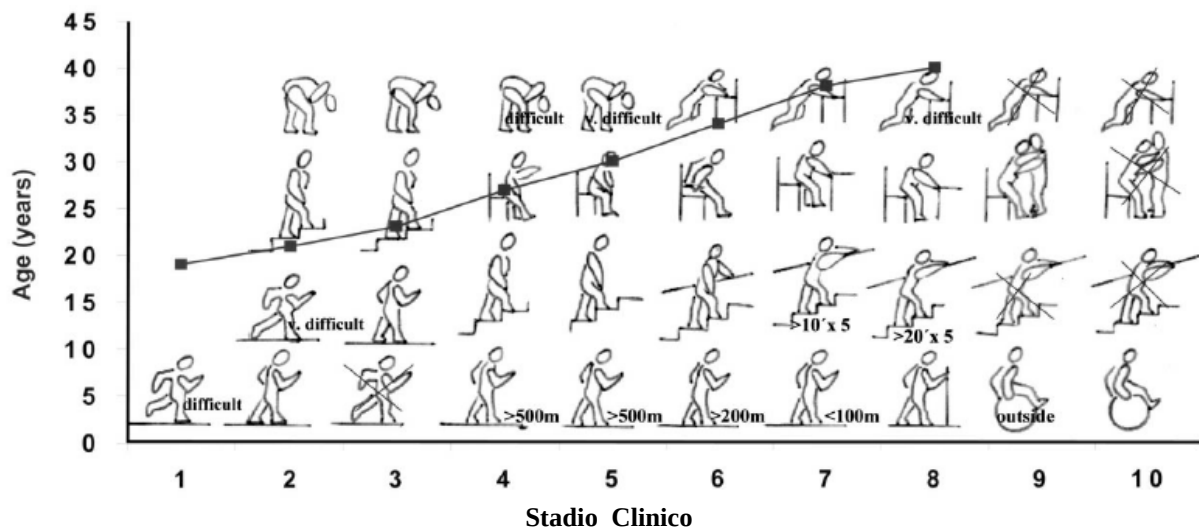


Fig. 9. Progression of muscle weakness in patients with LGMD2B (dysferlinopathy) on the lower limbs. Functional scale according Walton (1981) modified by us.

Grade 1 ± Walks normally. Unable to run freely. Grade 2 ± Detectable defect in posture or gait. Almost unable to run. Climbs stairs with slight difficulty. Rises from floor with slight Gower's sign. Grade 3 ± Unable to run. Dysferlin gait, walks at least 2 km. Climbs stairs supporting one hand on thigh. Rises from floor with slight Gower's sign. Grade 4 ± Slight dysferlin gait, walks .500 m. Climbs stairs supporting one hand on thigh. Rises from chair supporting on one thigh. Rises from floor with moderate Gower's sign. Grade 5 ± Slight dysferlin gait, walks .500 m. Climbs stairs supporting both hands on thigh. Rises from chair supporting on both thighs. Rises from floor with severe Gower's sign. Grade 6 ± Moderate dysferlin gait, walks .200 m. Climbs stairs upright with one hand on railing. Rises from chair supporting on arms of chair. Rises from floor, supporting on objects. Grade 7 ± Severe dysferlin gait, walks .100 m. Climbs stairs clinging to railings with both hands. Rises from chair, supporting on table. Rises from floor, supporting on objects. Grade 8 ± Severe dysferlin gait, walks with cane. Climbs a few steps clinging to railings with both hands. Rises from chair, supporting on table. Rises from floor, supporting on objects. Grade 9 ± Uses wheelchair outside. Unable to climb stairs. Rises from chair only with assistance from persons. Unable to rise from the floor. Grade 10 ± Wheelchair on.

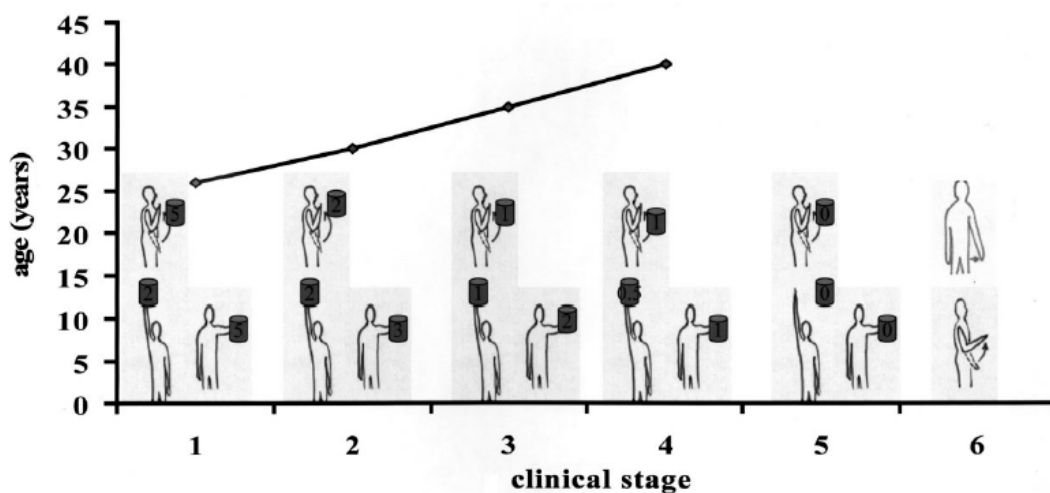


Fig. 2. Progression of muscle weakness in patients with LGMD2B (dysferlinopathy) on the upper limbs. Functional scale created by us. Grade 1 – Flexes arm when carrying a 5 kg weight. Can abduct arm at 90° when carrying a 5 kg weight, and at 180° when carrying a 2 kg weight. Grade 2 – Flexes arm when carrying a 2 kg weight. Can abduct arm at 90° when carrying a 3 kg weight, and at 180° when carrying a 2 kg weight. Grade 3 – Flexes arm when carrying a 1 kg weight. Can abduct arm at 90° when carrying a 2 kg weight, and at 180° when carrying a 1 kg weight. Grade 4 – Flexes arm when carrying a 1 kg weight. Can abduct arm at 90° when carrying a 1 kg weight and at 180° when carrying a 0.5 kg weight. Grade 5 – Flexes arm, unable to carry weight. Can abduct arm at 90° and at 180 degrees, unable to carry weight. Grade 6 – Flexes arm without weight to 150 degrees. Can not abduct arm more than 45°.

Il gene della disferlina (DYSF) mappato in posizione 2p13.3-p13.1, contiene 55 esoni, sparsi in oltre 150 kB del DNA.

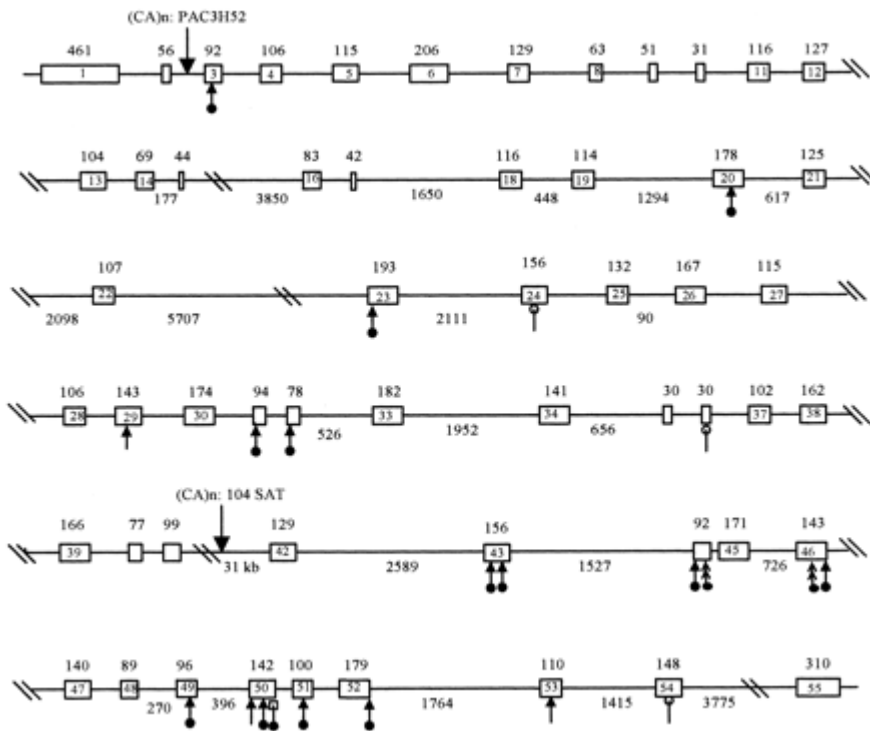


Figure 11. The dysferlin gene encompasses 55 exons, indicated by numbered open boxes. The numbers above each box indicate the size of the exons (bp); the numbers below some introns designate the size of the respective introns (bp). The large, down-pointing arrows between exons 2 and 3 and exons 41 and 42 mark the location of polymorphic markers PAC3H52 and 104 SAT (see text). Mutations are indicated by smaller symbols located beneath the corresponding exons. Symbols with arrows denote mutations that cause either Miyoshi myopathy (MM) (single arrows) or LGMD2B (double arrows). Open circles denote mutations that cause both MM and LGMD2B; open squares denote distal myopathy with onset in the tibialis anterior muscles (DMAT). Frameshift/stop and missense mutations are indicated by symbols with simple stems (frameshift/stop) and stems with closed circles (missense).

La disferlina, la proteina prodotta dal gene, è una nuova molecola senza omologia con altre proteine conosciute nella specie umana.

La funzione della disferlina non è conosciuta, ma può essere un mediatore calcio-mediato che induce gli eventi di fusione di membrana nelle cellule muscolari.

Lo studio della disferlina si può effettuare inizialmente con metodi immunoistochimici nella biopsia muscolare, con anticorpi monoclonali, successivamente con western blot del muscolo scheletrico; nei soggetti normali si evidenzia un polipeptide di circa 230 kDa, mentre nei pazienti con disferlinopatia si mette in evidenza una banda corrispondente alla disferlina, ridotta o assente; lo studio delle mutazioni è un passo successivo per la conferma diagnostica e molecolare. L'analisi di tessuti umani fetali dimostra che la disferlina è espressa nei primissimi stadi di sviluppo, la disferlina, inoltre, è espressa all'inizio della differenziazione degli arti. La perdita di disferlina in questo tempo critico può contribuire al pattern di interessamento muscolare, più tardi nello sviluppo, con l'inizio della distrofia muscolare primariamente nei muscoli prossimali o distali.

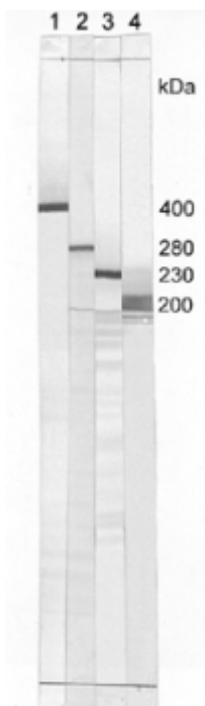


Figure 12. Estimation of molecular mass. Four strips from a blot of normal control muscle labelled with antibodies to dystrophin (lane 1, band at ~400 kDa), filamin (lane 2, band at ~280 kDa), dysferlin (lane 3, band estimated to be at ~230 kDa by comparison with the others) and myosin heavy chain (lane 4, band at ~200 kDa).

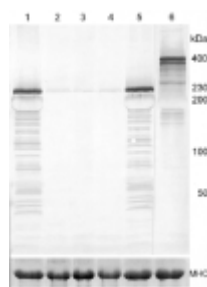


Figure 13. Western blot of human skeletal muscle biopsies. Lanes 1 and 6, normal control subjects (amputated leg muscles); lane 2, deltoid sample from a Palestinian LGMD2B patient linked to chromosome 2p13 (unknown mutation); lane 3,

quadriceps sample from a Palestinian Arab LGMD2B patient (homozygous frameshifting mutation); lane 4, deltoid sample from a Libyan Jewish patient with LGMD2B (homozygous frameshifting mutation); lane 5, quadriceps sample from a patient with genetically confirmed LGMD2A. Lanes 1-5 were labelled with 1/300 anti-dysferlin antibody, NCL-hamlet. Lane 6 was labelled with 1/50 Dy4/6D3 to an epitope in the rod domain of dystrophin. The lower panel shows the corresponding myosin heavy chain (MHC) bands from the Coomassie blue-stained gel, and the outline of these bands can be seen at 200 kDa in lanes 1, 5 and 6. The MHC bands on the post-blotted gel are used to indicate how much muscle protein, as opposed to fat and fibrous connective tissue, is loaded in each lane. Densitometric estimates of dysferlin/myosin abundance were expressed as a percentage of the normal sample in lane 1: lane 2, 1.5%; lane 3, 1.8%; lane 4, 4.7%; lane 5, 100.

Nella nostra paziente, la ridotta/assente espressione della disferlina all'immuno-istochimica, poneva già il sospetto di una disferlinopatia, confermata in seguito dall'analisi di Western blot che ha evidenziato una banda corrispondente alla disferlina di peso molecolare più basso del normale; lo studio del gene della disferlina ha identificato una mutazione eterozigote nella sequenza codificante e per un ulteriore studio sull'RNA messaggero sarebbe necessario un altro campione di muscolo, ma in questo momento la famiglia vuole ancora attendere; l'assenza di alcuna sintomatologia, infatti, pone la famiglia in una condizione difficile per affrontare il problema con la bambina, potendo ritardare il momento della comunicazione di una patologia altamente invalidante.

Questo pone dei grossi problemi di "genetic counselling", infatti nei casi di test predittivi che riguardano i minori, il risultato deve essere valutato con attenzione per quanto attiene alle sue implicazioni psico-sociali. I bambini in cui viene diagnosticata una malattia in fase presintomatica, possono soffrire di una perdita di autostima in un periodo critico in cui viene a svilupparsi il senso di autoidentità.

Una diagnosi presintomatica in bambini ha anche la possibilità di alterare la relazione con i genitori e con i fratelli. Pertanto, è fondamentale in questi casi agire con estrema

cautela, soprattutto in queste patologie per le quali a tutt'oggi non esiste alcuna terapia efficace.

Discuteremo un terzo caso (paziente 36) dovuto a mutazione del gene FKRP. Questo gene è mutato in due forme alleliche mappate entrambe sul cromosoma 19q13.3 e sottese al difetto del gene FKRP (Proteina Fukutina-Correlata): una forma allelica severa che causa una Distrofia muscolare congenita (MCD1C) è caratterizzata da inabilità a camminare, ipertrofia dei muscoli delle gambe senza interessamento cerebrale, secondaria deficienza di merosina, con parziale deficienza di alfa-distroglicano. Il difetto di glicosilazione dell'alfa distroglicano deve essere considerato alla base patogenetica della condizione; l'altra forma allelica LGDM2I ha un fenotipo variabile che può essere molto simile alla Distrofia muscolare di Duchenne. Quando l'inizio è nella prima decade di vita, l'abilità a camminare è mantenuta solo fino all'inizio della seconda decade. Alcuni casi moderati somigliano strettamente alla DM di Becker, con inizio più tardivo (6-23 anni), e continuano a camminare sino alla terza decade, con progressiva difficoltà. Tuttavia, la concentrazione delle CPK sieriche è sempre elevata negli individui con LGDM2I con valori tra 1.000 e 10.000 UI/l che non si riscontra in altre forme di distrofie muscolari. Alcuni pazienti mostrano un interessamento cardiaco, con cardiomiopatia dilatativa. Sia nella MCD1C che nella LGMD2I lo sviluppo cognitivo e la RMN cerebrale sono stati inizialmente riportati come normali, ma più recentemente è stato identificato un sottogruppo di pazienti con MCD1C in cui esistono chiari segni di interessamento del SNC.

Nella nostra paziente, l'esordio è precoce, nel primo anno di vita, il fenotipo è quello di una DM di Duchenne, e il valore delle CPK è di 7000 UI/l, è stata trovata una **mutazione omozigote missense (Met427Ile)**, diversa dalla mutazione comunemente descritta, e nella biopsia muscolare una lieve riduzione del beta distroglicano, della spettрина e dei sarcoglicani, mentre la merosina è normale. La RMN encefalo e la valutazione psicologica sono risultate nella norma anche se lo sviluppo cognitivo risulta a un livello medio-inferiore. Il quadro clinico e l'esordio orientano maggiormente verso una forma severa di LGDM2I, anche se esiste un overlap tra le due forme.

Il gene di 12 kb è composto da tre esoni non codificanti e un largo esone codificante; è stata identificata una comune mutazione in FKRP (C826A, Leu276Ileu) che è stata però solo osservata in pazienti con LGDM2I e non in quelli con MDC1C; recenti studi correlano il tipo di mutazione e l'espressione dell'alfa-distroglicano con il fenotipo del disturbo. Anormalità immunoistochimiche dell'alfa-distroglicano sono state riscontrate in tutti i pazienti, con una buona correlazione tra la gravità della deplezione e la severità del fenotipo osservato; specificatamente, persone con MCD1C mostrano costantemente una severa deficienza di alfa distroglicano, e sono composti genetici per mutazioni missense o nonsense, o hanno due mutazioni missense. Al contrario, individui con LGDM2I hanno la comune mutazione (C826A) o mutazioni missense e nonsense, e mostrano solo una moderata riduzione dell'alfa-distroglicano; individui con forme moderate di LGDM2I sono omozigoti per la comune mutazione e mostrano solo una lieve deficienza dell'alfa-distroglicano. Non

è ancora chiaro se in queste due forme vi sia un overlap sia clinico che genetico. I distroglicani, come si può vedere nelle figure iniziali, sono glicoproteine direttamente connesse alla ECM e l'azione dell'alfa-distroglicano è pienamente inserita nei processi di glicosilazione essendo la proteina implicata in forme gravi di DM congenite con associate anomalie gravi del muscolo e del cervello (MEB, Fukuyama, Walker-Warburg etc.). Mentre sino a poco tempo fa non si conoscevano malattie muscolari legate a deficit primari di distroglicani, oggi l'affermazione non è probabilmente più valida. Sono state recentemente identificate mutazioni in cinque geni deputati alla sintesi di proteine con attività glicosil-transferasica facendo luce su un nuovo meccanismo responsabile della distrofia muscolare. Tutte queste forme hanno in comune un'anormale glicosilazione dell'alfa-distroglicano. La gravità delle forme legate a mutazioni in questi geni è estremamente variabile andando da casi senza coinvolgimento del sistema nervoso centrale a varianti gravi con anomalie strutturali in muscolo, cervello ed occhio.

Non entriamo nel merito del grosso capitolo delle distrofie muscolari congenite che meriterebbero un trattato a parte, queste sono un gruppo di malattie ereditarie clinicamente e geneticamente eterogeneo con quadri clinici che vanno da forme molto gravi, spesso fatali nei primi mesi di vita, ad altre più lievi, compatibili con una sopravvivenza nell'età adulta; la loro classificazione subisce costantemente sostanziali modifiche in parallelo ai risultati ottenuti in campo immunoistopatologico, biochimico e genetico, comprendendo forme che presentano un overlap clinico e

molecolare con le LGDM e che entrano comunque nella loro diagnosi differenziale, come abbiamo visto nei nostri casi.

Abbiamo preso questi tre casi come esempio per mettere in evidenza le difficoltà diagnostiche nel campo delle DM dei cingoli, infatti non sempre anche con la conferma molecolare del disturbo, è possibile indicare un fenotipo preciso.

Spesso, inoltre, anche con dati che ci indirizzano verso una forma particolare, come il nostro caso di sarcoglicanopatia, non si riesce a evidenziare una mutazione, senza la quale è difficile fare una consulenza genetica precisa; è importante che questi pazienti in cui non vi è stata una conferma molecolare vengano periodicamente rivalutati, anche alla luce delle nuove ricerche nel campo della biologia molecolare.

Negli ultimi 10 anni le distrofie muscolari dei cingoli sono oggetto di intensi studi, rivelando una spiccata eterogeneità e affascinanti intuizioni sui possibili meccanismi patogenetici dei vari tipi di distrofie muscolari. I più recenti sviluppi hanno illustrato nuovi meccanismi nella loro determinazione, stabilendo costantemente nuove interpretazioni su ciascuna.

Dal punto di vista pratico, tuttavia, il raggiungimento di una diagnosi in un paziente individuale, può rimanere complessa, richiedendo l'integrazione di una valutazione clinica (basata su una sempre maggiore comprensione di dettagli fenotipici correlati a differenti disordini), analisi di proteine, e studi genetici.

I tempi per porre una diagnosi definitiva, possono quindi essere molto lunghi, in quanto, come abbiamo visto, lo stesso quadro clinico può essere dovuto a forme

geneticamente distinte, i tempi, inoltre, per la ricerca delle mutazioni non sono mai brevi. Infatti, nonostante l'avanzare delle tecnologie degli ultimi tempi, non si rimuovono molti dubbi e problemi che correntemente compaiono nell'individuazione di mutazioni in questo gruppo di geni, ma al presente, anche l'analisi diretta della proteina, le nuove tecniche per l'individuazione delle mutazioni correntemente e ampiamente usate non sempre possono rivelare la presenza di una mutazione sottostante.

DM FACIO-SCAPOLO-OMERALE :

Il campo delle distrofie muscolari facio-scapolo-omerale pone meno problemi nella diagnosi, anche se si tratta di una malattia variabile nel fenotipo clinico, che si manifesta generalmente dopo i 20 anni, ma che talvolta può esordire nella prima infanzia; nella stessa famiglia, infatti, possono esservi quadri clinici differenti. E' interessante vedere come nella famiglia nella quale lo studio del DNA ha messo in evidenza un frammento al limite della risoluzione (35-40 Kb), che cade nella fascia di transizione tra quelli associati alla malattia (10-35 Kb) e quelli polimorfici della popolazione normale (35-300 Kb), vi sono componenti che non presentano nessuna sintomatologia muscolare, e componenti che presentano una sintomatologia conclamata, come il paziente con associata la sdr di Williams nel quale si ipotizza la presenza di due mutazioni distinte, essendo le due patologie legate a distinti loci genici in diversi cromosomi.

Anche qui, essendo una patologia dominante, quando vi è un genitore affetto, spesso si pone una diagnosi in epoca presintomatica, riaprendo le problematiche circa la comunicazione della diagnosi al minore.

Il trattamento dei soggetti affetti è in grado di ridurre l'entità di alcuni disturbi secondari, ma non di interferire positivamente sui sintomi miopatici né sulla progressione della malattia. L'impostazione delle ricerche sperimentali in direzione di una possibile terapia causale deve necessariamente attendere il chiarimento della patogenesi a livello molecolare e cellulare, dopo l'identificazione dei geni coinvolti in FSHMD1A e FSHMD1B.

CONCLUSIONI

Come abbiamo visto, negli ultimi decenni, l'impiego dei metodi della genetica molecolare e umana hanno determinato un consistente progresso delle conoscenze del campo delle malattie neuromuscolari ereditarie: non solo sono stati identificati i loci corrispondenti alle diverse forme cliniche e spesso caratterizzati i relativi geni, ma è stata messa in luce la forte eterogeneità genetica sottostante la classificazione tradizionale.

La scoperta di nuovi geni responsabili per le varie forme di distrofie muscolari sta rivoluzionando sia la classificazione che la diagnostica e richiede un continuo aggiornamento.

Il ruolo della clinica rimane, comunque, indiscusso sia come prima tappa indispensabile del processo diagnostico, sia come unica modalità per riconoscere affezioni clinicamente differenti, eppure sostenute dalla stessa mutazione genica.

Sono stati ottenuti, inoltre, progressi strabilianti in campo biochimico, e tutto ciò può portare in breve ad individuare nuovi possibili bersagli terapeutici, che potrebbero consentire di attenuare la condizione patologica.

La disponibilità di sempre più raffinati e specifici markers biochimici e genetici ha rivoluzionato non solo la diagnostica, ma anche la comprensione di meccanismi patogenetici di queste malattie, anche se il cammino da fare in questa direzione resta notevole.

Inoltre, queste informazioni stanno consentendo il riconoscimento di nuove entità nosologiche a una velocità impressionante.

Benché non ci si possa fare illusioni sui tempi necessari per ottenere sostanziali progressi nella terapia di malattie tanto gravi e complesse, le prospettive attuali sono migliori rispetto a qualche anno fa.

Probabilmente, l'eccitante periodo delle scoperte dei geni implicati nelle malattie monogeniche volge ormai al termine, per lasciare il posto alla fase, ancora più interessante e impegnativa, degli studi funzionali di tali geni e della scoperta di terapie adeguate.

BIBLIOGRAFIA

- Dalkilic I and Kunkel LM (2003) Muscular dystrophies: genes to pathogenesis. *Current Opinion in Genetics e Development* 13:231-238
- Bushby KMD (1999) The limb-girdle muscular dystrophies multiple genes, multiple mechanisms. *Human Molecular Genetics* 10: 1875-1882
- Abbs S and Bobrow M (1993) Report on the 16th ENMC workshop—carrier diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 3:241-2
- Ahn AH and Kunkel LM (1993) The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat Genet* 3:283-9
- Backman E and Henriksson KG (1995) Low-dose prednisolone treatment in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 5:233-41
- Beenakker EA, Fock JM, Van Tol MJ, Maurits NM, Koopman HM, Brouwer OF, Van der Hoeven JH (2005) Intermittent prednisone therapy in Duchenne muscular dystrophy: a randomized controlled trial. *Arch Neurol* 62:128-32
- Bennett RR, den Dunnen J, O'Brien KF, Darras BT, Kunkel LM (2001) Detection of mutations in the dystrophin gene via automated DHPLC screening and direct sequencing. *BMC Genet* 2:17
- Biggar WD, Bachrach LK, Henderson RC, Kalkwarf H, Plotkin H, Wong BL (2005) Bone health in Duchenne muscular dystrophy: a workshop report from the meeting in Cincinnati, Ohio, July 8, 2004. *Neuromuscul Disord* 15:80-5
- Biggar WD, Politano L, Harris VA, Passamano L, Vajsar J, Alman B, Palladino A, Comi LI, Nigro G (2004) Deflazacort in Duchenne muscular dystrophy: a comparison of two different protocols. *Neuromuscul Disord* 14:476-82
- Bresolin N, Castelli E, Comi GP, Felisari G, Bardoni A, Perani D, Grassi F, Turconi A, Mazzucchelli F, Gallotti D, et al (1994) Cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 4:359-69
- Bushby K, Muntoni F, Urtizberea A, Hughes R, Griggs R (2004) Report on the 124th ENMC International Workshop. Treatment of Duchenne muscular dystrophy; defining the gold standards of management in the use of corticosteroids. 2-4 April 2004, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 14:526-34
- Bushby KM (1999) The limb-girdle muscular dystrophies—multiple genes, multiple mechanisms. *Hum Mol Genet* 8:1875-82
- Bushby KM and Gardner-Medwin D (1993) The clinical, genetic and dystrophin characteristics of Becker muscular dystrophy. I. Natural history *J Neurol* 240:98-104
- Bushby KM, Thambyayah M, Gardner-Medwin D (1991) Prevalence and incidence of Becker muscular dystrophy. *Lancet* 337:1022-4

- Chelly J, Gilgenkrantz H, Lambert M, Hamard G, Chafey P, Recan D, Katz P, de la Chapelle A, Koenig M, Ginjaar IB, et al (1990) Effect of dystrophin gene deletions on mRNA levels and processing in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Cell* 63:1239-48
- Connolly AM, Schierbecker J, Renna R, Florence J (2002) High dose weekly oral prednisone improves strength in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 12:917-25
- DeSilva S, Drachman DB, Mellits D, Kuncel RW (1987) Prednisone treatment in Duchenne muscular dystrophy. Long-term benefit. *Arch Neurol* 44:818-22
- Dolinsky LC, de Moura-Neto RS, Falcao-Conceicao DN (2002) DGGE analysis as a tool to identify point mutations, de novo mutations and carriers of the dystrophin gene. *Neuromuscul Disord* 12:845-8
- Dubowitz V (1997) 47th ENMC international workshop: Treatment of muscular dystrophy. *Neuromusc Disord* 7:261-267
- Felisari G, Martinelli Boneschi F, Bardoni A, Sironi M, Comi GP, Robotti M, Turconi AC, Lai M, Corrao G, Bresolin N (2000) Loss of Dp140 dystrophin isoform and intellectual impairment in Duchenne dystrophy. *Neurology* 55:559-64
- Fenichel G, Pestronk A, Florence J, Robison V, Hemelt V (1997) A beneficial effect of oxandrolone in the treatment of Duchenne muscular dystrophy: a pilot study. *Neurology* 48:1225-6
- Fenichel GM, Florence JM, Pestronk A, Mendell JR, Moxley RT 3rd, Griggs RC, Brooke MH, Miller JP, Robison J, King W, et al (1991) Long-term benefit from prednisone therapy in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 41:1874-7
- Ferlini A, Sewry C, Melis MA, Mateddu A, Muntoni F (1999) X-linked dilated cardiomyopathy and the dystrophin gene. *Neuromuscul Disord* 9:339-46
- Flanigan KM, von Niederhausern A, Dunn DM, Alder J, Mendell JR, Weiss RB (2003) Rapid direct sequence analysis of the dystrophin gene. *Am J Hum Genet* 72:931-9
- Gardner RJ, Bobrow M, Roberts RG (1995) The identification of point mutations in Duchenne muscular dystrophy patients by using reverse-transcription PCR and the protein truncation test. *Am J Hum Genet* 57:311-20
- Gatta V, Scarciolla O, Gaspari AR, Palka C, De Angelis MV, Di Muzio A, Guanciali-Franchi P, Calabrese G, Uncini A, Stuppia L (2005) Identification of deletions and duplications of the DMD gene in affected males and carrier females by multiple ligation probe amplification (MLPA). *Hum Genet* 117:92-8]
- Heald A, Anderson LV, Bushby KM, Shaw PJ (1994) Becker muscular dystrophy with onset after 60 years. *Neurology* 44:2388-90
- Hinton VJ, De Vivo DC, Nereo NE, Goldstein E, Stern Y (2000) Poor verbal working memory across intellectual level in boys with Duchenne dystrophy. *Neurology* 54:2127-32 [

- Hofstra RM, Mulder IM, Vossen R, de Koning-Gans PA, Kraak M, Ginjaar IB, van der Hout AH, Bakker E, Buys CH, van Ommen GJ, van Essen AJ, den Dunnen JT (2004) DGGE-based whole-gene mutation scanning of the dystrophin gene in Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. *Hum Mutat* 23:57-66
- Hu XY, Ray PN, Murphy EG, Thompson MW, Worton RG (1990) Duplicational mutation at the Duchenne muscular dystrophy locus: its frequency, distribution, origin, and phenotype-genotype correlation. *Am J Hum Genet* 46:682-95
- Joncourt F, Neuhaus B, Jostarndt-Foegen K, Kleinle S, Steiner B, Gallati S (2004) Rapid identification of female carriers of DMD/BMD by quantitative real-time PCR. *Hum Mutat* 23:385-91
- Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T, Meng G, Muller CR, Lindlof M, Kaariainen H, et al (1989) The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion *Am J Hum Genet* 45:498-506]
- Mendell JR, Buzin CH, Feng J, Yan J, Serrano C, Sangani DS, Wall C, Prior TW, Sommer SS (2001) Diagnosis of Duchenne dystrophy by enhanced detection of small mutations. *Neurology* 57:645-50
- Merlini L, Cicognani A, Malaspina E, Gennari M, Gnudi S, Talim B, Franzoni E (2003) Early prednisone treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 27:222-7
- Moizard MP, Billard C, Toutain A, Berret F, Marmin N, Moraine C (1998) Are Dp71 and Dp140 brain dystrophin isoforms related to cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy? *Am J Med Genet* 80:32-41
- Muntoni F, Cau M, Ganau A, Congiu R, Arvedi G, Mateddu A, Marrosu MG, Cianchetti C, Realdi G, Cao A, et al. (1993) Brief report: deletion of the dystrophin muscle-promoter region associated with X-linked dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 329:921-5]
- Prior TW, Bartolo C, Pearl DK, Papp AC, Snyder PJ, Sedra MS, Burghes AH, Mendell JR (1995) Spectrum of small mutations in the dystrophin coding region *Am J Hum Genet* 57:22-33
- Quinlivan R, Roper H, Davie M, Shaw NJ, McDonagh J, Bushby K (2005) Report of a Muscular Dystrophy Campaign funded workshop Birmingham, UK, January 16th 2004. Osteoporosis in Duchenne muscular dystrophy; its prevalence, treatment and prevention. *Neuromuscul Disord* 15:72-9
- Tarnopolsky M and Martin J (1999) Creatine monohydrate increases strength in patients with neuromuscular disease. *Neurology* 52:854-7
- Tidball JG and Spencer MJ (2003) Skipping to new gene therapies for muscular dystrophy. *Nat Med* 9:997-8
- van Deutekom JC and van Ommen GJ (2003) Advances in Duchenne muscular dystrophy gene therapy. *Nat Rev Genet* 4:774-83

- Yazaki M, Yoshida K, Nakamura A, Koyama J, Nanba T, Ohori N, Ikeda S (1999) Clinical characteristics of aged Becker muscular dystrophy patients with onset after 30 years. *Eur Neurol* 42:145-9
- Zalaudek I, Bonelli RM, Koltringer P, Reisecker F, Wagner K (1999) Early diagnosis in Duchenne muscular dystrophy. *Lancet* 353:1975
- Anderson LV, Davison K, Moss JA, Young C, Cullen MJ, Walsh J, Johnson MA, Bashir R, Britton S, Keers S, Argov Z, Mahjneh I, Fougere F, Beckmann JS, Bushby KM (1999) Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Hum Mol Genet* 8:855-61
- Brockington M, Yuva Y, Prandini P, Brown SC, Torelli S, Benson MA, Herrmann R, Anderson LV, Bashir R, Burgunder JM, Fallet S, Romero N, Fardeau M, Straub V, Storey G, Pollitt C, Richard I, Sewry CA, Bushby K, Voit T, Blake DJ, Muntoni F (2001) Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Hum Mol Genet* 10:2851-9
- Carbone I, Bruno C, Sotgia F, Bado M, Broda P, Masetti E, Panella A, Zara F, Bricarelli FD, Cordone G, Lisanti MP, Minetti C (2000) Mutation in the CAV3 gene causes partial caveolin-3 deficiency and hyperCKemia. *Neurology* 54:1373-6
- Chou FL, Angelini C, Daentl D, Garcia C, Greco C, Hausmanowa-Petrusewicz I, Fidzianska A, Wessel H, Hoffman EP (1999) Calpain III mutation analysis of a heterogeneous limb-girdle muscular dystrophy population. *Neurology* 52:1015-20
- Duggan DJ, Gorospe JR, Fanin M, Hoffman EP, Angelini C (1997) Mutations in the sarcoglycan genes in patients with myopathy. *N Engl J Med* 336:618-24
- Duggan DJ, Manchester D, Stears KP, Mathews DJ, Hart C, Hoffman EP (1997) Mutations in the delta-sarcoglycan gene are a rare cause of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy (LGMD2). *Neurogenetics* 1:49-58
- Fanin M, Duggan DJ, Mostacciuolo ML, Martinello F, Freda MP, Soraru G, Trevisan CP, Hoffman EP, Angelini C (1997) Genetic epidemiology of muscular dystrophies resulting from sarcoglycan gene mutations. *J Med Genet* 34:973-7
- Frosk P, Weiler T, Nylén E, Sudha T, Greenberg CR, Morgan K, Fujiwara TM, Wroegemann K (2002) Limb-girdle muscular dystrophy type 2H associated with mutation in *TRIM32*, a putative E3-ubiquitin-ligase gene. *Am J Hum Genet* 70:663-72
- Hauser MA, Horrigan SK, Salmikangas P, Torian UM, Viles KD, Dancel R, Tim RW, Taivainen A, Bartoloni L, Gilchrist JM, Stajich JM, Gaskell PC, Gilbert JR, Vance JM, Pericak-Vance MA, Carpen O, Westbrook CA, Speer MC (2000) Myotilin is mutated in limb girdle muscular dystrophy 1A. *Hum Mol Genet* 9:2141-7
- Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C, Serrano C, Urtizbarea JA, Hentati F, Hamida MB, Bohlega S, Culper EJ, Amato AA, Bossie K, Oeltjen J, Bejaoui K, McKenna-Yasek D, Hosler BA, Schurr E, Arahata K, de Jong PJ, Brown RH Jr (1998) Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 20:31-6

- Matsuda C, Aoki M, Hayashi YK, Ho MF, Arahata K, Brown RH Jr (1999) Dysferlin is a surface membrane-associated protein that is absent in Miyoshi myopathy. *Neurology* 53:1119-22
- Mercuri E, Brockington M, Straub V, Quijano-Roy S, Yuva Y, Herrmann R, Brown SC, Torelli S, Dubowitz V, Blake DJ, Romero NB, Estournet B, Sewry CA, Guicheney P, Voit T, Muntoni F (2003) Phenotypic spectrum associated with mutations in the fukutin-related protein gene. *Ann Neurol* 53:537-42
- Merlini L, Kaplan JC, Navarro C, Barois A, Bonneau D, Brasa J, Echenne B, Gallano P, Jarre L, Jeanpierre M, Kalaydjieva L, Leturcq F, Levi-Gomes A, Toutain A, Tournev I, Urtizberea A, Vallat JM, Voit T, Warter JM (2000) Homogeneous phenotype of the gypsy limb-girdle MD with the gamma- sarcoglycan C283Y mutation. *Neurology* 54:1075-9
- Minetti C, Sotgia F, Bruno C, Scartezzini P, Broda P, Bado M, Masetti E, Mazzocco M, Egeo A, Donati MA, Volonte D, Galbiati F, Cordone G, Bricarelli FD, Lisanti MP, Zara F (1998) Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 18:365-8
- Moreira ES, Wiltshire TJ, Faulkner G, Nilforoushan A, Vainzof M, Suzuki OT, Valle G, Reeves R, Zatz M, Passos-Bueno MR, Jenne DE (2000) Limb-girdle muscular dystrophy type 2G is caused by mutations in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin. *Nat Genet* 24:163-6
- Muntoni F, Lichtarowicz-Krynska EJ, Sewry CA, Manilal S, Recan D, Llense S, Taylor J, Morris GE, Dubowitz V (1998) Early presentation of X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy resembling limb-girdle muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 8:72-6
- Nigro V, de Sa Moreira E, Piluso G, Vainzof M, Belsito A, Politano L, Puca AA, Passos-Bueno MR, Zatz M (1996) Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy, LGMD2F, is caused by a mutation in the delta-sarcoglycan gene. *Nat Genet* 14:195-8
- Pogue R, Anderson LV, Pyle A, Sewry C, Pollitt C, Johnson MA, Davison K, Moss JA, Mercuri E, Muntoni F, Bushby KM (2001) Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord* 11:80-7
- Poppe M, Cree L, Bourke J, Eagle M, Anderson LV, Birchall D, Brockington M, Buddles M, Busby M, Muntoni F, Wills A, Bushby K (2003) The phenotype of limb-girdle muscular dystrophy type 2I. *Neurology* 60:1246-51
- Scacheri PC, Gillanders EM, Subramony SH, Vedanarayanan V, Crowe CA, Thakore N, Bingler M, Hoffman EP (2002) Novel mutations in collagen VI genes: expansion of the Bethlem myopathy phenotype. *Neurology* 58:593-602
- Speer MC, Vance JM, Grubber JM, Lennon Graham F, Stajich JM, Viles KD, Rogala A, McMichael R, Chutkow J, Goldsmith C, Tim RW, Pericak-Vance MA (1999) Identification of a new autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy locus on chromosome 7. *Am J Hum Genet* 64:556-62
- Tezak Z, Prandini P, Boscaro M, Marin A, Devaney J, Marino M, Fanin M, Trevisan CP, Park J, Tyson W, Finkel R, Garcia C, Angelini C, Hoffman EP, Pegoraro E (2003) Clinical and molecular study in congenital muscular dystrophy with partial laminin alpha 2 (LAMA2) deficiency. *Hum Mutat* 21:103-11

- Vainzof M, Passos-Bueno MR, Pavanello RC, Marie SK, Oliveira AS, Zatz M (1999) Sarcoglycanopathies are responsible for 68% of severe autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in the Brazilian population. *J Neurol Sci* 164:44-9
- Weiler T, Greenberg CR, Zelinski T, Nylen E, Coghlan G, Crumley MJ, Fujiwara TM, Morgan K, Wrogemann K (1998) A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in Manitoba Hutterites maps to chromosome region 9q31-q33: evidence for another limb-girdle muscular dystrophy locus. *Am J Hum Genet*
- Bione S, Maestrini E, Rivella S, Mancini M, Regis S, Romeo G, Toniolo D (1994) Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 8:323-7
- Bonne G, Yaou RB, Beroud C, Boriani G, Brown S, de Visser M, Duboc D, Ellis J, Hausmanowa-Petrusewicz I, Lattanzi G, Merlini L, Morris G, Muntoni F, Opolski G, Pinto YM, Sangiuolo F, Toniolo D, Trembath R, van Berlo JH, van der Kooi AJ, Wehnert M (2003) 108th ENMC International Workshop, 3rd Workshop of the MYO-CLUSTER project: EUROMEN, 7th International Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy (EDMD) Workshop, 13-15 September 2002, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 13:508-15
- Bonne G, Capeau J, De Visser M, Duboc D, Merlini L, Morris GE, Muntoni F, Recan D, Sewry C, Squarzoni S, Stewart C, Talim B, van der Kooi A, Worman H, Schwartz K (2002) 82nd ENMC international workshop, 5th international Emery-Dreifuss muscular dystrophy (EDMD) workshop, 1st Workshop of the MYO-CLUSTER project EUROMEN (European muscle envelope nucleopathies), 15-16 September 2000, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 12:187-94
- Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S, Becane HM, Hammouda EH, Merlini L, Muntoni F, Greenberg CR, Gary F, Urtizberea JA, Duboc D, Fardeau M, Toniolo D, Schwartz K (1999) Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 21:285-8
- Bonne G, Mercuri E, Muchir A, Urtizberea A, Becane HM, Recan D, Merlini L, Wehnert M, Boor R, Reuner U, Vorgerd M, Wicklein EM, Eymard B, Duboc D, Penisson-Besnier I, Cuisset JM, Ferrer X, Desguerre I, Lacombe D, Bushby K, Pollitt C, Toniolo D, Fardeau M, Schwartz K, Muntoni F (2000) Clinical and molecular genetic spectrum of autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy due to mutations of the lamin A/C gene. *Ann Neurol* 48:170-80
- Brown CA, Lanning RW, McKinney KQ, Salvino AR, Cherniske E, Crowe CA, Darras BT, Gominak S, Greenberg CR, Grosman C, Heydemann P, Mendell JR, Poher BR, Sasaki T, Shapiro F, Simpson DA, Suchowersky O, Spence JE (2001) Novel and recurrent mutations in lamin A/C in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Am J Med Genet* 102:359-67
- Charniot JC, Pascal C, Bouchier C, Sebillon P, Salama J, Duboscq-Bidot L, Peuchmaurd M, Desnos M, Artigou JY, Komajda M (2003) Functional consequences of an LMNA mutation associated with a new cardiac and non-cardiac phenotype. *Hum Mutat* 21:473-81

- De Sandre-Giovannoli A, Chaouch M, Kozlov S, Vallat JM, Tazir M, Kassouri N, Szepietowski P, Hammadouche T, Vandenberghe A, Stewart CL, Grid D, Levy N (2002) Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *Am J Hum Genet* 70:726-36
- Ellis JA, Brown CA, Tilley LD, Kendrick-Jones J, Spence JE, Yates JR (2000) Two distal mutations in the gene encoding emerin have profoundly different effects on emerin protein expression. *Neuromuscul Disord* 10:24-30
- Felice KJ, Schwartz RC, Brown CA, Leicher CR, Grunnet ML (2000) Autosomal dominant Emery-Dreifuss dystrophy due to mutations in rod domain of the lamin A/C gene. *Neurology* 55:275-80
- Genschel J and Schmidt HH (2000) Mutations in the LMNA gene encoding lamin A/C. *Hum Mutat* 16:451-9
- Lin F and Worman HJ (1993) Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J Biol Chem* 268:16321-6
- Manilal S, Nguyen TM, Sewry CA, Morris GE (1996) The Emery-Dreifuss muscular dystrophy protein, emerin, is a nuclear membrane protein. *Hum Mol Genet* 5:801-8
- Manilal S, Recan D, Sewry CA, Hoeltzenbein M, Llense S, Leturcq F, Deburgrave N, Barbot J, Man N, Muntoni F, Wehnert M, Kaplan J, Morris GE (1998) Mutations in Emery-Dreifuss muscular dystrophy and their effects on emerin protein expression. *Hum Mol Genet* 7:855-64
- Mercuri E, Counsell S, Allsop J, Jungbluth H, Kinali M, Bonne G, Schwartz K, Bydder G, Dubowitz V, Muntoni F (2002) Selective muscle involvement on magnetic resonance imaging in autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Neuropediatrics* 33:10-4
- Mercuri E, Manzur AY, Jungbluth H, Bonne G, Muchir A, Sewry C, Schwartz K, Muntoni F (2000) Early and severe presentation of autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy (EMD2). *Neurology* 54:1704-5
- Mercuri E, Poppe M, Quinlivan R, Messina S, Kinali M, Demay L, Bourke J, Richard P, Sewry C, Pike M, Bonne G, Muntoni F, Bushby K (2004) Extreme variability of phenotype in patients with an identical missense mutation in the lamin A/C gene: from congenital onset with severe phenotype to milder classic Emery-Dreifuss variant. *Arch Neurol* 61:690-4
- Muchir A, Bonne G, van der Kooi AJ, van Meegen M, Baas F, Bolhuis PA, de Visser M, Schwartz K (2000) Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum Mol Genet* 9:1453-9
- Muntoni F, Lichtarowicz-Krynska EJ, Sewry CA, Manilal S, Recan D, Llense S, Taylor J, Morris GE, Dubowitz V (1998) Early presentation of X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy resembling limb-girdle muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 8:72-6]

- Poppe M, Cree L, Bourke J, Eagle M, Anderson LV, Birchall D, Brockington M, Buddles M, Busby M, Muntoni F, Wills A, Bushby K (2003) The phenotype of limb-girdle muscular dystrophy type 2I. *Neurology* 60:1246-51
- Raffaele Di Barletta M, Ricci E, Galluzzi G, Tonali P, Mora M, Morandi L, Romorini A, Voit T, Orstavik KH, Merlini L, Trevisan C, Biancalana V, Housmanowa-Petrusewicz I, Bione S, Ricotti R, Schwartz K, Bonne G, Toniolo D (2000) Different mutations in the LMNA gene cause autosomal dominant and autosomal recessive Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 66:1407-12
- Shackleton S, Lloyd DJ, Jackson SN, Evans R, Niermeijer MF, Singh BM, Schmidt H, Brabant G, Kumar S, Durrington PN, Gregory S, O'Rahilly S, Trembath RC (2000) LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nat Genet* 24:153-6]
- van der Kooi AJ, Bonne G, Eymard B, Duboc D, Talim B, Van der Valk M, Reiss P, Richard P, Demay L, Merlini L, Schwartz K, Busch HF, de Visser M (2002) Lamin A/C mutations with lipodystrophy, cardiac abnormalities, and muscular dystrophy. *Neurology* 59:620-3
- van der Kooi AJ, Ledderhof TM, de Voogt WG, Res CJ, Bouwsma G, Troost D, Busch HF, Becker AE, de Visser M (1996) A newly recognized autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with cardiac involvement. *Ann Neurol* 39:636-42
- Vohanka S, Vytopil M, Bednarik J, Lukas Z, Kadanka Z, Schildberger J, Ricotti R, Bione S, Toniolo D (2001) A mutation in the X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy gene in a patient affected with conduction cardiomyopathy. *Neuromuscul Disord* 11:411-3
- Vytopil M, Benedetti S, Ricci E, Galluzzi G, Dello Russo A, Merlini L, Boriani G, Gallina M, Morandi L, Politano L, Moggio M, Chiveri L, Hausmanova-Petrusewicz I, Ricotti R, Vohanka S, Toman J, Toniolo D (2003) Mutation analysis of the lamin A/C gene (LMNA) among patients with different cardiomyopathic phenotypes. *J Med Genet* 40:e132
- Vytopil M, Ricci E, Dello Russo A, Hanisch F, Neudecker S, Zierz S, Ricotti R, Demay L, Richard P, Wehnert M, Bonne G, Merlini L, Toniolo D (2002) Frequent low penetrance mutations in the Lamin A/C gene, causing Emery Dreifuss muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 12:958-63
- Yates JR, Bagshaw J, Aksmanovic VM, Coomber E, McMahon R, Whittaker JL, Morrison PJ, Kendrick-Jones J, Ellis JA (1999) Genotype-phenotype analysis in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy and identification of a missense mutation associated with a milder phenotype. *Neuromuscul Disord* 9:159-65
- Yates JR, Wehnert M (1999) The Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy Mutation Database. *Neuromuscul Disord* 9:199
- Mahjneh I, Marconi G., Bushby K, Anderson L.V.B., Mahjneh T.H., Somer H.(2001) *Neuromuscular Disord* 11: 20-26
- Askanas V, Alvarez RB, McFerrin J, et al (1992) Facio-scapulo-humeral (FSH) syndrome with abnormal desmin accumulation. *Neurology* 42:22
- Brouwer OF, Padberg GW, Wijmenga C, Frants RR (1994) Facioscapulohumeral muscular dystrophy in early childhood. *Arch Neurol* 51:387-94

- Butz M, Koch MC, Muller-Felber W, Lemmers RJ, van der Maarel SM, Schreiber H (2003) Facioscapulohumeral muscular dystrophy. Phenotype-genotype correlation in patients with borderline D4Z4 repeat numbers. *J Neurol* 250:932-7
- Deidda G, Cacurri S, Piazza N, Felicetti L (1996) Direct detection of 4q35 rearrangements implicated in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *J Med Genet* 33:361-5
- Fisher J and Upadhyaya M (1997) Molecular genetics of facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *Neuromuscul Disord* 7:55-62
- Gilbert JR, Stajich JM, Wall S, Carter SC, Qiu H, Vance JM, Stewart CS, Speer MC, Pufky J, Yamaoka LH, et al (1993) Evidence for heterogeneity in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *Am J Hum Genet* 53:401-8
- Hewitt JE, Lyle R, Clark LN, Valleley EM, Wright TJ, Wijmenga C, van Deutekom JC, Francis F, Sharpe PT, Hofker M, et al. (1994) Analysis of the tandem repeat locus D4Z4 associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 3:1287-95
- Kohler J, Rupilius B, Otto M, Bathke K, Koch MC (1996) Germline mosaicism in 4q35 facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD1A) occurring predominantly in oogenesis. *Hum Genet* 98:485-90
- Lemmers RJ, de Kievit P, Sandkuijl L, Padberg GW, van Ommen GJ, Frants RR, van der Maarel SM (2002) Facioscapulohumeral muscular dystrophy is uniquely associated with one of the two variants of the 4q subtelomere. *Nat Genet* 32:235-6
- Lemmers RJ, Van Overveld PG, Sandkuijl LA, Vrieling H, Padberg GW, Frants RR, van der Maarel SM (2004) Mechanism and timing of mitotic rearrangements in the subtelomeric D4Z4 repeat involved in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 75:44-53
- Tonini MM, Passos-Bueno MR, Cerqueira A, Matioli SR, Pavanello R, Zatz M (2004) Asymptomatic carriers and gender differences in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *Neuromuscul Disord* 14:33-8
- Tonini MM, Pavanello RC, Gurgel-Giannetti J, Lemmers RJ, van der Maarel SM, Frants RR, Zatz M (2004) Homozygosity for autosomal dominant facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) does not result in a more severe phenotype. *J Med Genet* 41:e17
- Upadhyaya M, Maynard J, Rogers MT, Lunt PW, Jardine P, Ravine D, Harper PS (1997) Improved molecular diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): validation of the differential double digestion for FSHD. *J Med Genet* 34:476-9
- van Overveld PG, Lemmers RJ, Sandkuijl LA, Enthoven L, Winokur ST, Bakels F, Padberg GW, van Ommen GJ, Frants RR, van der Maarel SM (2003) Hypomethylation of D4Z4 in 4q-linked and non-4q-linked facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nat Genet* 35:315-7
- Zatz M, Marie SK, Cerqueira A, Vainzof M, Pavanello RC, Passos-Bueno MR (1998) The facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD1) gene affects males more severely and more frequently than females. *Am J Med Genet* 77:155-61