

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTA' DI

MEDICINA VETERINARIA

DISTROFIE MUSCOLARI

EREDITARIE:

ASPETTI COMPARATI NEGLI ANIMALI

E NELL'UOMO

Relatore:

Prof. Castagnaro Massimo

Laureando:

Antonio Brianza

448758/MV

ANNO ACCADEMICO 2005 - 2006

INDICE GENERALE

RIASSUNTO.....	Pag 4
Ringraziamenti.....	Pag 5
1. INTRODUZIONE.....	Pag 6
2. DEFINIZIONE ED ASPETTI STORICI.....	Pag 7
3. GENI E LORO PRODOTTI GENICI.....	Pag 11
4. CLASSIFICAZIONE.....	Pag. 17
5. PATOGENESI, SINTOMATOLOGIA, DIAGNOSI.....	Pag 22
5.1 Distrofie muscolari associate al cromosoma X (DMD e BMD, distrofie tipo Duchenne e tipo Becker).....	Pag 31
5.1.1 UOMO.....	Pag 33
5.1.2 TOPO.....	Pag 34
5.1.3 CANE.....	Pag 35
5.1.4 GATTO.....	Pag 38
5.1.5 CAVALLO.....	Pag 39
5.1.6 Caenorhabditis elegans.....	Pag 40
5.1.7 Danio rerio.....	Pag 43
5.2 Distrofia muscolare tipo Emery-Dreifuss - emerinopatie - (EDMD) e lamininopatie (LMNA).....	Pag 46
5.2.1 UOMO.....	Pag 46
5.2.2. ALTRI MODELLI ANIMALI	Pag 50
5.3 Distrofie muscolari dei cingoli (LGMD, Limb-girdle muscle dystrophy).....	pag 51
5.3.1 UOMO.....	Pag 52
5.3.2 TOPO.....	Pag 55
5.3.3 CRICETO	Pag 56
5.3.4 CANE	Pag 57
5.3.5 VISONE.....	Pag 58

5.4 Distrofia muscolare congenita (CMD, congenital muscular dystrophy).....	Pag 60
5.4.1 UOMO.....	Pag 60
5.4.2 TOPO.....	Pag 62
5.5 Distrofia muscolare oculo-faringiale (OPMD, ocularpharyngeal muscular dystrophy).....	Pag 66
5.5.1 UOMO.....	Pag 66
5.6 Distrofia muscolare lipomatosa (Lipomatosi muscolare).....	Pag 68
5.7 Distrofie muscolari miotoniche o Sindromi miotoniche.....	Pag 69
5.8 Miopatia diaframmatica del bovino Meuse-Rhine-Yssel	Pag 75
5.9 Distrofia muscolare progressiva degli ovini.....	Pag 75
5.10 Miopatia progressiva familiare suina.....	Pag 76
6. TERAPIA.....	Pag 77
6.1 Terapia sintomatica.....	Pag 77
6.2 Terapia genica.....	Pag 78
ALCUNE ABBREVIAZIONI.....	Pag 87
BIBLIOGRAFIA.....	Pag 89

RIASSUNTO

La tesi ha come oggetto di analisi le miopatie ereditarie degli animali e dell'uomo che assumono i caratteri di distrofie muscolari ereditarie.

Si propone di confrontare, alla luce di vecchie e nuove fonti bibliografiche, i criteri assunti per la loro specifica definizione e per un tipo di classificazione esauriente per ogni forma, ancora oggi non semplici da raggiungere, principalmente per: 1) la presenza di sintomi e meccanismi patogenetici che accomunano o meno una distrofia all'altra o ad altre miopatie; 2) la presenza di variabilità di comportamento clinico tra le singole specie; 3) la mancanza di dati sui deficit molecolari primari, soprattutto in medicina veterinaria.

Si è esaminata la panoramica delle teorie riguardanti la patogenesi. Gran parte dei meccanismi patogenetici sono stati chiariti e approfonditi negli ultimi anni da modelli animali sperimentalmente più aggredibili e da metodiche d'analisi sempre più elaborate, le quali hanno messo in luce tuttavia come alla base della patogenesi delle distrofie muscolari vi siano molteplici fattori scatenanti, non sempre strettamente legati all'agente primario deficitario.

È stata fatta una breve analisi per quanto riguarda la terapia. Oggi la cura parziale dei sintomi è ancora l'unica terapia realizzabile dal punto di vista pratico (terapia sintomatica). Tuttavia l'unico approccio terapeutico efficace per le distrofie muscolari ereditarie è quello che porta al recupero stabile del gene mutato (terapia genica). Ciò non è ancora possibile nella pratica clinica, ma i notevoli risultati ottenuti sperimentalmente nel tessuto muscolare di molti modelli animali, in vitro e recentemente anche in vivo, fanno sperare per una futura cura definitiva delle distrofie muscolari ereditarie.

Un grazie ai miei nipoti, Giacomo e Giulio:
sempre mi ricorderanno che una malattia,
prima di essere dentro un libro,
è dentro un essere vivente.

1. INTRODUZIONE

Lo studio comparato delle varie forme di distrofia muscolare nell'uomo e nei modelli animali ha rivestito e sta rivestendo un'enorme importanza nella medicina sperimentale. Fino a qualche decennio fa tale comparazione era molto discutibile: troppi erano gli aspetti da approfondire all'interno del campo delle distrofie, rinvenute in forme sempre più variabili tramite lo studio di metodiche diagnostiche sempre più elaborate, e troppi erano gli aspetti variabili all'interno delle specie animali comparate per ogni singola forma distrofica. Già nel 1991 Partridge [7] evidenziò la presa di coscienza di tale disagio, ma al tempo stesso rilevò la necessità di esaminare il problema in maniera obiettiva tenendo conto dei limiti allora presenti e non dimenticando i possibili futuri risvolti ottenibili soprattutto in ambito terapeutico.

Oggi, affiancando i grandi risultati ottenuti nell'analisi del genoma a quelli sempre più approfonditi delle indagini sintomatologiche e anatomopatologiche, si può ritenere che la strada della comparazione risulti più praticabile, anche se tutt'altro che in modo facile e veloce. Le molteplici e innovative tecniche di ricerca infatti, se da una parte rendono più aggredibile l'ostacolo degli aspetti contraddittori emergenti tra le varie specie, dall'altra hanno creato quella che qualche Autore ha definito un' "esplosione" [15] di conoscenze sperimentali nell'ambito della patologia molecolare in cui è molto difficile orientarsi. Occorre quindi fare tesoro oggi più che mai dell'ottimismo di Partridge per avere fiducia nello strumento di ricerca che il modello animale offre, in particolare per sondare il campo dei meccanismi patogenetici, ma indirizzare gli sforzi anche verso la disamina attenta e la discussione approfondita degli aspetti innovativi rilevati, al fine di vedere non più come una chimera il fine ultimo di tutta la ricerca, ossia la terapia delle distrofie muscolari, purtroppo ancora oggi molto teorica.

I dubbi riguardo l'affidabilità dei modelli animali nella comparazione delle distrofie muscolari a ragione devono comunque permanere, ma in senso propositivo e costruttivo e non per puro scetticismo, al fine di ricavare da essi gli elementi fondamentali per lo sviluppo sensato solo degli approcci terapeutici più sicuri.

Non trascurabile rimane poi la necessità di discutere circa la capacità di diagnosi delle distrofie muscolari nel campo pratico veterinario, dato che la loro rarità può sollevare il dubbio se lo siano per l'effettiva bassa incidenza o per l'effettiva inefficienza diagnostica.

2. DEFINIZIONE ED ASPETTI STORICI

Il termine distrofia muscolare (DM) è molto ambiguo in letteratura veterinaria [1]. Fu introdotto per le malattie muscolari progressive ed ereditabili in medicina umana [1], e la forma più frequente risultò essere la distrofia muscolare tipo Duchenne (DMD) [2],[14],[15]. Nonostante il termine distrofia muscolare progressiva (*Dystrophia muscularis progressiva*) sia stato coniato dal grande neurologo tedesco Wilhelm Erb alla fine del XIX secolo, la descrizione dettagliata della distrofia muscolare tipo Duchenne (DMD) risale ad una pubblicazione del medico inglese Edward Meryon, datata 1852. Qui si descrive in dettaglio la presentazione clinica della malattia, in particolare l'insorgenza infantile, la debolezza progressiva e la morte all'inizio dell'età matura. Meryon evidenziò il carattere familiare della malattia e l'esclusività di incidenza nel sesso maschile. All'esame anatomopatologico dei ragazzi affetti notò la perfetta normalità del midollo spinale, e cosa ancor più straordinaria per quei tempi, l'attento esame microscopico lo portò a concludere che il sarcolemma era lesa e distrutta: oggi infatti sappiamo che la malattia ha un deficit primario della proteina di membrana chiamata distrofina [14].

In realtà la malattia fu descritta qualche anno prima, e per la precisione nel 1849, da Guillaume Benjamin Amand Duchenne. In quell'anno Duchenne descrisse il caso di un paziente con atrofia muscolare diffusa che partiva dalle mani e raggiungeva braccia, gambe e sfinteri, senza segni di dolore o disturbi sensoriali. Non pubblicò il caso ma passò le sue osservazioni al collega François Amilcar Aran, medico all'Hôpital Saint Antoine, che pubblicò un lavoro a riguardo nel 1850, e dove si legge: «...mille ringraziamenti all'amico Duchenne de Boulogne che liberamente mi ha messo a disposizione il suo materiale». Nel 1872 Duchenne pubblicò un lavoro più accurato e dettagliato, tradotto e pubblicato a Londra nel 1883 da GV Poore; qui tra i vari aspetti sono descritte le contrazioni fibrillari dei muscoli, colpiti da "scosse vermiformi", la progressione dell'atrofia che parte dagli arti superiori e distrugge il tessuto muscolare in modo irregolare, la depressione lasciata dal deperimento dei muscoli a livello dell'eminenza tenar (massa rilevata presente alla base del pollice sul palmo della mano costituita da muscoli e altri tessuti [31]) e la conformazione delle dita ad uncino a causa dell'atrofia dei muscoli interossei. Duchenne specifica che in genere l'atrofia coinvolge gli arti inferiori, e in modo più marcato i muscoli flessori, solo dopo che la muscolatura degli arti superiori e del tronco è in gran parte distrutta; inoltre afferma che il deficit non inizia bilateralmente nello stesso momento, ma una volta affetto un muscolo, il corrispondente controlaterale è colpito di lì a breve. [26]

Duchenne ascrisse la debolezza della contrazione al deperimento della fibra, e non a un deficit di innervazione. Infatti si fabbricò un particolare uncino per eseguire

biopsie muscolari percutanee, e tale pratica sollevò allora non poche critiche di tipo etico; ma fu proprio questa metodica a consentirgli di illustrare alcuni caratteri tipici del processo distrofico, in primis la proliferazione del tessuto fibroadiposo nei muscoli affetti. Descrivendo tale processo come una paralisi muscolare pseudo-ipertrofica, propose di definire la malattia su base anatomopatologica chiamandola paralisi miosclerotica [26].

Molti altri furono i contributi riconosciuti a Duchenne nell'ambito della medicina sperimentale: descrisse in modo originale l'uso della fotografia nell'esame istologico microscopico e l'applicazione dell'elettroterapia nella patologia muscolare. Negli ultimi anni della sua vita Duchenne si concentrò sullo studio del sistema nervoso nell'università di Parigi, dove condusse molte sue sperimentazioni. Ottenne una fama internazionale per i suoi encomiabili studi sulla distrofia muscolare solo in seguito a una carriera di medico alquanto travagliata, trascorsa a contatto diretto con i suoi pazienti che seguiva umilmente per anni con visite a domicilio per annotare la progressione della malattia. Con un carattere riservato e segnato dalla tragica scomparsa della moglie morta di parto e anni dopo anche del figlio ammalatosi di tifo, visse in solitudine, rifiutando ogni tentativo di affermarsi, talora lontano anche dai colleghi più cari che tuttavia hanno sempre riconosciuto il valore del suo operato [26].

Ancora oggi comunque è aperto il dibattito tra gli studiosi degli aspetti storici di questa forma di distrofia muscolare, rivendicano il nome di Meryon e di Duchenne da attribuire alla medesima malattia [nda].

Essersi soffermati su questi brevi dettagli storici della DMD è stato doveroso perché lo studio delle varie altre forme di DM è stato spesso condotto, soprattutto dal punto di vista istologico, in riferimento proprio alla distrofia muscolare tipo Duchenne (DMD); ciò è stato giustificato non solo dalla grande incidenza di questa forma, ma anche dalla sua gravità, molto simile tuttavia ad altre forme più rare in seguito analizzate, quali le sarcoglicanopatie [nda]. Infatti anche alterazioni delle glicoproteine associate alla distrofina (DAGs o DAP), della merosina (α 2-laminina), nonché delle molecole di adesione delle cellule neuronali (NCAM) causano manifestazioni clinico-patologiche simili alla DMD [2]. Probabilmente le stesse osservazioni condotte da Duchenne sono state eseguite su più forme di distrofia muscolare [nda], in quanto dalla sua casistica (159 casi) risulta che le stesse condizioni si ripercuotono sulla muscolatura del tronco, sui muscoli respiratori - con difficoltà nella respirazione e nella fonasi - e in due casi i disturbi partono dagli arti inferiori, non vi è paralisi della vescica e del retto, la durata del processo è molto variabile [26]: questi sintomi infatti possono essere attribuiti anche a DM diverse dalla distrofinopatia.

A crear confusione negli anni '30 fu la descrizione di Distrofie muscolari nutrizionali, disordini acquisiti da carenze di vitamina E per i quali il termine corretto sarebbe stato miodegenerazioni nutrizionali o miopatie nutrizionali [1].

Da allora fino ad oggi si sono scoperte e tuttora rinvengono nuove forme distrofiche e simil-distrofiche del muscolo, sia in campo umano che animale, venendosi a creare molta difficoltà nella classificazione dei disordini non solo, come abbiamo visto sopra, per i termini di definizione loro associati, ma anche per la variabilità dei loro caratteri in comune [nda]: disordini muscolari quali i nemalinici, la "central core disease", quelli mitocondriali e miotubulari risultano congeniti ma benigni e relativamente non progressivi [1].

Adams R.D. nel 1975 diede un'accezione ancora oggi di riferimento, definendo distrofie muscolari le malattie del muscolo scheletrico progressive, ereditarie e degenerative [1], mettendo in risalto quindi il carattere non rigenerativo che deve accomunare i processi distrofici [nda].

Le definizioni date da vari Autori evidenziano che: i disordini delle DM sono intrinseci alla miofibra, non dovuti a difetti di motoneurone o di placca motrice, e caratteristica fondamentale è l'incapacità, seppur variabile, di attività rigenerativa [1]; il termine DM non dovrebbe essere usato per le miodistrofie che non hanno base ereditaria, ossia per le miopatie da denervazione e per le miopatie nutrizionali e tossiche [2], e infatti le DM mantengono i rapporti neuronali rispetto alle atrofie da denervazione [24] [25], mentre evidenziano progressione o recidiva rispetto alle miopatie tossiche, da esercizio e nutrizionali [24]. Ancora, sono definite DM le malattie muscolari degenerative complicate da deposizione di materiale o tessuti abnormi, quali sali di calcio, tessuto adiposo [3] o connettivo propriamente detto [25].

In quest'ultima definizione si aggiunge un altro un aspetto tipico del processo distrofico: la sostituzione, di intensità variabile, del tessuto muscolare degenerato con tessuto connettivo [nda]; ma ciò avviene negli stadi tardivi della malattia, qualora il tessuto non riesce a conservarsi o compaiono complicazioni secondarie quali denervazione, disturbi vascolari o eventi infiammatori [24].

Risulta ambigua anche la relazione tra i termini miopatia e distrofia muscolare (o miodistrofia); si legge infatti:

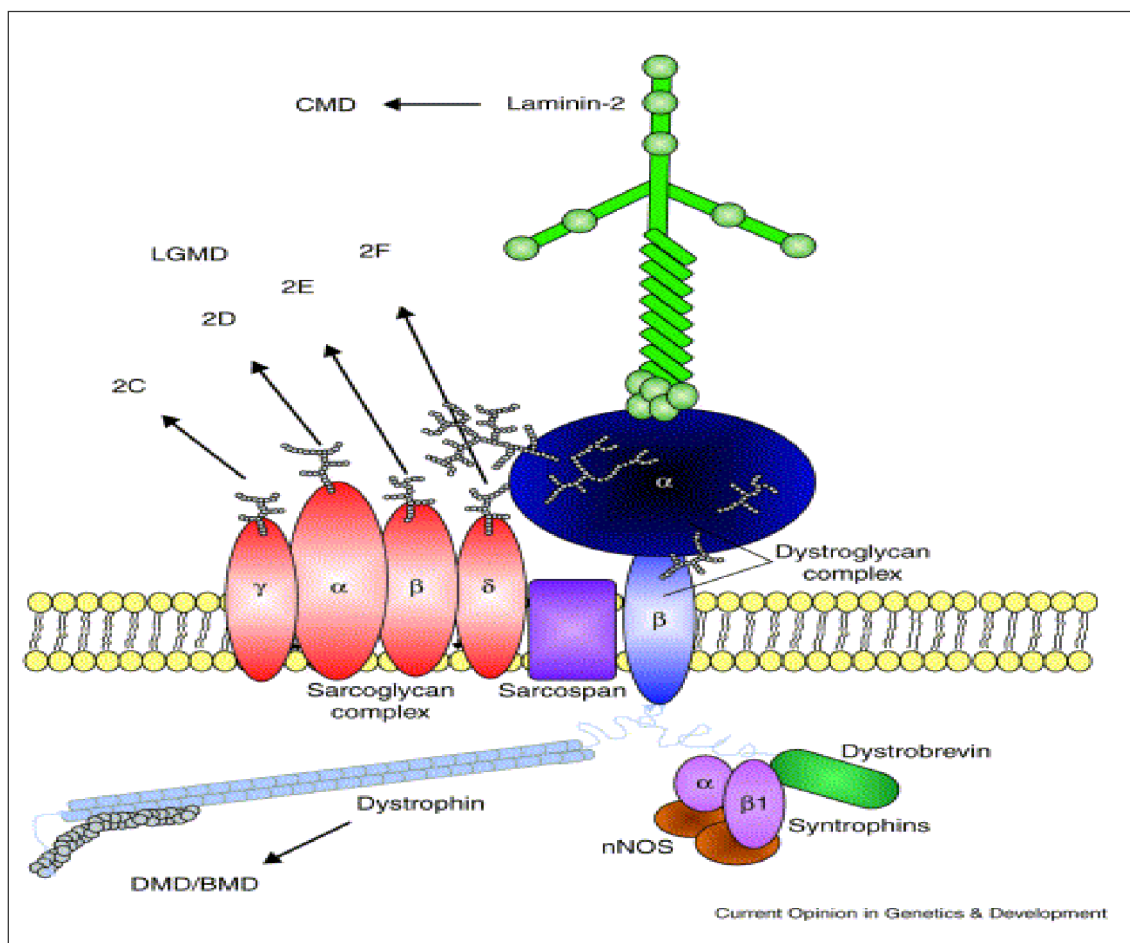
- «Le DM comprendono anche le miopatie ereditarie progressive, conseguenti di solito ad alterazioni del metabolismo della miofibra stessa -miopatia miopatica- » [2].
- «Si considerano miopatie le forme patologiche che provocano un danno primitivo alla fibra muscolare scheletrica, escludendo quelle di origine infiammatoria e quelle secondarie a lesioni neurologiche. Comprendono le miopatie congenite, simildistrofiche, nutrizionali, tossiche, da esercizio fisico, la miopatia fibrotica e

ossificante del Quarter Horse, la miosite eosinofila dei bovini e degli ovini e la miopatia ischemica. Le miopatie simil-distrofiche sono miopatie progressive, alcune sono ereditarie, molte presentano aspetti simili a vari tipi di distrofia muscolare dell'uomo» [4]

- «Si definiscono miopatie le malattie muscolari a sfondo degenerativo, che colpiscono uno o più muscoli del corpo, primarie o secondarie a seconda che siano associate a cause rispettivamente intrinseche o estrinseche alla miofibra. Le miopatie ereditarie (o DM ereditarie) negli animali sono per lo più primarie, al contrario di quanto avviene nell'uomo» [3]
- «Distrofia muscolare è un termine che descrive un gruppo di miopatie dell'uomo e degli animali che hanno in comune una serie di caratteristiche nessuna delle quali però risulta distintiva. Sono disordini primari del muscolo scheletrico» [24].

Oggi comunque le DM rimangono un gruppo di malattie ereditarie clinicamente e geneticamente eterogeneo [15]. Una chiara definizione di DM fa riferimento ad un gruppo di disordini ereditari caratterizzati da degenerazione e debolezza progressivi del muscolo non neurogenici [14][15]. Si vedrà di seguito come la difficoltà riscontrata nella definizione dei processi distrofici si ripercuota nella loro classificazione [nda].

3. GENI E LORO PRODOTTI COINVOLTI NELLE PRINCIPALI DISTROFIE MUSCOLARI



FIG_3.a [39]. Schema delle glicoproteine associate alla distrofina. Mutazioni primarie alla distrofina, ai sarcoglicani e alla laminina α -2 causano rispettivamente DMD/EMD, LGMD 2C-F e alcune forme di CMD.

Le proteine associate alla distrofina (DAP) sono l'insieme costituito [52]:

1. dal complesso delle glicoproteine associate alla distrofina (DAGs o DGC), ossia i distroglicani e i sarcoglicani; sono proteine transmembranarie;
2. dalle distrobrevine, citoplasmatiche;
3. dalle sintrofine, citoplasmatiche;

I singoli elementi sono considerati di seguito. Qui si ricorda che in bibliografia le abbreviazioni DAP (o DAPC [21]), DAGs, DCG e DGs possono essere facilmente confuse. Solo DAGs e DGC sono sinonimi [nda].

La distrofina è una proteina di 427 kDa, altamente conservata attraverso l'evoluzione dei vertebrati [15]. Nei mammiferi placentati il suo gene è presente nel

cromosoma X [15]; è costituito da due milioni e mezzo di basi (2500 kb) in 79 esoni che codificano un trascritto migliaia di volte più piccolo (14kb), e l'alta frequenza di mutazioni può essere imputabile proprio alla sua grandezza [33]. Clonata nel 1987 [33], esiste in varie isoforme [14]. Vi sono tre trascritti full-length riferibili a tre diversi promotori in base al tessuto in cui sono prevalentemente espressi: Purkinje(P) [ndt: non riportato se riferito a cellule o fibre de Purkinje], muscolo(M) cervello(B di "brain") [14].

Vi sono poi cinque trascritti più piccoli con promotori interni classificati in base alla dimensione in kDa [14]:

- 260 kDa (in retina, cervello, cuore).
- 140 kDa (cervello, midollo spinale): dalle osservazioni sul quoziente intellettivo, sembra che delezioni su questo trascritto e attorno all'esone 51 influenzino le funzioni cerebrali, ma non si sa in che modo.
- 116 kDa (cervello e nervi periferici).
- 71 kDa (ubiquitario): isoforma maggiormente espressa nel tessuto cerebrale adulto.
- 40 kDa.

La distrofina lega in modo forte l'actina intracellulare in siti multipli [15]. Le proteine associate alla distrofina sono i sarcoglicani, i distroglicani e i sub-complessi citoplasmatici [15]. L'estremità carbossiterminale (-COOH) lega la sintrofina mentre l'estremità aminotermine (-NH₂) lega la F-actina [15].

Attraverso i suoi domini N-terminale, centrale e C-terminale lega la proteina citoscheletrica F-actina, coinvolta in molte funzioni cellulari tra cui la risposta ad alcuni agenti infettivi [14]. L'estremità C-terminale è il punto più critico dal punto di vista funzionale [19]. Attraverso la F-actina lega l' α -actinina e tramite questa il complesso di adesione integrina-vinculina-talina, legate alle laminine. Il complesso C-terminale lega poi il β -sarcoglicanico, legato a vari complessi. Studi sulla capacità di generare forza della fibra distrofica, sottoposta a stress sia isometrico che isotonic, hanno messo in luce il probabile ruolo protettivo della distrofina nei confronti di danni derivati da questi stimoli [15].

Il complesso distrofina-distroglicano-laminina risulta uno dei due sistemi strutturali citoschletro-membranari della fibra, a fianco del complesso vinculina-integrina-laminina. La componente condivisa da entrambi i sistemi è la laminina. Pazienti affetti da una mutazione in qualsivoglia componente dei due sistemi sopravvivono alla nascita, seppur con anomalo sviluppo muscolare postnatale: perciò queste due "reti" proteiche sembrano funzionalmente ridondanti [15].

La distrofina non ha solo un ruolo strutturale: regola la permeabilità del sarcolemma e lo protegge dalle sollecitazioni durante le contrazioni; regola i flussi

di calcio tra l'ambiente intra- ed extracellulare [2]. A livello post-giunzionale la distrofina è espressa vicino ai canali del sodio [52].

L'utrofina (UTR) è una proteina normalmente localizzata nelle creste post-sinaptiche della giunzione neuromuscolare nell'individuo adulto, vicino ai recettori dell'acetilcolina, e pare essere responsabile del normale sviluppo della struttura terziaria della giunzione, nei miotubi (fibre in fase di maturazione) [52]. Nel topo mdx è stato evidenziato che vi è naturale sovraespressione di utrofina, anche se ciò non è stato segnalato nell'uomo [8]. Nonostante una modesta sovraespressione, l'utrofina infatti non è sufficiente a compensare una deficienza di distrofina lungo tutta la fibra [21]. È certo che la distrofina e l'utrofina, interagendo con la membrana post-sinaptica, influenzano il metabolismo muscolare ossidativo e gli colitico della fibra, ma non si sa ancora quali siano i segnali specifici [14]. Mentre lungo la fibra l'utrofina e la distrofina possono compensarsi, non lo possono nella giunzione neuromuscolare. In questa sede entrambe partecipano attivamente al riassetto (clustering) dei recettori di acetilcolina [52].

I distroglicani (DGs) sono un complesso di due subunità α e β . L' α -DG, fa da ponte tra la merosina della lamina basale extracellulare e il β -DG, una proteina transmembranaria che a livello intracellulare lega la distrofina [15]. Hanno ruolo attivo anch'essi nel riassetto dell'acetilcolina a livello di giunzione neuromuscolare, ma solo in compartecipazione con la laminina e altre proteine ancora poco conosciute [52]. Si ricorda ancora che l'abbreviazione DGC (Dystrophin-Glycoprotein Complex, ossia Complesso glicoproteico associato alla distrofina) non deve essere confusa con DGs: i DGs fanno parte del DGC assieme ai sarcoglicani [nda].

I sarcoglicani (SGs) sono un complesso di quattro subunità (α , β , γ , δ) transmembrana di uguale stechiometria che formano un complesso verosimilmente funzionante come una singola unità. La subunità δ , legando il β -distroglicano del complesso distroglicanico, risulta una componente glicoproteica transmembranaria del complesso distrofinico [15].

Le laminine sono la principale componente della lamina basale. La laminina funzionale ha tre subunità α , β , γ e vi sono differenti geni per ogni subunità, la cui espressione è tessuto-specifica e talora cellulo-specifica. Nel muscolo è espressa la laminina composta dalle subunità $\alpha2\text{-}\beta1\text{-}\gamma1$, tripletta spesso chiamata merosina [15].

La lamina A (664 aminoacidi; 74 Kb) e la lamina C (572 aminoacidi; 64 Kb) sono codificate dal gene LMNA (cromosoma 1q11-q23), costituito da 12 esoni (24Kb). Lo splicing alternativo nell'esone 10 dà origine a due RNAm diversi: uno di 1992 pb che codifica la lamina A; uno di 1716 bp che codifica la lamina C [11]. Le lamine A e C sono identiche per i primi 566 aminoacidi. La sequenza carbossi-terminale è

costituita da 98 aminoacidi nella lamina A, da sei aminoacidi nella lamina C [12][13]. Le lamine A/C sono componenti dell'envelope nucleare localizzate nella lamina (struttura multimerica associata alla superficie nucleoplasmatica della membrana nucleare interna) [11][13]. Appartengono alla superfamiglia di filamenti intermedi tipo V, e sono costituite da una testa che porta l'estremità amino-terminale, un dominio centrale (rod domain) ad α -elica e una coda globulare carbossi-terminale. I dimeri (che si formano attraverso il dominio centrale) interagiscono con la cromatina e le proteine integrali della membrana nucleare interna (LAPs, emerina, Narf) attraverso siti di legame localizzati nel dominio centrale e nella coda globulare. Sono coinvolte in tutta la fisiologia del nucleo (replicazione del DNA, organizzazione spaziale dei pori nucleari, crescita nucleare, stabilizzazione meccanica, ancoraggio delle proteine dell'envelope). [11] Mutazioni al gene della lamina provocano LGMD-1B ed EDMD, con cardiomiopatia associata [13].

L'emerina è il prodotto del gene STA (2100 pb; sei esoni; RNAm di 762 bp), scoperto nel 1994, situato nel cromosoma Xq28 (uomo) [11]. È costituita da 254 aminoacidi (34 kDa), ed è presente nel muscolo liscio, cardiaco e scheletrico. Il 70% della sequenza dell'emerina umana coincide con quella dell'emerina di ratto e topo, mentre non vi sono sequenze comuni con *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans*. In questi ultimi vi è un dominio LEM che coincide con un dominio delle proteine di mammifero LAP2 (Lamin Associated Protein) e MAN1 [11]. È una proteina ancorata alla membrana nucleare interna con l'estremità carbossi-terminale e la parte terminale fluttuante nel nucleoplasma. Presenta molti siti di serina proteina-kinasi [11]. Ancora molto è da delucidare sulla funzione dell'emerina. Sembra che formi un complesso con l' α e β actina nucleare: complesso apparso non stabile nei mioblasti indifferenziati, ma solo ad un loro livello avanzato di differenziazione [36]. In complesso con le altre proteine di membrana nucleare, sembra essere responsabile della stabilizzazione della membrana nucleare durante la contrazione muscolare e aver ruolo nell'organizzazione del nucleo durante la divisione cellulare [11].

Le distrobrevine sono conosciute come prodotti di due geni: uno per la α -distrobrevina (cromosoma 18q nell'uomo e nel topo) e uno per la β -distrobrevina (cromosoma 2q nell'uomo e 12 nel topo). La β -distrobrevina è espressa in molti tessuti non muscolari [53]. L' α -distrobrevina è conosciuta in cinque isoforme: le isoforme -1, -2, -3 sono espresse nel muscolo [52][53]. L'isoforma -1 è principalmente espressa a livello di giunzione neuromuscolare, mentre l'isoforma -2 è ubiquitaria nel sarcolemma; l'isoforma -3 non è molto conosciuta [52]. Il topo α -distrobrevina-privo è colpito da una distrofia più leggera del topo mdx. Non è necessaria per la formazione della placca motrice, ma è coinvolta nel clustering

dell'acetilcolina. Tuttavia le disfunzioni sinaptiche osservate sempre nel topo distrobrevina-privo sembrano imputabili alla perdita di α -sintrofina, cui è legata. Ma la cosa più interessante è che in questo modello animale tutte le alterazioni avvengono con il complesso DAP integro [52]. Alcuni ricercatori [53] per questo confidano nel beneficio terapeutico di una eventuale sovra-espressione dell' α -distrobrevina nel muscolo affetto da DMD per limitarne la degenerazione muscolare. Anche la distrobrevina non è ascrivibile, se mutata, a particolari forme distrofiche, anche se una sua mutazione puntiforme è stata riscontrata in una famiglia dove erano riportati disturbi cardiaci [53]. L' α -distrobrevina partecipa in molte interazioni proteina:proteina che sembrano coinvolte nella trasduzione del segnale intracellulare [53].

Le sintrofine sono proteine modulatrici [52], intracellulari, che legano l'estremità carbossi-terminale della distrofina, assieme alla nNOS e l' α -distrobrevina [33]. Sono conosciute un'isoforma α , due isoforme β e due isoforme γ . Tali isoforme sono espresse in periodo specifici dello sviluppo e non sempre in tutto il sarcolemma (per dettagli consultare [52]). Ogni isoforma ha quattro domini: un dominio PDZ, due domini omologhi alla pleckstrina, un dominio carbossi-terminale. Le sintrofine legano la distrobrevina e la distrofina in due siti molto vicini ma ben distinti. Circoscrivono molte molecole segnale per la giunzione neuromuscolare, tra cui la già citata nNOS e i canali del sodio (entrambi legati nello stesso dominio PDZ), e molte altre (Grb2, Erb4, SAPK3, Aquaporina 4, MAST; per dettagli consultare [52]). Per questo motivo, pur non essendo soggette a mutazioni che esitano in specifiche distrofie, non è da trascurare il loro coinvolgimento in varie forme distrofiche [52].

La disferlina è una proteina (230 kDa) che fa parte della famiglia delle ferline assieme all'Otoferlina, alla Mioferlina e alla Fer1L4 [41]. Il gene disferlina risiede nel cromosoma 2 (150kb; 55 esoni). Sono conosciute malattie ascrivibili a mutazioni delle sole Disferlina e Otoferlina (quest'ultima esita in una malattia autosomica recessiva che dà sordità). La deficienza di disferlina causa la distrofia muscolare LGMD-2B e la Miopatia di Miyoshi [41]. È espressa in molti tessuti oltre a quello muscolare scheletrico e cardiaco, per cui è ritrovata in organi quali il rene, il cervello, il polmone, la placenta. Tuttavia la deficienza di disferlina non causa disfunzioni cardiache. È una proteina di membrana che appare ancorata ad essa con l'estremità carbossi-terminale, e libera nel citoplasma con l'estremità N-terminale. Il suo ruolo principale non è ancora ben compreso, ma sembra svolgere un'attività simile a quella delle sinaptogamine, proteina che regolano la fusione calcio dipendente delle vescicole, nei processi di eso- ed endocitosi [41].

La disferlina interagisce strettamente con la caveolina-3 [38].

La calpaina-3 (821 aminoacidi; 94kDa, da cui il nome originario p94) è una proteasi neutra calcio dipendente specifica del muscolo [2], anche se riscontrata in

quantità minime anche in altri tessuti [54]. Il suo gene risiede nel cromosoma 15 (40Kb; 24 esoni). La deficienza di calpaina-3 provoca la LGMD-2A (unica forma distrofica causata da deficit enzimatico), e ciò ha fatto pensare che la sua attività sia più regolatrice che demolitrice [54].

La proteina nucleare poliadenilato-legante -1 (PABPN-1) è la proteina nucleare maggiormente coinvolta nella poliadenilazione dell'RNAm. Vi sono quattro domini: 1) dominio di polialanina 2) dominio legante l'RNAm 3) dominio di dimerizzazione 4) dominio di segnale di localizzazione nucleare (NLS). Il dominio 2) è altamente conservato in molte specie, mentre il dominio 1), di variabile lunghezza, è stato trovato solo nei vertebrati: Homo sapiens (10Ala), Mus musculus (10Ala), Bos taurus (10Ala), Xenopus laevis (2Ala). Nell'uomo la mutazione al suo gene provoca la distrofia oculofaringiale [35].

4. CLASSIFICAZIONE

Nell'uomo le distrofie muscolari ereditarie progressive sono un gruppo di miopatie di cui fanno parte numerosi sottotipi [2]. Di questi solo tre hanno equivalenti importanti negli animali, in particolare nei cani: la DMD, le LGMD, la distrofia miotonica [2].

In medicina umana si classificano in base all'età di insorgenza, ai gruppi muscolari coinvolti, ai caratteri istologici e al tipo di ereditarietà [1].

In medicina veterinaria le distrofie muscolari riguardano il bovino, la pecora, il topo, il criceto, il cane, il gatto [1], il cavallo [2][16], il pollo [1], il tacchino e il visone [25].

Sono state classificate in base ai gruppi muscolari coinvolti (ad esempio nella pecora il muscolo vasto interno, nel bovino Meuse-Rhine-Yssel il diaframma), raramente in base al tipo di fibra coinvolto (nella pecora ad esempio è coinvolto il tipo 1) [1],[2]. Questo tipo di classificazione non hanno avuto molto successo, essendo sempre state rivalutate dalle nuove osservazioni [nda]; un esempio è il caso della Distrofia muscolare del cane Labrador retriever, la cui precedente definizione "Disfunzione delle miofibre di tipo II" è stata abbandonata dopo aver riscontrato il coinvolgimento anche di fibre tipo I [1][2].

Rara è l'incidenza in bovino, cavallo, ovino, gatto, suino e visone [2]. Nel cavallo molte miopatie sembrano sovrapponibili ad una corrispondente forma umana, quali la miotonie, la distrofia miotonica e la miopatia distrofia muscolare-simile; tuttavia l'incidenza di queste forme nella specie equina è molto bassa e talvolta ancora sconosciuta la loro eziologia [16]. Nella classificazione che segue si può notare come non sempre le miopatie congenite ereditarie siano disordini a carattere distrofico.

TAB_4.a Miopatie congenite ereditarie[1] e Distrofie muscolari progressive negli animali[2]:
specie, razze colpite ed ereditarietà.

Bovino	<ul style="list-style-type: none"> • Distrofia diaframmatica : in Meuse-Rhine-Yssel (Olanda) e Holstein (Giappone); probabilmente ereditaria in Meuse-Rhine-Yssel[2]; autosomica recessiva ? [1] • Iperplasia muscolare congenita (doppia groppa) : autosomica recessiva[1] • Glicogenosi tipo II (deficit maltasi acida): autosomica recessiva[1] • Glicogenosi tipo IV (deficit di miofosforilasi) : autosomica recessiva ? [1]
Pecora/Capra	<ul style="list-style-type: none"> • DM congenita nella pecora Merinos: quasi sicuramente ereditaria [2]; autosomica recessiva [1]; • Miotonia nella capra : autosomica dominante[1] • Glicogenosi tipo II (deficit della maltasi acida) : autosomica recessiva [1] • Miotonia congenita: ereditaria ma non progressiva, disturbo ai canali ionici dello ione Cl nei tubuli T in capre Angora[2]
Cane	<ul style="list-style-type: none"> • DM ereditaria recessiva legata al cromosoma X (omologa del tipo Duchenne dell'uomo) [1] in Golden Retriever, Rottweiler, Samoiedo, Irish terrier [2]) • Miopatia del Labrador Retriever : ereditaria autosomica recessiva [1], omologa della LGMD-2A e LGMD(sarcoglicani) dell'uomo [2] • Miotonia congenita : autosomica recessiva [1], ereditaria ma non progressiva, disturbo ai canali ionici dello ione Cl nei tubuli T, osservata soprattutto nel Chow Chow[2] • Deficienza di fosfofruttochinasi : autosomica recessiva [1]

	<ul style="list-style-type: none"> • DM distale del Rottweiler: deficit di carnitina [2] • DM ipertrofica, forma rara, simile a quella felina legata al cromosoma X [2]
Gatto	<ul style="list-style-type: none"> • DM ereditaria recessiva legata al cromosoma X (omologa del tipo Duchenne dell'uomo) [1]: forma ipertrofica detta anche HFMD (hypertrophic feline muscular dystrophy) [2] • Miotonia congenita : si suppone un difetto ai canali ionici [1] • Glicogenosi del gatto Norvegese delle foreste: autosomica recessiva [1]
Suino	<ul style="list-style-type: none"> • Ipertermia maligna : autosomica recessiva [1] • Miopatia progressiva familiare: osservata in razze Pietrain e Landrace; ereditaria [2]
Cavallo	<ul style="list-style-type: none"> • Miotonia : disordini congeniti detti "distrofia muscolare - simili" o "distrofia miotonica - simili", osservati in Purosangue (Thoroughbreds), Standard-breds e Quarter horse [1] • Miopatia da accumulo polisaccaridica : osservata in varie razze, probabilmente autosomica recessiva [1] • Deficienza dell'enzima glicogenico ramificante ("glycogen brancher enzyme"): osservata nel Quarter horse, probabilmente autosomica recessiva [1] • Sindrome paramiotonia (paralisi periodica iperpotassiemica): ereditaria[2] autosomica dominante, tipica del Quarter horse e suoi incroci [1], nell'uomo il disturbo è dovuto a mutazione ai canali Na-voltaggio dipendenti [2]

Criceto	<ul style="list-style-type: none"> • Cardiomiopatia autosomica recessiva, forma omologa delle LGMD 2F umane [2]
Visone	<ul style="list-style-type: none"> • Distrofia muscolare, probabilmente autosomica recessiva [2] • Lipomatosi muscolare, ereditaria; da distinguere dalla steatosi muscolare, acquisita [2]

Una precisa classificazione è fondamentale perché varia la patogenesi e il tipo di ereditarietà da una forma all'altra [22]. Non sono state considerate in questa classificazione i disturbi acquisiti (quali le miopatie ischemiche del suino, le miotonie acquisite del cane e del gatto - di cui si accenna nel paragrafo delle Distrofie miotoniche-) e i disturbi congeniti non ereditari (come lo splayleg del suinetto, la distrofia muscolare nemalinica del cane e del gatto, e la steatosi muscolare del bovino). Nella descrizione che segue delle singole forme non sono stati presi in considerazione i disordini non specificamente distrofici (come le glicogenosi, l'iperplasia muscolare congenita o "doppia groppa" del bovino) che riportano comunque affinità sintomatologiche e anatomopatologiche con le DM ereditabili e che per questo possono rientrare nelle classificazioni dei vari Autori [nda].

Si fa presente che se l'aspetto istologico è stato da sempre considerato il carattere unificante delle distrofie muscolari, ma oggi, andando oltre all'analisi della distrofia muscolare tipo Duchenne, si è visto che non vi sono caratteristiche diagnostiche comuni a tutte le forme e una definizione in base all'aspetto istologico non sarebbe più specifica [14]. In ragione delle molteplici caratteristiche anatomopatologiche che hanno significativamente ampliato la definizione di distrofia muscolare, si suggerisce in futuro una classificazione basata sul corrispondente prodotto genico deficitario, e quindi parlare di distrofinopatie, sarcoglicanopatie, merosinopatie, lamininopatie, etc. [14]. Nell'uomo, in base a questo criterio, si possono suddividere la distrofie in distrofinopatie (DMD,BMD), distrofie muscolari dei cingoli (LGMD) e distrofie muscolari congenite (CMD) [33].

Disease	Mode of inheritance	Gene locus	Gene product
Duchenne and/or Becker muscular dystrophy	XR	Xp21	Dystrophin
Limb-girdle muscular dystrophy (LGMD)			
LGMD1A	AD	5q22	Myotilin
LGMD1B	AD	1q11-q21	Lamin A and/or C
LGMD1C	AD	3p25	Caveolin-3
LGMD1D	AD	6q23	Not identified
LGMD1E	AD	7q	Not identified
LGMD1F	AD	2q	Not identified
LGMD2A	AR	15q15	Calpain-3
LGMD2B	AR	2p13	Dysferlin
LGMD2C	AR	13q12	γ -Sarcoglycan
LGMD2D	AR	17q12	α -Sarcoglycan
LGMD2E	AR	4q12	β -Sarcoglycan
LGMD2F	AR	5q23	δ -Sarcoglycan
LGMD2G	AR	17q11	TCAP
LGMD2H	AR	9q31	TRIM32
LGMD2I	AR	19q13	FKRP
LGMD2J	AR	2q31	Titin
Distal muscular dystrophy (DMD)			
Miyoshi myopathy	AR	2p13	Dysferlin
Tibial muscular dystrophy	AD	2q31	Titin
Congenital muscular dystrophy (CMD)			
MDC1A	AR	6q22	Laminin α 2
MDC1B	AR	1q42	Not identified
MDC1C	AR	19q13	FKRP
MDC1D	AR	22q12	LARGE
Fukuyama CMD	AR	9q31-q33	Fukutin
α 7 integrin congenital myopathy	AR	12q13	α 7 Integrin
Rigid spine CMD	AR	1p36	Selenoprotein N1
Muscle-eye-brain disease	AR	1p32	POMGnT1 glycosyltransferase
Walker-Warburg syndrome	AR	9q34	POMT1
Other types of muscular dystrophy			
Emery-Dreifuss muscular dystrophy	XR	Xq28	Emerin
Emery-Dreifuss muscular dystrophy	AD and AR	1q11-q23	LaminA/C
Bethlem myopathy/Ullrich syndrome	AD	21q22	Collagen VI α 1
	AD	21q22	Collagen VI α 2
	AD	2q37	Collagen VI α 3
Epidemolysis bullosa and muscular dystrophy	AR	8q24-qter	Plectin
Oculopharyngeal muscular dystrophy	AD	14q11.2-q13	Poly-A-binding protein 2
Facioscapulohumeral muscular dystrophy	AD	4q35	Not identified
Myotonic dystrophy	AD	19q13	Myotonin protein kinase
Myotonic dystrophy type 2	AD	3q21.3	ZNF9

TAB_4.b [41]

Lista
riassuntiva
delle varie
DM,
ereditarietà,
localizzazione
cromosomica,
prodotto
genico e
modello
murino
disponibile.

5. PATOGENESI , SINTOMATOLOGIA, DIAGNOSI

Negli ultimi 15 anni si è verificata in senso metaforico una esplosione di conoscenze riguardo la patologia molecolare delle DM tipo Duchenne, Becker e delle sarcoglicanopatie, sia in campo umano che animale sperimentale; purtroppo queste conoscenze non sono state accompagnate da una disamina delle reazioni biochimiche a cascata che le caratterizzano [15].

Molti aspetti secondari delle DM dovranno essere meglio studiati per comprendere le disfunzioni del muscolo distrofico. Alcuni eventi da considerare sono: le vie metaboliche che regolano il calcio intracellulare, le funzioni molecolari sulla motilità della miosina, la bienergetica mitocondriale e della fosfocreatina [15].

A complicare il quadro patogenetico sono gli esempi ormai frequenti di variabili andamenti clinici in riferimento a mutazioni in differenti esoni del gene. Già disordini monogenici hanno dimostrato che la correlazione "un gene, una proteina" è un dogma troppo semplicistico: nella talassemia ad esempio accanto ad una grande eterogeneità di mutazioni della β -globina vi è anche l'influenza di geni modificatori e fattori ambientali che variano il quadro clinico. Per quanto riguarda le DM, esaminando il gene LMA che codifica con splicing alternativi le lamine A e C della lamina nucleare (posta alla base della membrana nucleare interna), si pensò che mutazioni al dominio centrale (rod domain) esitassero in cardiomiopatia dilatativa con disturbi di conduzione, senza disordini al muscolo scheletrico, mentre mutazioni ai domini di testa e di coda esitassero nella DM tipo Emery-Dreifuss, forma autosomica dominante. Questa sarebbe un'estrema semplificazione: oggi sappiamo che mutazioni a differenti esoni del gene esitano in un'ampia variabilità di aspetti fenotipici, potendo esprimere, oltre che entrambe le forme di EDMD (autosomica dominante ed eterosomica recessiva), anche la LGMD-1B, la cardiomiopatia dilatativa con difetti di conduzione, addirittura la lipodistrofia parziale tipo Dunnigan, e talvolta assoluta normalità. La ricerca sui possibili geni modificatori segregati nei vari gruppi famigliari affetti, affiancata dallo studio dei polimorfismi del singolo nucleotide (single nucleotide polymorphisms SNPs), potrà probabilmente spiegare questa variabilità.[14]

Il sistema Y2H (yeast two-hybrid assay) è un test di laboratorio in cui l'interazione tra una proteina come "esca" e un'altra proteina usata come "preda" è segnalata dall'attivazione di trascrizione di uno o più geni di riferimento. Questo test offre un nuovo approccio per studiare l'interazione tra le varie componenti proteiche, spesso caratteristica [14]: deficit di distrofina possono causare carenza secondaria di sarcoglicani; il deficit di un particolare sarcoglicano causa la carenza secondaria di altri sarcoglicani associati [14]; nelle distrofinopatie vi è deficit secondario di tutti i

sarcoglicani, mentre non vi è deficit di distrofina nelle sarcoglicanopatie [15]; nella disferlinopatia può rinvenire secondaria carenza di calpaina 3 [14].

Il significato patogenetico di queste osservazioni rimane però oscuro: nel topo l'assenza di distroglicano [non segnalato quale, nda] e rapsina è letale; nell'uomo e altri modelli animali le deficienze di distrofina, α 7-integrina, α - e δ - sarcoglicani, α -distrobrevina e caveolina 3 causano miopatia; la carenza di proteine come il sarcospan, l'utrofina e l' α -sintrofina non sembra associate a manifestazioni patologiche; pure la carenza dei canali del Na-voltaggio dipendenti, legati alla sintrofina, non sembra patogeneticamente importante [14].

Infine il ruolo della NO-sintasi neuronale (nNOS), carente nel topo mdx e nella DMD, è molto discusso in quanto nel topo mutante nNOS privo il muscolo ha un aspetto normale [14].

Volendo descrivere una base patogenetica comune delle DM, si può ritenere che il difetto a una componente del complesso glicoproteico associato alla distrofina (DAGs o DGC), quindi alla distrofina nelle distrofinopatie (DMD,BMD), ai sarcoglicani nelle distrofie muscolari dei cingoli (LGMD) o alla laminine nelle distrofie muscolari congenite (CMD), provoca indebolimento e rottura del sarcolemma variabile a seconda della forma, quindi necrosi indotta dall'afflusso del calcio all'interno della fibra [33].

Bisogna da subito tener presente che la bassa incidenza di queste forme rende difficile la diagnosi, che è fondamentale soprattutto dal punto vista differenziale per le razze pure nell'interesse degli allevatori, e non meno per i proprietari che si troveranno di fronte a prognosi diverse a seconda della miopatia. Per la maggior parte di esse non esiste cura e la terapia non è disponibile [22].

Nel cane e nel gatto le informazione riguardo le distrofie muscolari sono esigue, eccetto per la forma causata da deficienza di distrofina, ed è sempre difficile estrapolare un loro quadro clinico in riferimento al modello umano [22].

Alcune teorie inerenti la patogenesi mettono al centro il ruolo della sintasi dell'ossido nitrico (NOS, Nitric Oxide Synthases), del calcio, delle mutazioni suppressor e il comportamento dei muscoli estrinseci dell'occhio.

Le sintasi dell'ossido nitrico (NOS) sono tre, e sono state denominate in base al tessuto in cui in origine sono state rinvenute. Oggi si sa che la loro espressione avviene in molti altri tessuti, ed è dipendente dalla variabilità degli stimoli che le inducono, più che dalla presenza o meno del gene. Sono state così classificate numericamente:

1. NOS neuronale (nNOS): NOS-1
2. NOS calmodulina-indipendente o "inducibile" (iNOS): NOS-2
3. NOS endoteliale (eNOS): NOS-3

L'espressione delle NOS tessutali è modulata da fattori di splicing. L'isoforma muscolare nNOS μ , altamente espressa nel tessuto muscolare scheletrico adulto e nel cuore deriva da uno splicing alternativo del pre-RNA della nNOS che coinvolge gli esoni 16-17 e che prevede l'inserzione di 34 aminoacidi. Inoltre vi sono tre distinti cDNA ampiamente espressi nel muscolo scheletrico e che contengono varianti dell'esone-1 generate da promotori alternativi del singolo gene nNOS.

L'espressione della nNOS è indotta in genere dall'ipossia, da insulti lesivi, dall'attività muscolare, dall'invecchiamento cellulare, mentre è ridotta dalla denervazione. La nNOS e la nNOS μ sono inibite anche dall'interazione con la caveolina-3 (componente del complesso distrofinico), impedendo il legame con il loro attivatore, la calmodulina.

Tutte e tre le NOS hanno una azione catalitica simile: un aminoacido L-arginina viene trasformato in una delle cosiddette molecole NO-correlate, e che possono essere l'NO stesso, i solfonitrosotoli (SNOs) e piccole quantità di perossinitrite (NO/O $_2^-$, metallo complesso dell'ossido nitrico). La nNOS probabilmente produce anche l'anione nitrossile. La disponibilità di cofattori e co-substrati, oltre alla localizzazione sub-cellulare, evidentemente influenzano la risultanza di un prodotto catalitico o un altro. Comunque vengono indicati genericamente con il termine NO.

L'NO o le relative molecole dunque sono molecole-segnale. La loro reazione può avvenire con: 1) la cisteina, tramite S-nitrosilazione dei centri redox dell'aminoacido, ossidata così a disolfidi o acidi sulfinici; 2) con i metalli ferro (coniugato o meno all'eme) e rame, trasformati in stati di ossidazione più elevati.

Il significato della funzione della loro azione nella regolazione proteica non è molto chiara: se da una parte è certo il ruolo nelle reazioni redox, dall'altra è evidente il danno arrecato alle proteine. Nel muscolo in particolare le interazioni sono particolarmente intense con la rianodina (che può risultare attivata o inibita) e il c-GMP (la cui sintesi è aumentata, inibendo così l'accoppiamento eccitazione-contrazione; questo effetto è modesto in quanto la guanilato ciclasi è comunque poco espressa nel muscolo). La NOS nel muscolo inibisce la respirazione cellulare, legando la citocromo-c ossidasi, in quanto proteina contenente il gruppo eme.

Da un punto di vista strutturale la NOS è legata a livello del sarcolemma alla α -sintrofina, a sua volta associata alla distrofina. La α -sintrofina è particolarmente espressa nel muscolo scheletrico e cardiaco e a livello di placca motrice. La deficienza di distrofina causa una perdita anche della NOS, ed è dimostrato che rimpiazzando il gene della distrofina anche la nNOS viene correttamente ristabilita nel sarcolemma. Tuttavia la α -sintrofina e la distrofina non sono sufficienti a stabilizzare la nNOS al sarcolemma, e lo hanno dimostrato alcuni disturbi neurogenici. Il topo privato della nNOS per via transgenica inoltre non manifesta alterazioni di morfologiche e di integrità di membrana. Studi di immunisto chimica

hanno evidenziato che la nNOS è distribuita uniformemente in tutto il sarcolemma delle fibre tipo I e II nell'uomo, ma nei roditori e in altre specie solo nelle fibre tipo II. Come la α -sintrofina e altre proteine, è concentrata a livello di giunzione neuromuscolare e miotendinea.

Sia nell'uomo che nel topo mdx la nNOS, dissociata dalla membrana, si disperde nel citoplasma, dove si accumula. Tuttavia è presente in quantità minore alla norma, così pure il suo RNAm, per cui sembra esserne ridotta l'espressione. È stato sottolineato anche che la calpaina, proteasi cui la nNOS è sensibile, è presente nel muscolo affetto da DMD a livelli 20 volte superiori alla norma, perciò la pronunciata proteolisi tipica della DMD può diminuire l'attività della nNOS.

Da quanto detto sopra l'NO appare intervenire in molti processi cellulari intrinseci, (quali la regolazione proteica, il potenziale di riposo, la contrazione) ed estrinseci (quali la differenziazione dei mioblasti e l'afflusso di sangue durante l'esercizio -l'NO prodotto in questa fase causa vasodilatazione-), pur non essendo ancora chiari i meccanismi d'azione, o essendo descritti come dipendenti a molte variabili relative ai protocolli, alle concentrazioni, ai preparati muscolari etc. In particolare, per quanto riguarda i mioblasti, in fase intermedia di differenziazione, ossia nelle cellule competenti per la fusione in miotubi, è stata segnalato uno straordinario aumento dell'attività della nNOS. Una approfondita disamina circa tutte queste funzioni è stato condotta da Stamler-Meissner [38], cui si rimanda.

Nel muscolo distrofico la nNOS appare rivestire un ruolo chiave nella degenerazione miofibrillare dal momento che, concentratasi nel citosol, la formazione di perossinitrite (NO/O_2^-) dalla reazione con ioni superossido (O_2^-) e perossido di idrogeno (H_2O_2) causa pesanti danni ossidativi alle strutture subcellulari. [37]

La perdita dell'omeostasi del calcio è considerata una tappa precoce della patogenesi della DMD [8]. La distruzione del legame citoscheletro - matrice cellulare, a causa di una mutazione che riguardi qualsivoglia componente del complesso proteico membranario che funge da ponte, provoca una instabilità del sarcolemma che fa aumentare il flusso di calcio all'interno della cellula, esitando così nell'attivazione delle proteasi calcio dipendenti responsabili della morte cellulare [51][8].

È stato suggerito che le interazioni fisiche tra le proteine di membrana alterino in particolare il legame citoscheletro-AchR (recettore dell'acetil-colina), inducendo un'iperattività dei canali del calcio. I danni mitocondriali che ne derivano portano alla morte cellulare [14]. In vitro, il 20% delle miofibre mdx hanno un influsso di calcio aumentato di 10-30 volte rispetto alla norma, e il tasso di sopravvivenza delle fibre è ridotto di circa il 25% [51].

Tuttavia alcune ricerche su vertebrati inferiori fanno pensare che un'alterazione primaria dei canali del calcio possa determinare lesioni distrofiche

indipendentemente dalle mutazioni su proteine strutturali [nda]. Studi condotti sul nematode *Caenorhabditis elegans*, hanno infatti evidenziato l'influenza che riveste il gene *egl-19* (subunità maggiore del canale del calcio voltaggio-dipendente) nella gravità della degenerazione distrofica, in base ai seguenti eventi: mutanti nel gene che esprime la distrofina nematodica *dys-1*, e allo stesso tempo nel gene *egl-19* con *gain-of-function* (che esibisce contratture muscolari), manifestano una degenerazione muscolare assai maggiore rispetto ai mutanti nel singolo gene *dys-1*. Inoltre, individui con mutazioni in *dys-1*, nel gene *hlh-1* coinvolto nella capacità rigenerativa, e infine nel gene *egl-19* con *loss-of-function* (che esibisce totale flaccidità), manifestano una degenerazione muscolare minore rispetto ai mutanti in *dys-1* e *hlh-1*. [19]

La proteina citosolica detta parvalbumina è una proteina del sarcoplasma legante il calcio e che funziona da navetta tra la troponina C e il reticolo sarcoplasmatico [51]. Circa i dettagli dei suoi meccanismi d'azione si rimanda all'introduzione del paragrafo 5.1. Qui si vuole solo anticipare che tale proteina può spiegare perché l'alterata omeostasi del calcio nelle fibre muscolari avvenga nell'uomo ma non nei topi affetti da mutazione alla distrofina, e conferma l'ipotesi che la responsabilità sulla gravità della degenerazione distrofica sia primariamente attribuibile al calcio, più che alla proprietà fisica strutturale della distrofina [nda].

Lo studio delle mutazioni soppressore riveste un'enorme importanza nella comprensione dei meccanismi genetici alla base delle malattie ereditarie. Queste mutazioni sono così chiamate perché in grado di diminuire o sopprimere l'effetto di altre mutazioni. Gli invertebrati risultano particolarmente adatti per questo genere di studi, perché in grado di riprodursi in gran numero e in breve tempo. Un esempio è dato dalla ricerca di mutazioni soppressore in grado di correggere il danno dei geni mutati *dys-1* e *hlh-1* (*CeMyoD*) nel nematode *Caenorhabditis elegans*. [19]

Un particolare significato assumono i muscoli scheletrici estrinseci dell'occhio (MEO). Questi muscoli hanno alcune caratteristiche anatomo-funzionali che li differenziano dai muscoli scheletrici tradizionali, rappresentati di solito dai muscoli degli arti e dal diaframma [8].

Tali differenze sono facilmente giustificabili dalla tipologia di lavoro altamente specializzata che tali muscoli devono compiere. Scoperte interessanti hanno riguardato la loro innervazione e propriocezione [nda].

Nei MEO si riscontrano le fibre monoinnervate fasiche (SIFs, singly innervated twitch fibers) tipiche dei muscoli scheletrici dei mammiferi, ma anche fibre multinnervate toniche (MIFs, multiply innervated non-twitch fibers) tipiche invece di uccelli e altri vertebrati inferiori [27]. È stato riportato inoltre che i neuroni di primo ordine sono localizzati negli ungulati nel ganglio trigeminale (di Gasser), mentre negli altri animali nel nucleo mesencefalico del trigemino così come i propriocettori

dei muscoli masticatori [18]. I fusi neuromuscolari e gli organi muscolo-tendinei sono stati rinvenuti nei MEO dell'agnello, della capra, del vitello, del maiale, dell'uomo [18] [32], della scimmia e del cavallo [32]; il gatto, il cane [18] [32] e il coniglio [32] sono specie sprovviste di fusi, ma l'innervazione sensitiva dei MEO è particolarmente ricca [32]; qualche Autore riferisce la presenza nel cane e nel gatto di propriocettori che non sono propriamente fusi, pur avendone le proprietà [18]. Per evitare di appesantire troppo l'argomento infine si rimandano a [32] i dettagli riguardo le principali differenze tra i fusi neuromuscolari dei muscoli scheletrici classici e i fusi neuromuscolari dei muscoli estrinseci dell'occhio. È opportuno invece accennare alle sempre più complesse e numerose differenze che riguardano l'assetto istochimico delle fibre dei MEO e che stanno emergendo in questi ultimi anni. Alcune ricerche hanno riscontrato nei foglietti orbitale e del globo dei MEO di coniglio la presenza di una isoforma della catena miosinica pesante presente anche nei muscoli laringei, ma non negli altri muscoli scheletrici [28]. Oltre alla diversa origine embriologica i MEO hanno mantenuto alcune caratteristiche tipiche delle miofibre indifferenziate attuando un ritardo nel tempo di sviluppo dei miotubi multinucleati [29] generati dalla fusione dei mioblasti [33]. Si riscontra infatti una co-espressione dell'isoforma fetale e adulta dei recettori dell'acetilcolina, e anche l'espressione della sintrofina $\beta 1$ è mantenuta lungo tutto il sarcolemma come nella fibra embrionale, mentre nei muscoli scheletrici tradizionali si concentra a livello di placca [27]. L'interpretazione dei risultati brillantemente ottenuti in questo campo della ricerca appare molto complicata [nda], anche per il fatto che a differenziare il fenotipo dei MEO dalla linea cellulare dei precursori muscolari è soprattutto l'influenza di fenomeni epigenetici [8] e di fattori di differenziazione cellulare (cell lineage factors) [27]. Nonostante poi l'approccio comparativo sia fondamentale per scoprire nuovi aspetti anatomo-funzionali o per trovare conferma di ipotesi vincolanti il progresso dello studio, si deve sempre tener presente ciò che è complessivamente dimostrato, soprattutto quando le nozioni paragonate sono così altamente peculiari [nda], e alcuni autori affermano: «I muscoli estrinseci dell'occhio umani dispongono di un assetto fibrillare e una composizione in catene pesanti di miosina davvero complesso, e differiscono notevolmente dai muscoli estrinseci dell'occhio delle altre specie» [30].

Si è voluto soffermarsi su queste differenze per evidenziare che esse testimoniano indubbiamente anche la diversa reazione dei MEO a stati morbosi che coinvolgono il muscolo scheletrico; infatti risultano i principali bersagli insieme ai motoneuroni nelle miopatie tiroidee, nella Miastenia grave e nella Fibrosi congenita, mentre sono in varia misura risparmiati in alcune distrofie muscolari, quali la DMD (dove si ha la perdita della proteina intracellulare distrofina) e la CMD (dove è persa la proteina extracellulare $\alpha 2$ -laminina). [8]

Vi sono molte difficoltà di fronte allo studio sui MEO, sia per l'accessibilità limitata per prelievi biotici nell'uomo, sia per la piccola quantità di tessuto ottenibile dai modelli animali. Sono state proposte quattro ipotesi sui possibili meccanismi che intervengono a difesa di questo gruppo muscolare [8]:

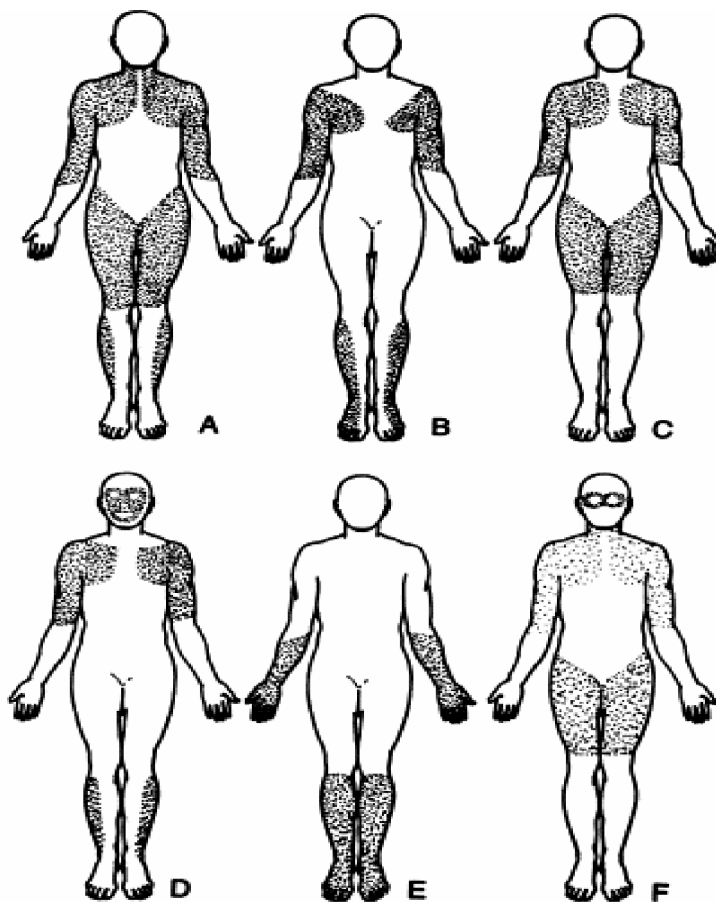
1. Ipotesi sull'omeostasi del calcio. Sia nell'uomo che negli animali DMD vi è mancanza di distrofina nei MEO; ci si aspetterebbe un mancato controllo dell'omeostasi del calcio come già descritto; invece la piccola dimensione delle fibre e l'abbondanza di reticolo sarcoplasmatico e di calcio e Ca^{2+} -ATPasi aumentano la capacità di gestire i flussi di questo ione: non per altro sono fibre di straordinaria rapidità di contrazione e in grado di sostenere contrazioni tetaniche per periodi estesi. Inoltre l'aminoacile, anestetico locale miotossico che rompe il sarcolemma e aumenta il calcio intracellulare, crea danni limitati ai MEO, mentre il calcio ionoforo non provoca la loro morte addirittura a dosi potenzialmente letali per ogni altro tipo cellulare [8].
2. Ipotesi sul tamponamento dei radicali ossigeno (reactive oxygen species scavenging): la forma reattiva dell'ossigeno sembra avere un ruolo importante nella morte neuronale in malattie quali l'Alzheimer e il Parkinson. Il ruolo che riveste nelle distrofie muscolari è rivalutato con il fatto che nelle miofibre del topo mdx l'apoptosi precede l'instaurarsi della necrosi e si riscontra aumentata produzione di radicale ossidrilico; inoltre se le miofibre mdx paragonate a quelle di controllo sono ugualmente sensibili al danno indotto da calcio-ionoforo, sono invece il doppio sensibili all'ossigeno reattivo nei preparati in vitro. Sempre in vitro, la somministrazione di antiossidanti esogeni a fibre distrofina-prive esalta la miogenesi. Si può supporre che la distrofina abbia un ruolo nella protezione agli stress ossidativi. Le fibre MEO hanno un'alta capacità anti-ossidativa, dovuta non esclusivamente al meccanismo della perossidazione lipidica, tra l'altro messo in atto nella stessa misura anche dagli altri muscoli scheletrici nel topo mdx. Probabilmente ha un ruolo anti-ossidante anche l'omeostasi dell'ossido nitrico (NO), che risulterebbe proprio a differenza degli altri muscoli scheletrici mdx conservata nei MEO, in cui tuttavia non è preservato l'enzima NO-sintasi, associato alla distrofina [8].
3. Ipotesi sulla sollecitazione meccanica limitata: è evidente che i MEO sono soggetti a un carico costante, che è l'occhio, mentre non sono soggetti ad alcuno stress indotto da variazioni di carichi esterni, come invece accade per i muscoli appendicolari. Risulta così soggetto a meno stress durante la contrazione anche il sarcolemma, che così si preserverebbe più facilmente in corso di distrofie. Questa ipotesi è difficile da sperimentare tramite test che utilizzino l'incremento di carico nei MEO distrofici, ed è messa in discussione dal fatto che i MEO nei mammiferi sono tra i muscoli a più spinto metabolismo ossidativo e più resistenti

alla fatica, con alti tassi di perfusione sanguigna, ed hanno assetto mitocondriale e corredo enzimatico ossidativo che li rendono estremamente attivi nei rapidi cambiamenti di movimento; i motoneuroni oculomotori raggiungono infatti frequenze di scarica di circa 600 picchi/secondo per superare l'inerzia iniziale dei movimenti saccadici, e 400 picchi/secondo per stabilizzare la posizione dell'occhio negli sguardi eccentrici. Ciò fa pensare che il sarcolemma dei MEO sia tutt'altro che soggetto a stress inferiori in paragone agli altri muscoli. [8]

4. Ipotesi sulla risposta adattativa muscolo specifica: nel topo mdx è stato evidenziato che vi è naturale sovraespressione di utrofina, anche se ciò non è stato segnalato nell'uomo. Alcuni dati fanno pensare che questa sia la ragione principale della resistenza dei MEO ai danni distrofici: vi sono studi che dimostrano che il topo deficiente di utrofina e distrofina ha marcati danni alla miofibra nei MEO, e studi che dimostrano un aumento di produzione di utrofina nei MEO di topi distrofici. Nella CMD la deficienza di merosina può inibire la soppressione dell'apoptosi sostenuta dall'integrina: se vi sia una proteina omologa nei MEO in grado di supplire il deficit non si sa. [8]

Dal punto di vista diagnostico, l'uso di esami immunoistochimici, analisi western blot, e altri studi genetici permettono di fare una precisa diagnosi nel singolo individuo, e di rendere consulenza genetica anche per diagnosi prenatali [14]. L'indagine immunoistochimica da preparati freschi o congelati di muscolo, sottoposti a colorazioni con anticorpi monoclonali o policlonali specifici per le proteine deficitarie, è fondamentale anche in medicina veterinaria, in quanto le osservazioni cliniche non possono essere da sole un criterio diagnostico affidabile, per qualsiasi forma [22]. È indiscusso quindi il costo-beneficio della diagnostica collaterale nell'emissione di una diagnosi certa, ma bisogna sempre tener presente che la disponibilità del proprietario a proseguire nell'iter diagnostico può essere di per sé un ostacolo che spiega la limitata casistica di distrofie muscolari negli animali domestici. E non andrebbe neppure sottovalutato quanto il veterinario di campo è disponibile, con o senza giustificazioni, ad approfondire quei casi in cui dei cuccioli muoiono, subito o poco dopo la nascita, per debolezza e insufficienza cardiorespiratoria, perché ciò è quello che avviene generalmente in caso di distrofia muscolare ereditaria [nda].

FIG_ 5.a [14]. Distribuzione dei principali gruppi muscolari affetti nelle varie DM dell'uomo.



- A. Duchenne-Becker
- B. Emery-Dreifuss
- C. LGMD
- D. Facioscapolomerale
- E. Distale
- F. Oculofaringiale

5.1 Distrofie muscolari associate al cromosoma X (DMD e BMD, distrofie tipo Duchenne e tipo Becker)

I principali modelli animali per la DMD sono il topo, il cane il gatto. In essi la mancanza di distrofina è accompagnata da necrosi e rigenerazione in maniera variabile a seconda della specie, con relativi sintomi clinici [7]. La mutazione della distrofina nella DMD infatti causa instabilità della membrana e necrosi della miofibrilla indotta dalla contrazione [15].

In origine la distrofina è stata riscontrata anche in neuroni normali : si è esclusa l'ipotesi neurogenica della malattia dimostrando che impianti di muscoli mdx in topi normali rimangono patologici, mentre restano normali muscoli sani in topi mdx [7]. Tuttavia in prossimità di fibre atrofiche le placche terminali dei nervi appaiono simili a piccoli bottoni, come processo degenerativo secondario [24]. Nel cane e nell'uomo la compromissione clinica è ingente per la degenerazione e la fibrosi muscolare che conducono a progressivi deficit strutturali e funzionali [7], anche se nella specie canina, all'interno della medesima cucciolata, i maschi affetti possono riportare sintomi di diversa gravità e alcuni soggetti possono sopravvivere per anni (vedi paragrafo sul 5.1.3 CANE) [1]. Nel topo e nel gatto la fibrosi è limitata e la rigenerazione conduce ad una ipertrofia compensatoria che riduce i sintomi clinici. In tutte e quattro le specie si riscontra comunque una prima fase di necrosi muscolare e rigenerazione, e in particolare nel cane dove sembra esserci una stabilità istopatologica dopo un primo anno di rapido declino. Inoltre l'assenza di infiltrazione fibroadiposa nel topo e nel gatto dimostra che essa non è un'effetto diretto della carenza di distrofina [7]. I modelli animali rivestono quindi un ruolo cruciale nella comprensione di queste malattie [7].

Nei mammiferi placentati il gene è associato al cromosoma X: per questo ogni animale che manifesta deficienza di distrofina come disordine ereditario legato al cromosoma X è un potenziale modello di studio per la DMD [15].

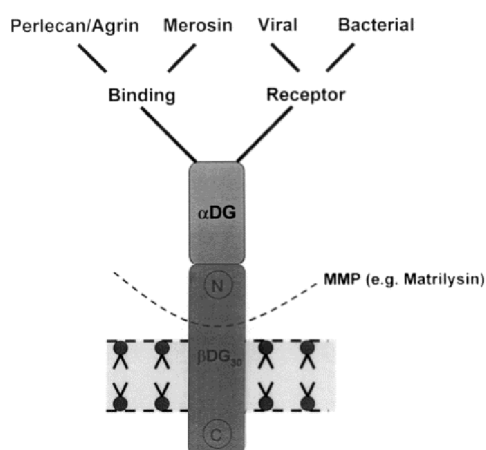
Tuttavia "l'idoneità" del topo, del cane e del gatto come modelli di studio della DMD umana è molto dibattuta nel mondo scientifico: senza dubbio questi modelli sono geneticamente omologhi data la mutazione loss-of-function riscontrata nel medesimo gene della distrofina altamente conservato, ma il fenotipo clinico oltre che a differire dal corrispettivo umano, è variabile tra le medesime specie. E lo stesso tessuto muscolare risulta eccezionalmente conservato attraverso l'evoluzione, per questo negli animali modello di DMD molti caratteri istologici sono comuni, quali la degenerazione-rigenerazione e la dimensione variabile delle miofibrille; compare ipertrofia in giovane età in tutte le specie (anche se esita in perdita di massa e di forza muscolare solo nel cane e nell'uomo); inoltre compare un elevato valore di SCK [15].

Usando un'innovativa tecnica di analisi del cDNA con microarray, sorprendentemente è risultata alterata l'espressione di oltre 90 geni nella miofibrilla colpita da DMD (e di oltre 30 geni nella EDMD): molti di questi geni sono sotto-espressi (come alcuni geni mitocondriali), altri sovra-espressi (in particolare quelli coinvolti in reazioni immunitarie) ma molti sono inspiegabilmente alterati; alcuni erano addirittura sconosciuti. La valutazione di questa grande quantità di nuove informazioni potrà in futuro svelare nuovi aspetti patogenetici.[14]

Diverse proteine deficitarie in particolari distrofie si sono dimostrate bersaglio di microrganismi. Il virus Coxsackie B3 ha la proteasi enterovirale 2A in grado di "clivare" la distrofina del muscolo cardiaco, da cui la cardiomiopatia in seguito all'infezione. Tuttavia l'NO (ossido nitrico) inibisce questo evento proteolitico. Ci si chiede allora se in bambini affetti da DMD, dove vi è carenza di NO, un'infezione casuale da parte di questi o altri virus possa predisporre alla cardiomiopatia.

In molti casi invece i meccanismi patogenetici degli agenti infettivi non coinvolgono direttamente le strutture proteiche, ma sono comunque causa di distrofia; ad esempio il virus NSI (non-syncitium-inducing) dell'influenza A inibisce il PAB2.

Alcuni batteri e virus legano l' α -dystroglicano, a sua volta unito al β -dystroglicano:



FIG_5.1.a [14]. Sito di clivaggio sul β -dystroglicano da parte delle MMP.

le metalloproteasi di matrice (MMP) in queste infezioni sono sovraesprese, in quanto sono in grado di tagliare la porzione N-terminale del β -dystroglicano [14].

Tutte queste osservazioni hanno fatto supporre addirittura un legame diretto tra distrofie muscolari e agenti infettivi.[14]

In futuro la comprensione dei meccanismi patogenetici comuni e non comuni a distrofie e a tali infezioni può aprire nuove interpretazioni riguardo la natura di processi patologici così diversi [nda].

Recentemente sono state scoperte proprietà sorprendenti di una proteina citosolica detta parvalbumina, e che ha spiegato alcuni meccanismi attraverso i quali il calcio provoca danni muscolari in alcune specie (uomo compreso) e non in altre (principalmente il topo) [nda].

Le fibre a rapida contrazione dei vertebrati inferiori e dei piccoli mammiferi (in questo caso i roditori [nda]) contengono un'alta quantità di parvalbumina (0,5-1 Mm), una proteina di legame con due siti ad elevata affinità per il Ca^{2+} , e con un'affinità diecimila volte inferiore per il Mg^{2+} . In condizioni di riposo del muscolo tuttavia la parvalbumina lega il Mg^{2+} . Durante la stimolazione, il Ca^{2+} che aumenta

nel sarcoplasma si lega alla troponina C, nonostante l'affinità per la parvalbumina anche in questo caso sia maggiore di quella per la troponina C. Ciò avviene per le seguenti ragioni: il "tasso" di legame del Ca^{2+} alla parvalbumina è limitato dalla sua lenta dissociazione del Mg^{2+} , e il legame del Ca^{2+} alla Troponina C (che non lega il Mg^{2+}) è vincolato solo dai flussi di Ca^{2+} . Quando il calcio si dissocia dalla Troponina C alla fine della stimolazione, la parvalbumina lo lega subito accelerando l'instaurarsi del rilasciamento dell'ingranaggio miofibrillare. In seguito dalla parvalbumina il calcio è ceduto al reticolo sarcoplasmatico (SR) dove è immagazzinato secondo la fisiologia cellulare; in questo caso è constatato che l'affinità dell'SR per il Ca^{2+} è maggiore della parvalbumina. È stato dimostrato che le miofibre private della parvalbumina hanno un rilassamento più lento. [51]

Nel topo mdx e nel topo normale la parvalbumina è fortemente espressa, i livelli di calcio a livello muscolare sono uguali, e non ci sono riscontri di miofibre mdx con gravi degenerazioni. In corso di DMD umana invece i livelli di calcio aumentano [8], la degenerazione è grave e progressiva [2], e nel muscolo umano la parvalbumina non è stata rinvenuta [51]. Inoltre il topo mdx privo di parvalbumina va incontro a grave degenerazione muscolare con infiltrazione fibroadiposa [51].

Da queste osservazioni si è dedotto comunque che è il calcio di flusso (transient) e non quello normalmente presente nel sarcoplasma (resting) a modulare la parvalbumina. Le stesse proteasi cellulari responsabili dei danni cellulari a valle dei processi patogenetici delle distrofie si sono dimostrate sensibili specificamente al calcio di flusso [51].

5.1.1 UOMO

È il primo disordine ereditario in cui si usò un marker del DNA per localizzare il gene responsabile (1982), e in cui si usò la tecnica allora rivoluzionaria detta "reverse genetics", o "clonazione posizionale", per ottenere il prodotto genico alterato: la proteina sarcomerica distrofina (1985). Il gene della distrofina risiede nel braccio corto del cromosoma X (Xp21). Nella DMD la distrofina risulta essere assente, mentre nella BMD vi è una sua riduzione e l'andamento clinico è più benigno [14].

Tra queste due forme se ne inseriscono però altre di gravità intermedia [33].

L'incidenza di DMD nell'Europa occidentale è di 1/3500 maschi neonati [14][33].

La DMD è la più frequente miodistrofia progressiva umana [2] a diffusione mondiale [15]. I bambini maschi colpiti manifestano clinicamente la malattia intorno ai due-tre anni [33], sono costretti dall'età di dieci-dodici anni alla sedia a rotelle, e in genere soccombono per insufficienza respiratoria alla fine della seconda decade o all'inizio della terza [2]. La degenerazione riguarda principalmente le fibre II B, sostituite da fibre tipo I e II A [51] e in seguito da tessuto adiposo e fibroso [2]. È

riportata l'insorgenza di complicazioni a carico della muscolatura liscia del tratto gastrointestinale oltre che cardiaca, e deficit cognitivi non progressivi [33].

Partridge (1991) riporta che il 70% delle mutazioni DMD/BMD sono delezioni o duplicazioni entro il gene [7], mentre Emery ((2002) precisa che il 70% delle mutazioni DMD/BMD sono delezioni; le rimanenti sono varie mutazioni puntiformi e raramente duplicazioni [14].

La BMD è dovuta a una mutazione diversa nello stesso gene della DMD, per questo è considerata allelica alla BMD [15]. Nel 90% dei casi risulta esserci una mutazione frame-shift nella forma DMD (distrofina non funzionante e grave andamento clinico), e una mutazione in-frame nella forma BMD (distrofina anormale ma parzialmente funzionante con lieve andamento clinico)[14]. Delezioni nella parte centrale del gene sono asintomatiche o riportano lieve debolezza, ma con innalzamento della SCK. La morte per cardiomiopatia è più frequente in pazienti con delezioni negli esoni 48-49 che in pazienti con mutazioni altrove nel gene [14]. Nella BMD i sintomi compaiono un po' più tardivamente (i ragazzi riescono a camminare fino a 15 anni), trattandosi di una delezione che conserva la trascrizione e che genera una distrofina semi-funzionante [33].

La diagnosi è basata sulle osservazioni dei sintomi clinici e sul valore esageratamente alto di creatinina kinasi sierica (SCK), e una differenziazione delle forme è possibile con biopsie muscolari e analisi del DNA [33].

5.1.2 TOPO

Il topo mdx con mutazione spontanea fu casualmente identificato durante un'analisi sui globuli rossi condotta su colonie C57BL/10: questi individui riportavano, come accade nei processi distrofici, una CKS estremamente elevata, e in seguito si identificò una mutazione stop nell'esone 23 del gene della distrofina. Oggi con la mutagenesi si sono ottenuti altri alleli che manifestano un fenotipo sovrapponibile all'originario mdx.[15]

Non la debolezza muscolare ma innalzamento sierico di PK (piruvato kinasi) e CK (creatina kinasi) sono i primi rilievi clinici di topi di laboratorio con mutazione spontanea. Si tratta di una mutazione puntiforme che genera un codone di stop. Vi sono tre stadi : 1) normale sviluppo muscolare post-natale 2) improvvisa mionecrosi a 20 - 21 giorni 3) graduale riduzione della severità con l'età. Le lesioni sono necrosi segmentale di gruppi muscolari, rigenerazione compensatoria attiva (come nelle fasi iniziali di DMD). Quindi la necrosi diminuisce con l'età, si abbassano i livelli di PK e CK, rimangono una parziale disorganizzazione delle fibre e un diametro di poco superiore alla norma. Dopo una fase di transitoria debolezza, la crescita e la forza muscolare superano addirittura la norma; la salute dell'animale è preservata per tutta la vita, pur con un diaframma a progressione miosclerotica

simile alla DMD. Il quadro è simile nei topi con mutazione indotta con nitroso-etil-urea [7].

Nel 1996 si notò che l'effetto della mutazione è drammaticamente potenziato da un'altra mutazione, altrimenti silente: la mutazione MyoD. Questa mutazione, rinvenuta nelle cellule satelliti, riduce la capacità rigenerativa mioblastica [20]: di conseguenza è accelerato e aggravato indirettamente il processo degenerativo [nda]. Questo quadro però non è più riferibile alla forma DMD del topo, ma ad una Distrofia miotonica murina (vedi paragrafo 5.7 Distrofie miotoniche) [nda].

La stessa mutazione è rinvenuta anche in *C.elegans*, e le osservazioni ottenute a riguardo, riportate nel paragrafo apposito [nda], sono di estremo interesse [19].

5.1.3 CANE

La CXMD (canine X-linked muscular dystrophy), detta anche GRMD (golden retriever muscular dystrophy) [1][2][7] ma da non confondere con la DM ereditaria del cane Labrador retriever [2] o Miopatia del Labrador retriever [1], presenta necrosi non compensata da rigenerazione, per cui perdita di tessuto muscolare accanto a infiltrazione adiposa, fibrosa e diffusa calcificazione [7]. Inizialmente fu rinvenuta nella razza Golden Retriever (GRMD) negli USA e nell'Irish Terrier in Europa [24], poi nel Rottweiler, nel Samoyedo [2], ma molte sono altre razze sono coinvolte, quali il Dalmata, lo Shnauzer nano, l'Alaskan malamute, il Pembroke Welsh corgi [1].

Si è riscontrata una mutazione di splicing nell'esone otto del gene [15]. Alleli indipendenti sono stati rinvenuti nelle razze Rottweiler, Wire Hair Fox terrier (varietà a pelo ruvido del Fox terrier [nda]), Pastore delle Shetland e Short Hair German Pointers, ma la grande variabilità fenotipica di questi soggetti non permette di considerarli come modelli animali [15].

L'indagine immunoistochimica riporta l'assenza di distrofina nel muscolo scheletrico e cardiaco per mutazione di transizione (splice-site). Il western-blot dimostra nel cane una distrofina di 390 kDa, il 91% della grandezza normale (427 kDa), e a causa della mutazione è quasi completamente assente dalla miofibra [2].

La patogenesi è identica alla DMD [2] mentre la sintomatologia clinica è più variabile che nella DMD [7]. Tuttavia non sono riportate precisazioni di eventuali approfondimenti diagnostici collaterali comparativi tra i soggetti che manifestano sintomi di diversa gravità [nda].

Un riscontro particolare è quello riportato da alcuni Autori [24] circa una degenerazione muscolare alla nascita anche in alcune cagne, ritenute probabili portatrici del difetto su entrambi i cromosomi. È bene fare alcune osservazioni a riguardo. L'ipotesi che la mutazione sia presente su entrambi i cromosomi X della

femmina, presuppone che un cromosoma sia stato ereditato mutato dalla madre, e che il cromosoma paterno sia stato o ereditato mutato anch'esso, oppure che in tale cromosoma sia avvenuta una mutazione de novo in fase di pre-differenziazione del tessuto muscolare. [nda]

La prima evenienza, cioè che la mutazione al gene della distrofina sia stata ereditata dal padre, è improbabile dal punto di vista clinico (giacché un maschio distrofico avrebbe avuto modo di riprodursi), ma possibile, anche se straordinariamente rara, dal punto di vista teorico, in base ad un mosaicismo gonadico. Questo fenomeno prevede che una o più cellule gonadiche progenitrici (goni) abbiano subito una mutazione de novo ad un gene. I gameti che discendono dal quel gome recante la mutazione saranno portatori della mutazione, a fianco dei gameti sani derivati da goni sani. Un maschio potrebbe non avere mutazioni alla distrofina nelle cellule somatiche (e quindi essere clinicamente sano) pur producendo una frazione statisticamente limitata di spermatozoi portatori della mutazione, discendenti anche da un solo gome con la mutazione. La straordinarietà dell'evento non può spiegare più femmine affette in una sola cucciolata. [nda]

La seconda evenienza, cioè che sia avvenuta una mutazione in fase di pre-differenziazione del tessuto muscolare, è altrettanto rara e poco probabile soprattutto se come nel caso precedente si osservano più femmine affette in una sola cucciolata. [nda]

Tuttavia, in riferimento a questa fonte bibliografica [24], non è specificato quante femmine in una cucciolata risultavano colpite, e neppure se le femmine affette hanno riportato una degenerazione alla nascita e poi recuperata, oppure se hanno manifestato una distrofia vera e propria come i maschi affetti. Anche questa informazione può fare la differenza nel comprendere perchè alcune femmine possono manifestare debolezza muscolare fin dalla nascita. Infatti, le femmine portatrici del cromosoma X alterato, sono costituite da un tessuto muscolare che esprime per un 50% la distrofina normale di un cromosoma X, e per un 50% la distrofina alterata dell'altro cromosoma, e ciò per effetto del classico mosaicismo somatico dovuto all'inattivazione del cromosoma X. [nda]

L'inattivazione di uno dei due cromosomi X avviene in tutte le femmine di mammifero, ad uno stadio precoce dello sviluppo, ed è inattivato con probabilità 1:1 quello paterno o quello materno. L'inattivazione è stabile e irreversibile in tutte le cellule figlie, ed è controllata dal centro di inattivazione (XIC) espresso nel cromosoma inattivo. In realtà però non viene inattivato tutto il cromosoma: sfuggono a tale inattivazione i geni dell'estremità del braccio corto e pochi altri loci sul braccio corto e sul braccio lungo. [42]

Le femmine portatrici avranno perciò buona parte del tessuto muscolare compromesso, che tuttavia non degenera progressivamente perchè circa metà delle

fibre sono sane [nda]. In base a questo fenomeno si può spiegare anche il fenotipo descritto nell'unico studio riportato in bibliografia [43] riguardo a sette ragazze con sintomatologia riferibile a DMD: in alcuni casi le madri delle ragazze riportarono elevati titoli di SCK, talvolta un polpaccio ipertrofico oppure debolezza muscolare in quarta decade di vita.

SINTOMI. Compare sopra i due mesi di età [2], in genere a tre mesi circa [15] con debolezza e contratture muscolari [2] ad evoluzione rapida e progressiva [7] [15]. Fenotipicamente compare pseudoipertrofia muscolare, in quanto il muscolo non risulta ingrossato per aumento delle fibre ma per l'infiltrazione fibroadiposa [2]. Spesso compare inabilità ad aprire completamente la mandibola prima che si manifesti debolezza generalizzata [1]. La debolezza dei muscoli masticatori, della faringe e della lingua rendono difficoltosa la prensione e la deglutizione dell'alimento, e la scialorrea è la conseguenza dell'accumulo di saliva non deglutita in faringe [1]. L'andatura è rigida [2], tuttavia è mantenuta la deambulazione [15]. Talora si ha ipertrofia della coscia [2], dei glutei, dell'esofago e della lingua [15].

La progressione è più veloce che nella DMD (entro il primo il primo anno di vita) [7], ma con una fase di stabilità dopo l'aggravamento tanto che il cane può sopravvivere fino alla media età (in genere sei anni) [2][1][7]. Alcuni Autori [1] riportano quadri di gravità variabile: a fianco ai soggetti con la sintomatologia sopra riportata, vi sono cuccioli che muoiono entro i primi giorni di vita, dopo aver manifestato una progressiva ma rapida debolezza muscolare.

La morte può in ogni caso sopraggiungere in qualunque momento tra il periodo neonatale e l'età matura [15]. Può esserci morte precoce per cachessia, compromissione diaframmatica [2] nei cuccioli più gravemente colpiti [1], polmonite ab ingestis [1] e collasso cardiaco oltre l'età media [7][1].

Le concentrazioni di SCK, ALT, AST risultano elevate [1]. La SCK è da 10 a 20 volte più elevata alla nascita, da 500 a 1000 volte più elevata nel primo o secondo mese di vita [24]. L'esame elettromiografico è quello cosiddetto pseudomiotonico: attività spontanea marcata sotto forma di potenziali continui e poi interrotti di colpo (potenziali pseudomiotonici), diversi da quelli tipici della miotonia (myotonic bursts), caratterizzati da un rumore progressivamente crescente e calante ("waxing and waning") [1].

LESIONI ANATOMO-PATOLOGICHE. Sono coinvolti tutti i muscoli, compreso il miocardio (cardiomiopatia), ma soprattutto i muscoli linguale, temporale, diaframma, sopraspinato, trapezio e sartorio [2]. Alcuni muscoli, come il sartorio sono gravemente compromessi alla nascita [15]. I cuccioli che muoiono precocemente riportano striature di un colore che va dal giallo paglierino al bianco nei muscoli della spalla, del collo, dell'arto pelvico e del diaframma, e che possono coinvolgere tutto il muscolo [1]. I soggetti che manifestano la malattia tra le 8 -12

settimane non hanno striature così evidenti, anche se i muscoli colpiti possono apparire diffusamente pallidi e fibrotici [1], e nei soggetti di oltre sei mesi riportano macchie multifocali di un colore che può variare dal giallo al bianco nel miocardio, in particolar modo nel ventricolo sinistro, nei muscoli papillari e nel setto interventricolare [1]. I muscoli appaiono atrofici, pallidi, con striature giallastre ed emorragie. Vi è grande disomogeneità di dimensione delle miofibre di tipo I e II per l'atrofia irregolare che colpisce soprattutto le fibre tipo II. Vi è relativa predominanza delle fibre tipo I e alcune di queste hanno marcata ipertrofia (diametro di circa 250 µm), talora sono ialine, ipercontratte e in stadi avanzati riportano fenomeni di splitting (fessurazioni) e Ringbinden [2]. I nuclei si centralizzano e si dispongono a catena [1][2]. È sempre presente anche se non diffusa la degenerazione ialina segmentale che prelude necrosi, fagocitosi frammentaria, calcificazione, lieve rigenerazione e infiltrazione istiocitaria-fibroblastica [2]. I fenomeni rigenerativi sono più evidenti in fase iniziale: necrosi e rigenerazioni sono spesso ben evidenti nella stessa sezione istologica [1].

La diagnosi sui maschi affetti è basata sui sintomi clinici e su approfondimenti diagnostici (rilevamento della distrofina su colorazioni immunoistochimici su sezioni congelate di muscolo). Anche le femmine portatrici andrebbero testate a livello di DNA e inevitabilmente sterilizzate [1].

5.1.4 GATTO

È chiamata Hypertrophic Feline Muscular Dystrophy (HFMD). È molto rara. L'analisi immunoistochimica riporta assenza di distrofina nel muscolo striato, sia scheletrico che cardiaco [2]. Si instaura nei primissimi mesi di vita, comunque entro i 21 mesi [1]. I maschi colpiti mostrano ipertrofia generalizzata, evidente, nel collo, nel tronco, negli arti, nel diaframma e nella lingua, di cui si ha protrusione parziale [2]. Hanno riluttanza a muoversi e adducono i garretti [2], assumendo stazione rigida progressiva ma persistente [1]. Si ha difficoltà a saltare, stendersi e ad eseguire il grooming [1]. Le complicazioni possono essere conseguenza dell'ipertrofia dei pilastri del diaframma che comprimendo l'esofago causano rigurgito o megaesofago [2] e a lungo termine inanizione [15], oppure dell'ipertrofia della lingua che rende difficoltosa l'assunzione di acqua, che fa esitare in una sindrome iperosmolare [2] da disidratazione [15] con insufficienza renale acuta [2]. In particolare, sotto anestesia questi animali vanno incontro a rabdomiolisi acuta, letale se associata ad altri stress [2] [1]. Oltre alla rigidità muscolare si ha coinvolgimento cardiaco [15][1], con necrosi multifocali, mineralizzazione e fibrosi più che altro a livello di ventricolo sinistro, setto e muscoli papillari [1]. SCK, ALT e AST sono drasticamente elevate [1]. L'aspetto più interessante di questa malattia in questa specie è che i

muscoli conservano massa e capacità di generare forza [15]. Infatti i muscoli sono ipertrofici, a differenza dell'atrofia osservata nel cane e nell'uomo [1]. In questa specie inoltre non avviene infiltrazione fibroadiposa [1], per cui si parla di una vera e propria ipertrofia e non di pseudo-ipertrofia, tipiche del cane e dell'uomo dove l'infiltrazione è marcata.

Aspetti istopatologici simili stati osservati nei cani CXMD. Diminuiscono le fibre tipo I e IIA, aumentano le fibre tipo IIB. Nei gatti morti in anestesia si osserva necrosi ialina ed edema nell'endomysio per alterata permeabilità di membrana.[2]

In uno studio condotto negli USA nel 1989 su due maschi fratelli, si evidenziò la "rigidità muscolare", l'enorme ipertrofia di alcuni muscoli quali i pettorali, i nuchali e il diaframma; l'esame istologico riportò necrosi e rigenerazione notevoli e limitata fibrosi. Ma non fu possibile comparare i due esemplari e la madre con la DMD, essendo stati troppo tardivamente esaminati [7].

5.1.5 CAVALLO

Il riscontro di DMD nel cavallo sembra del tutto eccezionale. Si riscontra ipertrofia e ipertonicità in alcuni muscoli. All'esame istopatologico predominano le miofibre di tipo I; fenomeni ripetuti di splitting determinano l'aggregazione di un tipo di miofibra (clustering); le linee Z sono irregolari e il diametro risulta ridotto per perdita di miofibrille [2]. Inoltre si ha variazione del diametro delle fibre, vacuolizzazione, ialinizzazione, centralizzazione dei nuclei, e infiltrazione fibroadiposa [16]. Queste osservazioni provengono specificamente da uno studio approfondito del 1994 [16], condotto su un trottatore standardbred di sei mesi. Questo caso riportò lesioni sovrapponibili a alcune gravi distrofie dell'uomo (Distrofia miotonica e DMD) e alla distrofia muscolare progressiva della pecora. In particolare si riscontrarono ipertrofia e ipertonia dei muscoli gluteo medio e semitendinoso (su cui si eseguirono due biopsie), e la presenza di potenziali miotonici dai muscoli suddetti e dal muscolo semimembranoso.

Si esclude la possibilità che trattasse di una miotonia congenita dalla mancanza di sola ipertrofia, e dalla tipica precoce sostituzione di fibre muscolari con tessuto fibroso e adiposo. Questo ultimo carattere fece sospettare che la forma in questione fosse quella corrispondente alla DMD umana, ma la presenza di raggruppamento (clustering) di fibre di tipo I lo metteva in questione, in quanto non era riscontrato nella DMD [16]. Tuttavia lo stesso fenomeno è evidente nel cane [nda]. Non si esclude la possibilità che si trattasse di una distrofia miotonica dai riscontri elettromiografici, dalla marcata ipertrofia muscolare e dalla presenza di clustering e nuclei interni [16]. Come già specificato altrove, il clustering è tipico delle miopatie da denervazione, ma può comparire anche in presenza di sdoppiamento delle fibre

(splitting) massivo [16]. Nello studio in questione comunque non veniva esclusa esplicitamente la possibilità di un disordine neurogeno, e non si poterono condurre approfondimenti genetici per risalire alla causa primaria del disordine [nda].

5.1.6 Caenorhabditis elegans

Cos'è *C.elegans*. È un nematode che costa di 959 cellule somatiche, le quali derivano tutte da una medesima linea cellulare. Possiede muscoli scheletrici e non scheletrici. I muscoli scheletrici decorrono in senso longitudinale all'asse corporeo al



FIG_5.1.6.a
[40] Tre
esemplari di
C.elegans

di sotto della cuticola e permettono la locomozione attraverso onde sinusoidi di contrazione. Le miocellule differiscono dal muscolo striato mammifero in quanto non formano sincizi, sono tutte interamente post-

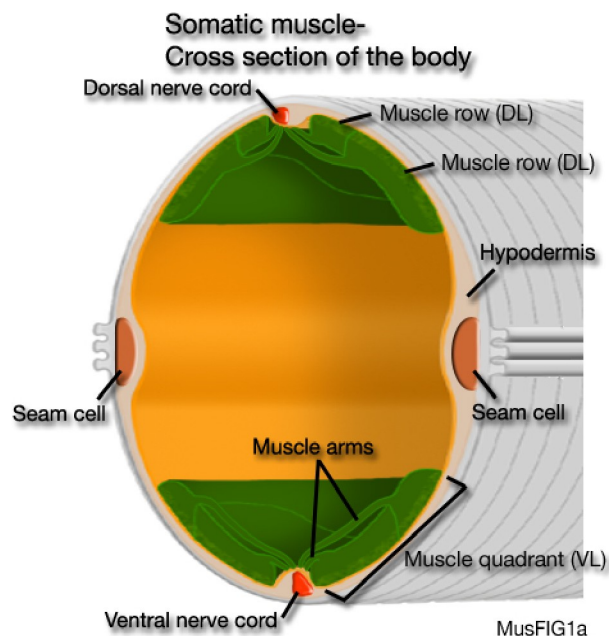
mitotiche, e non hanno cellule satelliti. Le componenti proteiche sono comunque molto simili. Non vi sono placche motrici, ma sono i muscoli, attraverso processi simil-dendritici chiamati bracci muscolari, a formare delle sinapsi con i motoneuroni.

Metà circa dei geni coinvolti nelle malattie umane sono riscontrabili in *Drosophila* e *Caenorhabditis elegans*: per questo gli organismi invertebrati sono particolarmente adatti per decifrare quei geni di cui ancora non si conosce la funzione biologica. [19]

Vantaggi e limiti sullo studio di *C.elegans*. È

un nematode che si rigenera in maniera rapida (una generazione ogni cinque giorni) e milioni di animali possono essere riprodotti a basso costo: questo è un evidente vantaggio in particolare nel rilevamento di mutazioni soppressore. In laboratorio possono crescere su terreni di agar seminati con *Escherichia coli* come nutrimento. Possono essere utilizzati individui ermafroditi autofecondanti, che

FIG_5.1.6.
b [40].
Struttura
della
muscolatura
scheletrica
assiale di
C.elegans.
Nei
nematodi le
braccia
muscolari
(muscle
arms) sono
digitazioni
muscolari
che vanno a
formare
sinapsi con i
cordoni
nervosi
ventrale e
dosale.



aumentano la velocità di esame e rendono i mutanti paralizzati generati non in grado di riprodursi, o individui maschi usati per l'incrocio tra animali di diverso fenotipo; questi ultimi sono il fulcro degli studi genetici. *C.elegans* può essere congelato e scongelato senza problemi, quindi conservato in numerosi esemplari per decenni, a bassi costi e in modo semplice. Le tecniche di studio immunocitochimiche ed elettrofisiologiche sono comunque molto difficili da attuare, perché difficilmente si penetra la cuticola senza ledere anche gli organi interni. Il fatto che siano difficili da studiare in vitro non è così determinante visto che le sperimentazioni fatte su colture di cellule di mammifero possono essere eseguite sull'intero parassita. [19]

Perché *C.elegans*? Gli invertebrati rispetto ai vertebrati hanno una sola proteina detta *dys-1* che funge sia da distrofina che da utrofina, pur essendo molto più simile alla prima che alla seconda; risulta inoltre esserci una sola isoforma, corrispondente all'isoforma mammifera più lunga espressa nel muscolo striato e non striato. Come nei mammiferi vi sono tre grossi domini: un dominio N-terminale, un dominio centrale costituito da β -spettrine, un dominio C-terminale; quest'ultimo è il più conservato in senso evolutivo e non a caso il punto più critico per l'attività della distrofina. Vi è una similarità di sequenza a livello proteico del 20%, già dimostrata sufficiente per ottenere una proteina di fusione (chimeric protein, ndt) con la sequenza proteica umana, disponibile all'85% della sequenza, e in grado di supplire alla deficienza di *dys-1*. Mutanti *dys-1*, per delezione o mutazione di stop, non hanno grossi deficit muscolari, con comparsa di segni degenerativi solo in età avanzata (10 giorni) e in non più dell'1% dei casi. Anzi, sorprendentemente invece mostrano iperattività, riportando maggiori ripiegamenti corporei da ipercontrazioni, con maggior sensibilità all'acetilcolina e agli inibitori dell'acetilcolinesterasi. [19]

Sono stati ritrovati anche geni omologhi della distrobrevina, della sintrofina e di alcuni distroglicani, ma non della NOS e del sarcospano [19].

Studi basati sulla genetica classica, che esamina il fenotipo di popolazione dopo mutazioni indotte casualmente, hanno permesso di identificare geni il cui prodotto interagisce funzionalmente con la distrofina in *C.elegans*. Dopo una mutazione indotta del ceppo selvaggio, si sono cercati nella progenie gli individui con fenotipo simile al *dys-1*. Comparvero, come ci si aspettava, nuovi alleli di *dys-1*, e inoltre mutazioni in altri quattro geni che si manifestavano con fenotipo simile a quello in carenza di *dys-1*. Questi quattro geni, pur esprimendo proteine diverse dalla distrofina, sono stati chiamati *dys-1*-simili, e sono stati isolati i prodotti genici di due di essi: la distrobrevina (gene *dyb-1*), e una proteina omologa alla CAPON - proteina nNOS-legante identificata nel ratto- (gene *dyc-1*). La distrobrevina interagisce con la distrofina a livello dei loro domini spiralati (coiled-coil), mentre la

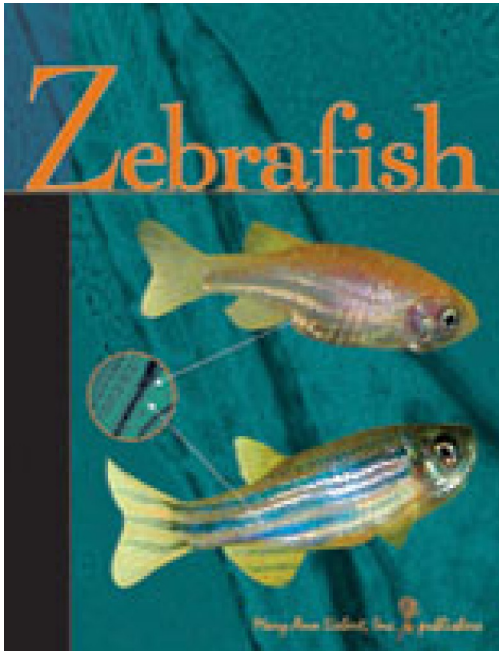
CAPON non è una proteina classificata e la sua funzione biologica è ancora sconosciuta. La CAPON è stata isolata con metodo Y2H, è espressa in *C.elegans* in una isoforma muscolare e una neuronale, e così sembra essere anche nei mammiferi; risulta avere una regione centrale ad α -elica probabilmente ascrivibile ad un dominio coiled-coil, responsabile della funzionalità della proteina, come dimostrato da analisi dopo delezione.[19]

È stato possibile esaminare, anche se non direttamente nelle cellule satelliti assenti nel nematode, il gene omologo del gene mioblastico murino MyoD, necessario per la rigenerazione delle cellule satelliti muscolari del topo. Detto gene in *C.elegans* è chiamato hlh-1 o CeMyoD. Il sinergismo di queste mutazioni esita in una degenerazione progressiva dei muscoli, non osservata nelle singole mutazioni: a partire dal settimo giorno, ossia a circa due giorni dopo l'età adulta, il 100% degli individui ha una locomozione anomala, talora con paralisi [19]. Questo sinergismo genetico è di estremo interesse perché conduce a risultati simili nel nematode e nel topo, tuttavia con meccanismi diversi [19], essendo il gene ubicato in diversi tipi cellulari [nda].

Di estremo interesse risulta essere anche la ricerca di mutazioni soppressori. Questo è possibile solo in generazioni mutanti sia per dys-1 che per hlh-1 [19] in quanto la sola mutazione dys-1 non reca danni evidenti [nda]. Quindi, una volta sottoposti gli individui dys-1 e hlh-1 all'azione di agenti chimici mutageni, si è analizzata la loro progenie sana, e si sono isolati diversi genotipi soppressori tuttora in fase di mappatura nei cromosomi di *C.elegans*, per essere identificati.[19]

5.1.7 DANIO RERIO (danio zebrato o "zebrafish")

Un modello animale recentemente introdotto negli studi di genetica dello sviluppo e oggi ampiamente diffuso [21] è il pesce Danio zebrato (Danio rerio, detto anche



Brachydanio rerio), appartenente alla famiglia dei Ciprinidi e originario dell'India, comunemente usato per analizzare la regolazione del sistema nervoso dei vertebrati a livello cellulare, genetico e molecolare [23]. Oramai sono stati standardizzati i metodi per ottenere embrioni aploidi della sola componente genetica femminile fecondando cellule uova con spermatozoi a DNA inattivato da raggi UV, gamma o agenti carcinogeni; gli embrioni quindi possono essere resi diploidi inducendo stress termico o pressorio nei primi stadi di sviluppo [23]. Questa partenogenesi artificiale consente di ottenere fenotipi mutanti

osservabili in modo pratico e veloce [23]. D.rerio è un modello animale particolarmente indicato per il suo rapido sviluppo e per i suoi muscoli somatici relativamente ben sviluppati e facilmente accessibili [21].

Le prime fibre a differenziarsi sono quelle a contrazione lenta, circa 16 ore dopo la fecondazione, che migrano verso la periferia laterale dei somiti; solo in seguito a questa migrazione si sviluppano le fibre a contrazione rapida, che occupano la maggior parte del somite. A 24 ore dalla fecondazione i somiti sono ben delimitati da strutture tendinee laminari che si dispongono ortogonalmente a formare miosetti orizzontali e miosetti verticali. Questi siti di aggancio, che fissano la muscolatura alla notocorda, si sono rivelate colpite da una mutazione patologica che causa un loro fallimento meccanico [21].

Dato che la miofibra muscolare è essenzialmente simile in tutti i vertebrati, anche in D.rerio si sono valutate le correlazioni tra la funzione genica del complesso glicoproteico associato alla distrofina (DAGs) e la distrofia muscolare. Il complesso proteico associato alla distrofina è abbastanza conservato in D.rerio; nell'embrione del pesce è situato a livello di una zona terminale specializzata della fibra detta end attachment point, zona terminale di aggancio. Nel 2001 si è identificato l'RNAm del gene ortologo della DMD nell'embrione di D.rerio (si definisce ortologo un gene che in una specie animale diversa esprime una stessa proteina [31]). In seguito si è dimostrato che i DGC come nel topo sono essenziali per la differenziazione normale della fibra muscolare e che la loro mancanza impedisce la disposizione geometrica funzionale delle proteine sarcomeriche, il cui esito è l'assenza di contrazione. Nel

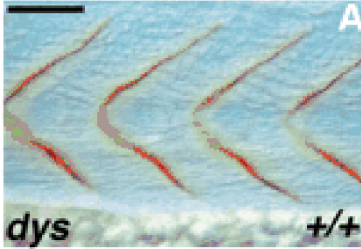
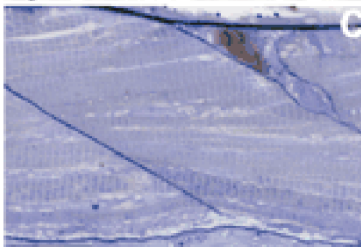
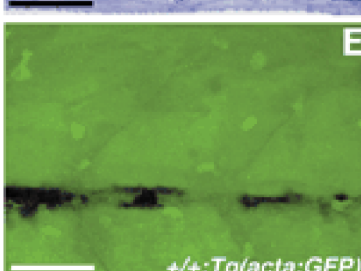

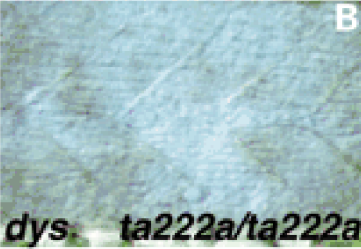
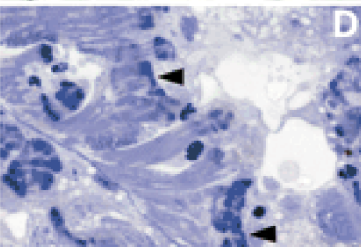
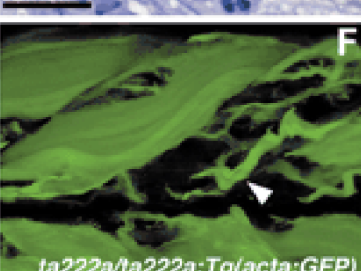

2003 si è ottenuta un'analisi immunoistochimica della distrofina di D.rerio adulto; con sonde anti-distrofina si è quindi segnalata la sua presenza in sezioni trasverse di muscolo; infine, l'analisi Western Blot (WB) ha confermato l'esistenza di una gamma di isoforme di distrofina, così come accade per i mammiferi. [21]

Molti loci del gene, se mutati, esitano in un fenotipo molto simile a quello espresso nella distrofia muscolare umana: compaiono lesioni muscolari nei somiti già al secondo giorno di sviluppo dopo la comparsa del movimento e la patologia gradualmente si aggrava fino alla morte, che sopraggiunge prima dello stadio maturo. Di particolare interesse però è un locus, detto *sapje* (*sap*), la cui mutazione rivela un meccanismo patogenetico caratteristico. Il gene *sap* è ortologo del gene coinvolto nella DMD ma la mutazione esprime un fenotipo molto più severo del modello murino *mdx*. La distrofina è persa nel punto terminale di aggancio. Dove i siti di aggancio sono sfasati si ha distacco ad una estremità, contrazione parziale della fibra distaccata, sarcolemma compresso o collassato e infine condensazione nucleare fenomeno che sta ad indicare morte cellulare, e non presente nelle fibre vicine non distaccate.

Al di là delle lesioni comuni la patologia differisce dai mammiferi, dove la distrofina si estende lungo tutto il sarcolemma. Nel muscolo dei mammiferi le giunzioni specializzate che trasmettono la forza tra le terminazioni delle miofibre sono presenti a due livelli: 1) tra queste in senso termino-terminale e termino-laterale 2) nelle lamine fibrose (chiamate "intersezioni tendinee") che separano segmenti di fibre che non si giustappongono. Pur essendo entrambi i siti ricchi di distrofina, solo le seconde hanno struttura simile ai punti di attacco terminali distrofina-dipendenti di D.rerio. Il difetto di queste giunzioni a diversi livelli dell'impalcatura connettivale potrebbe spiegare la variabilità della patologia tra i gruppi muscolari, nonché tra le varie specie animali. [21]

La mutazione *sap*, ricalcando la mutazione nonsense N-terminale della DMD, può essere quindi un nuovo modello per lo studio di questa malattia soprattutto in riferimento ai difetti nei punti di attacco della miofibra, aspetto questo finora trascurato anche per il fatto che le biopsie muscolari si eseguono lontane da strutture tendinee per semplificare l'esame istologico. [21]

Per quanto riguarda l'utrofina, non è stata ritrovata nei siti terminali di aggancio dell'embrione e non è presente nel sarcolemma non specializzato, ma si riscontra nell'epidermide e nel pronefro [21].

Soggetto wild type	Soggetto distrofina-privo	
   	   	<p>FIG_5.1.7.a [21] Immunoreazione alla distrofina (A,B); colorazione in blue di Toluidina (C,D), emissione di fluoresceina (E,F), colorazione vitale Evan blue - fluoresceina rossa (G,H). I soggetti distrofina privi mostrano fibre staccate e retratte in ogni prova.</p>

5.2 Distrofia muscolare tipo Emery-Dreifuss - emerinopatie - (EDMD) e lamininopatie (LMNA)

5.2.1 UOMO

Con questo nome vengono chiamate in realtà forme di distrofia muscolare i cui difetti genetici sono riconducibili a prodotti diversi: l'emerina e le lamine A/C. [36]

Il danno al gene dell'emerina, trasmesso in via eterosomica (X-linked) recessiva, esprime una sola forma di EDMD. [36]

Il danno al gene delle lamine, chiamato LMNA e trasmesso in via autosomica, manifesta diverse forme di lamininopatia. Sono circa 124 le mutazioni rinvenute responsabili di lamininopatia (riscontrate in 136 famiglie e 120 casi isolati). L'80% di esse sono missense. [36]

Talvolta il termine EDMD è riferito a entrambe le forme, e sono specificate come EDMD X-linked o EDMD autosomiche dominante (AD-EDMD) e recessiva (AR-EDMD) [11].

Queste forme distrofiche sono relativamente benigne, compaiono nell'infanzia e hanno progressione lenta, caratterizzata clinicamente da: 1) contratture precoci, anche prima della comparsa di un indebolimento muscolare, a carico di spalle, tendini d'Achille e muscoli del dorso (post-cervical muscles), che limitano la flessione del collo in prima fase e poco dopo di tutta la schiena [11]. 2) Precoce (relativamente al decorso della malattia) e progressivo indebolimento e deperimento muscolare a distribuzione omero-peroneale (a carico della muscolatura prossimale negli arti superiori e a carico della muscolatura distale negli arti inferiori). Comunque la debolezza si estende alla muscolatura del bacino in fase avanzata [11]. 3) Disturbi di conduzione cardiaca di vario grado, da bradicardia sinusale a blocco di terzo grado, in genere dopo la terza decade, quando la debolezza muscolare è avanzata [11] [13].

La diagnosi differenziale si basa su osservazioni cliniche e indagini immunoistochimiche, in quanto la biopsia non permette la differenziazione [11]. Le indagini immunocitochimiche sono condotte anche su biopsie della cute e strisci buccali, e il Western-blotting su globuli bianchi [11].

Dal punto di vista patogenetico sono principalmente tre le ipotesi che spiegano come mutazioni a proteine ubiquitarie abbiano effetti patologici tessuto-specifici. In primo luogo si è preso in esame l'influenza che le proteine dell'envelope hanno sull'espressione genica alcune proteine della cromatina (ad esempio la protein-1, la protein-BAF). Non molto accreditata è l'ipotesi che tali proteine abbiano un ruolo di integrità strutturale ("mechanical stress" hypothesis), per cui destabilizzato il nucleo tutta la fibra ne risentirebbe. Terza ipotesi prende in esame l'affinità delle lamine alle caspasi, per cui compaiono figure apoptotiche quali il distacco

cromatinico e i clustered NPC (nuclear Pore Complexes), condizione che si genera tuttavia solo dopo che tali enzimi sono venuti a contatto con la lamina nucleare interna, per cui il danno delle caspasi alle lamine non sembra essere l'evento patogenetico primario.

Nella forma recessiva associata al cromosoma X (X-linked), il difetto genetico risiede nel gene dell'emierina, proteina dell'envelope nucleare [15] [11]. L'incidenza è di circa 1/100 000 [11]. Le mutazioni, circa 100, hanno la seguente indicativa incidenza [11]:

- 39,5% piccole delezioni
- 31% mutazioni non-sense
- 15.5% mutazioni in siti di splice
- 8,5% mutazioni missense
- 4% grandi delezioni
- 1,5% delezioni ai promotori

Gli esami Western-blotting e immunocitochimico riportano completa assenza di emierina nell'86% delle mutazioni, ma essendo presenti livelli quasi normali di RNAm dell'emierina, si pensa che siano le mutazioni al sito di aggancio alla membrana nucleare interna dell'estremità carbossi-terminale a rendere instabile la proteina. Le rare mutazioni missense esitano in fenotipi meno gravi, in quanto la proteina è espressa in quantità ridotta. [11]

Alterazioni ultrastrutturali in misura variabile sono osservati a carico del 10-18% dei nuclei di fibre muscolari e fibroblasti: si va dalla condensazione marcata della cromatina al danno completo delle componenti muscolari. In numerosi nuclei, la disgregazione della membrana comporta l'estrusione della cromatina nel sarcoplasma.[11]

I sintomi compaiono in prima adolescenza (<15 anni) con leggera debolezza e successive contratture. Il decorso talora progressivo è moderatamente benigno, e solo eccezionalmente si ha perdita della deambulazione. [11]

Forma autosomica dominante (AD-EDMD). Nel 1999 si è scoperto che il difetto genetico di queste forme distrofiche risiede nel gene LMNA delle lamine A e C [11][15]. L'incidenza delle laminopatie è ancora sconosciuta [11]. Sono 32 le mutazioni al gene LMNA finora rinvenute, 27 missense. Sono comprese tra gli esoni 1-9 (comuni alle lamine A/C) e una missense nell'esone 11 (specifico per la lamina A).[11]

La sintomatologia e il decorso sono variabili: vi sono forme a insorgenza precoce, altre tardive, solo raramente a progressione rapida. Generalmente il quadro è leggermente più grave della forma eterosomica. Il quadro clinico è compatibile con altre distrofie muscolari, e l'esito talvolta aspecifico degli esami ultrastrutturali rende difficile la diagnosi di laminopatia. [11]

L'analisi immunocitochimica della lamina A/C e dell'emerina, da biopsie muscolari da pazienti AD-EDMD, non mostra infatti differenze evidenti dai preparati di controllo. La struttura dell'envelope nucleare non è molto alterata. Solo a livello ultrastrutturale si nota alterata distribuzione della cromatina, ma solo in una piccola proporzione di nuclei. [11].

Forma recessiva associata al cromosoma X (X-linked). Nel 2000 si è scoperto che anche la forma autosomica recessiva è dovuta a mutazioni del gene LMNA [11]. E' tuttavia una forma molto rara [11], detta anche Malattia di Charcot-Marie-Tooth tipo 2 (AR-CMT2) [36]. La malattia insorge nella seconda decade di vita, colpisce gli arti inferiori e manifesta grave indebolimento e a-riflessia. È accompagnata da un processo assonale degenerativo (riduzione o assenza del potenziale d'azione dei nervi sensoriali). Quindi vi è un chiaro coinvolgimento dei nervi periferici. [36]

Nella displasia mandibuloacrale il fenotipo è contraddistinto da alcuni segni particolari: bassa statura, mandibola e clavicola sottosviluppate, riassorbimento delle falangi distali, faccia di ridotte dimensioni con naso adunco, voce a toni alti, rigidità articolare, alopecia e pigmentazione a macchie della pelle. In particolare la risonanza magnetica ha dimostrato che a fianco di una normalità muscolare vi è una anomala distribuzione del tessuto adiposo sottocutaneo, completamente assente nel tronco e negli arti e marcatamente accumulato attorno al collo ("buffalo hump"). A livello addominale la sua distribuzione è normale. Non vi sono disfunzioni cardiache, non vi è debolezza e i valori di SCK sono normali. Tuttavia nei pazienti affetti si riscontra diabete e insulino-resistenza. Quindi vi è un chiaro interessamento dei tessuti osseo, adiposo e cutaneo, e si ritiene che vi siano altri geni coinvolti in questa patologia. [36]

Alcuni Autori [12] hanno però messo in luce come le mutazioni legate al gene LMNA e che causano lamininopatia manifestino fenotipi variabili e riconducibili a malattie contraddistinte, e in particolare [12]:

1. Cardiomiopatia dilatativa: A) non associata a disturbi di conduzione atrioventricolare (ma con fibrillazione o flutter atriali) o associata a disturbi di conduzione atrioventricolare (bradicardia sinusale; blocchi atrioventricolari; aritmie sopraventricolari e ventricolari; in particolare, i valori di SCK sono normali in mutazioni al dominio centrale della lamina C, elevati in mutazioni al dominio di coda; l'età di insorgenza in genere è a 40 anni, ma registrato un esordio a 27 anni e una morte improvvisa a 18 anni); B) associata a variabile coinvolgimento del muscolo scheletrico, con o senza disturbi di conduzione atrioventricolare (la miopatia può ricalcare la EDMD o le LGMD; recentemente in una famiglia francese i disturbi cardiaci erano associati a una miopatia specifica del muscolo quadricipite -mutazione esone 6, dominio centrale-) [12].
2. Distrofia muscolare tipo Emery-Dreifuss, autosomica dominante o recessiva.

3. Lipodistrofia familiare parziale tipo Dunnigan (FPLD). La lipodistrofia comporta una perdita selettiva di tessuto adiposo da varie parti del corpo. Quando il problema è diffuso e non localizzato, può complicarsi con un quadro metabolico (insulino resistenza, statosi epatica...). Sembrano responsabili mutazioni missense all'esone 1 e 9.[12]
4. Distrofia muscolare dei cingoli tipo 1B [12][13](vedi paragrafo LGMD). Si vuole qui ricordare che la distrofia in questione coinvolge solo il cingolo pelvico risparmiando la muscolature distale degli arti inferiori, la progressione è lenta, non compaiono contractures precoci e i disturbi cardiaci sono tardivi.[13]
5. Displasia mandibulo-acrale. Autosomica recessiva, caratterizzata da bassa statura, ipoplasia mandibolare e clavicolare, acro-osteolisi, alopecia, voce a tonalità alta, displasia delle unghie, lipodistrofia. Sembrano responsabili mutazioni missense all'esone 9.[12]
6. Malattia di Charcot-Marie-Tooth tipo 2 (autosomica recessiva). Il decorso è acuto e severo e coinvolge prevalentemente la muscolatura prossimale.[12]
7. Sindrome distrofica multisistemica. È un nuovo quadro caratterizzato da FPLD, cardiomiopatia associata a difetti di conduzione, moderata distrofia. Sembrano responsabili mutazioni missense all'esone 1. [12]
8. Nuovo fenotipo "complesso": sindrome da lipoatrofia generalizzata, steatosi epatica, diabete mellito da insulino-resistenza, cardiomiopatia, papule leucomelanoderliche (ipocromia/ipercromia [nda]). L'interessamento cardiaco è di tipo valvolare, non di conduzione (noduli fibrosi alle cuspidi aortiche ispessite, ipertrofia concentrica ventricolare sinistra, insufficienza mitralica/aortica). Sporadica extrasistolia sopraventricolare. Sembrano responsabili mutazioni all'esone 2.[12]
9. Sindrome della progeria di Hutchinson-Gilford (HGPS). Il quadro consiste in un invecchiamento precoce, bassa statura, cute sottile, alopecia, osteoporosi, malformazione cranio-facciale. La morte sopravviene in giovane età, in genere per coronaropatia aterosclerotica. Sembrano responsabili due mutazioni all'esone 11 (de novo) e all'esone 2 (puntiforme). [12]
10. Sindrome di Werner "variante atipica". Ad insorgenza più precoce alla forma classica (simile alla progeria, autosomica recessiva). [12]

Il coinvolgimento cardiaco si ha in tutte le forme, eccetto in quelle sopra indicate al punto 5 e 6 [12]. Qualora un cardiologo si trova di fronte ad una miocardiopatia dilatativa ereditaria autosomica dominante, con blocco atrioventricolare, il gene candidato all'analisi è il gene LMNA [12].

5.2.2 ALTRI MODELLI ANIMALI

Non ci sono ancora modelli animali per lo studio della EDMD. Sono stati ottenuti topi con delezione di una regione comprendente gli esoni 8-11 del gene delle lamine A/C, da cui poter ottenere generazioni di omozigoti ed eterozigoti. Le osservazioni condotte hanno evidenziato che omozigoti ed eterozigoti hanno sviluppo fetale normale. Dopo la nascita la crescita degli omozigoti è ritardata da un quadro distrofico e compare morte prematura. Le indagini ultrastrutturali sul tessuto muscolare di questi individui evidenziano un envelope nucleare scombinato e dislocazione dell'emerina. Gli individui eterozigoti invece risultano normali anche a 6-10 mesi di vita, con minimi segni distrofici. [11].

Solo lo sviluppo di una terapia genica specifica sperimentata su affidabili modelli animali potrà in futuro garantire una cura a queste distrofie. Fino a quel momento la terapia è aspecifica, e mira a prevenire o curare gli scompensi cardiaci (pacemaker). [11]

5.3 Distrofie muscolari dei cingoli (LGMD, Limb-girdle muscle dystrophy)

In questo gruppo rientrano distrofie umane ereditate per via autosomica, dominante o recessiva. Di alcune forme è ancora incerto il gene responsabile e il prodotto genico, pur essendo nota la localizzazione cromosomica. Sono accomunate dall'indebolimento progressivo a carico dei muscoli degli arti e della cintura pelvica, talora anche del muscolo cardiaco, ma sono esclusi i muscoli facciali, extraoculari e faringei. Non vi sono deficit mentali come nelle distrofinopatie. Nella maggior parte delle LGMD il difetto risiede nell'espressione di un sarcoglicano, ma alcune forme non vedono coinvolte proteine connesse al DAGs [33].

TAB_ 5.3.a [5]. Classificazione delle LGMD e prodotto genico coinvolto.

<u>LGMD- autosomiche recessive [5][33]</u>	<u>PRODOTTO GENICO [5][33]</u>
-2A	Calpaina 3
-2B	Disferlina
-2C	γ -Sarcoglicano
-2D	α -Sarcoglicano
-2E	β -Sarcoglicano
-2F	δ -Sarcoglicano
-2G	teletonina
-2H	TRIM32
-2I	FKRP (fukutin-related protein)
-2J	Titina
<u>LGMD- autosomiche dominanti [33]</u>	<u>PRODOTTO GENICO [33]</u>
-1A	?
-1B	?
-1C	Caveolina 3

5.3.1 UOMO

Delle 15 forme di LGMD finora riscontrate, dieci sono autosomiche recessive (AR) e cinque sono autosomiche dominanti (AD). Tuttavia l'incidenza delle forme AR è del 90% dei casi [5].

Per quanto riguarda le AR-LGMD, è interessante uno studio condotto su 300 pazienti di 150 famiglie brasiliane. Le correlazioni genotipo-fenotipo sono ampiamente variabili : si osserva talora lo stesso comportamento clinico per distinte mutazioni, mentre ci sono casi in cui una medesima mutazione esprime distrofie a decorso grave, lieve o addirittura asintomatico. Le correlazioni sesso - gravità della distrofia pure sono variabili : nelle forme 2A e 2G i maschi sono più severamente colpiti, nelle forme 2H, 2I, 2J non vi sono dati evidenti, mentre nelle altre forme non vi sono differenze di sesso.[5]

TAB_5.3.1.a [5]. Incidenza delle LGMD su scala mondiale.

FORME PREVALENTI	PAESI
-2A	UE (Italia, Spagna et al) Brasile
-2I	Inghilterra
-2H	Hutteriti
-2J	Finlandia
-2C-2F	Brasile, Turchia, Nord Africa

La LGMD 1B è una lamininopatia con esito clinico simile alla EDMD, associata a cardiomiopatia. Rispetto alla EDMD tuttavia l'interessamento cardiaco è tardivo, la muscolatura distale degli arti inferiori non è colpita e il coinvolgimento della muscolatura pelvica è lentamente progressivo [13].

La LGMD 1C vede interessato il gene della caveolina 3 [33]. Le caveole sono microdomini di membrana costituiti da specifici lipidi e proteine. La caveolina 3 è l'isoforma muscolo-specifica localizzata nel sarcolemma e associata ai DAGs [33].

La LGMD 2A è la prima e finora unica forma di DM dovuta a difetto enzimatico e non strutturale. La calpaina 3 è una proteasi Ca-dipendente [5], coinvolta nel mantenimento della membrana miofibrillare [15]. È la forma di LGMD più frequente in Brasile e altre popolazioni. Riporta atrofia prossimale senza interessamento cardiaco e facciale, né deficit intellettivi. L'ipertrofia del polpaccio è rara in pazienti europei, più frequente in pazienti brasiliani. Presenta forme variabili, da gravi a lievi. La SCK è elevata in fase acuta.[5]

In uno studio di 163 casi in Europa si rilevata insorgenza all'età media di 13,7 anni, con perdita dell'abilità locomotoria in media a 17,3 anni dall'insorgenza. Nessuna differenza di sesso [5]. In uno studio di 93 casi (46 m + 47 f) in Brasile: nessuna differenza di sesso nell'età di insorgenza e di diagnosi. Nel 19% dei casi perdita dell'abilità locomotoria (due terzi dei soggetti sono di sesso maschile), all'età media di 29,7 anni per le femmine e di 18,6 anni per i maschi. Ciò dimostra una progressione più rapida nei maschi [5]. In uno studio di 66 casi in Italia: è stata rilevata la sproporzione tra femmine e maschi colpiti, 43 m e 23 f, forse perché nei maschi la progressione è più grave, quindi diagnosticata prima [5].

La LGMD 2B / MIOPATIA DI MIYOSHI include 1) la miopatia di Miyoshi, che interessa primitivamente la muscolatura del cingolo pelvico; 2) la forma 2B, che indebolisce il cinto toracico. Questa differenza si nota solo nei primi stadi, mentre a stadi più avanzati è difficile distinguere pazienti soggetti all'una o all'altra forma.

In entrambe le forme è interessata la disferlina, coinvolta nella stabilizzazione della membrana plasmatica [15]. È una proteina ancora poco conosciuta, forse in grado di legare il calcio e omologa alla proteina fer-1 di *Caenorhabditis elegans*, in cui appare correlata alla spermatogenesi [33]. Nel nematode *C.elegans* infatti tale proteina è responsabile negli spermatici della fusione delle vescicole citoplasmatiche con la membrana plasmatica [38]. L'incidenza è variabile da popolazione a popolazione; in Brasile è la seconda forma più frequente. Pur con ampia variabilità, tra le AR-LGMD è in media una delle forme più lievi. Un segno tipico è la perdita della capacità di camminare dapprima sulle dita dei piedi, poi sui talloni. Raramente i pazienti sono costretti alla sedia a rotelle e comunque in genere circa 10-20 anni dopo l'insorgenza. Non c'è coinvolgimento alla muscolatura miocardica e respiratoria. Preservate le capacità mentali. Rara l'ipertrofia del polpaccio. SCK elevata anche in stadio preclinico.[5]

Le forme LGMD 2C- 2F sono dette Sarcoglicanopatie. Mentre nel muscolo striato riscontriamo un complesso SGs- $\alpha\beta\gamma\delta$ + sarcospan, nel muscolo liscio e in altri tessuti riscontriamo una sostituzione del SG- α con il SG- ϵ . Mutazioni al SG- ϵ provocano un disordine non degenerativo al SNC autosomico dominante (sindrome da distonia mioclonica). Finora sono identificate 41 mutazioni nella subunità α , 20 nella subunità β , 10 nella subunità γ , 6 nella subunità δ . [5]

La maggior parte delle 15 mutazioni identificate cadono nei geni β -SG e α -SG, mentre solo una nel gene γ -SG; si distribuiscono tra cinque esoni ed esitano nella sostituzione di un aminoacido nel dominio extracellulare della proteina, che è la porzione più grande. Nella LGMD-2E(β -SG) invece sono segnalate mutazioni missense, frameshift e di splicing, ma nel 75% dei casi tra gli esoni 3 e 4. Nella LGMD-2D(α -SG) è segnalata solo una mutazione missense [5].

L'assenza di un qualsiasi SG induce la parziale o totale assenza di altri SG.[15]

Sono forme meno comuni della DMD[15]. In Europa e in Nord America prevale la forma 2D. In Nord Africa la prevalenza della forma 2C è quasi del 100%. In Brasile, dato l'alto grado di mescolanza di razze umane, si riscontrano tutte le quattro le forme; tuttavia, la forma 2F è la più prevalente, forse dovuta all'effetto del fondatore, dato il coefficiente di consanguineità del 100% per questo gene in questa popolazione. L'andamento clinico simile alla DM tipo Duchenne (DMD)[5], e possono essere ritenute fenotipicamente indistinguibili dalle distrofinopatie[15]. La SCK è elevata anche in pazienti con locomozione conservata. L'insorgenza infantile obbliga alla sedia a rotelle prima dei 16 anni. In alcune forme lievi di 2C-2E sono stati segnalati pazienti con riparazioni di mutazioni missense e nonsense.[5] Presente cardiomiopatia.[14] Sebbene meno diffuse della DMD, sono importanti modelli di studio dei processi distrofici [15].

La forma LGMD 2G è rara, segnalata in Brasile nel 1997. Rinvenuta in pazienti di quattro genealogie di origine italiana, eterozigoti di due differenti mutazioni nonsense. Non sono stati identificati altri casi di teletoninopatia in altre popolazioni, se non in pazienti italiani, in eterozigosi. Carenze di teletonina muscolare sono state identificate negli USA, ma senza mutazione associata, facendo sospettare si tratti di un effetto secondario.[5]

La forma LGMD 2H è riscontrata solo in una popolazione del Nord America, i Manitoba Hutteriti (60 casi). È una forma leggera di LGMD con debolezza prossimale, SCK quattro volte superiore alla norma e aspetti anatomopatologici ed elettromiografici tipici delle miopatie. Insorge nella 2°-3° decade e dopo lenta progressione si può perdere la deambulazione intorno alla 6° decade. Nessun deficit intellettivo, cardiaco, facciale. Riscontrata mutazione missense al codone 487 della proteina TRIM32, forse in uno dei sei domini NHL (sostituzione di un ac.aspartico con un'asparagina). Essendo persa nei pazienti la funzione di riconoscimento tra proteina segnale e proteina target nella degradazione proteosomica, si ipotizza sia proprio il dominio NHL il sito di interazione coinvolto.[5]

La forma LGMD 2I fa capo alla stessa mutazione della Distrofia Muscolare Congenita 1C (CMD1C). Sono forme riconducibili alla mutazione del gene FKRP (quattro esoni). La mutazione più frequente è missense nel gene C826A. Questa mutazione è presente in alcune famiglie LGMD di Hutteriti che non hanno mutazione in TRIM32, quindi è possibile eterogeneità genetica anche in queste popolazioni geneticamente isolate. La funzione di questa proteina non è nota, ma la sua struttura in sequenza è molto simile alle proteine coinvolte nella glicosilazione di molecole di superficie di membrana. Finché la FKRP non sarà quantificata attraverso titolazioni anticorpali, ci si affida a indici di CMD1C e LGMD-2I ottenuti con analisi

molecolari, e sono: riduzione di α -2 laminina, riduzione di segnale al western blot per la Beta 1 laminina e riduzione secondaria di calpaina 3.

Dapprima riscontrata in famiglie consanguinee in Tunisia, poi in diversi paesi europei; in Germania è la DM più differenziata dalla DMD e BMD. La DMC compare nelle prime settimane di vita e vi è incapacità a camminare; la forma 2I insorge nella 2°-3° decade ed ha lenta progressione. Entrambe manifestano elevata SCK, degenerazione della muscolatura toracica con coinvolgimento cardio-respiratorio.[5] La forma LGMD 2J è stata di recente identificata in portatori omozigoti di mutazioni della titina, provenienti da famiglie finlandesi. È una forma severa a insorgenza infantile. Portatori allo stato eterozigote invece manifestano una DM tibiale autosomica dominante, con sintomi clinici manifesti oltre i 35 anni. La titina ha molti siti di legame, in particolare con la calpaina e la teletonina.[5]

Dal punto di vista differenziale, un decorso lieve della malattia, con atrofia pelvica, incapacità a camminare sulle dita dei piedi ed livelli molto alti di CK fanno deporre per una LGMD-2B. Un decorso simile alla DMD, con atrofia toracica, depone più probabilmente per le forme 2A, 2I e le sarcoglicanopatie (2C-2F). Analisi sulla calpaina possono essere fuorvianti: pazienti con la forma 2A possono risultare normali o lievemente deficitari di calpaina, mentre può essere del tutto assente come sintomo secondario di altre DM. [5]

Tra i modelli animali delle DM autosomiche si riconoscono il topo, il criceto e il pollo, che tuttavia dimostrando discrete somiglianze patologiche con la DMD. Di questi, il più studiato risulta il topo dy [7].

5.3.2 TOPO

Vi sono due mutazioni alleliche del topo dy. Portatori omozigoti di questi alleli mostrano deperimento muscolare progressivo, necrosi e rigenerazione inefficiente delle fibre, infiltrazione fibrosa e adiposa. La progressione della patologia muscolare è simile alla DMD. Come nella DMD la durata di vita è accorciata, ma diversamente da questa mostra notevole deficit di mielinizzazione nelle radici dei nervi spinali [7]. Un modello animale per lo studio della forma 2B-miyoshi è il topo SJL, usato sia per esaminare sia la forma che manifesta l'insufficienza cardiaca che la forma che comporta la malattia autoimmune, a seconda della mutazione.[15]

Il modello transgenico *dsg* $-/-$ è privo di δ -SG, analogo al criceto Bio 14.6. Dal punto di vista meccanico risulta esserci un decremento di forza muscolare dopo attivazione da stiramento (lengthening-activation), al contrario del mutante *gsg* $-/-$, ma l'elevata specie-specificità dei comportamenti biomeccanici nei mutanti privi di δ -SG rende poco chiaro il suo ruolo nel muscolo. I rilievi istologici sono tipici delle DM, con morte cellulare, rigenerazione muscolare, infiammazione, fibrosi e ridotta sopravvivenza[15]. È stata evidenziata che la deficienza di δ -SG provoca anomalie

funzionali del muscolo liscio vascolare e danni ischemici nel muscolo scheletrico [15]. Il modello transgenico γ -SG $-/-$ è privo di γ -SG. Le proprietà contrattili in vitro non differiscono dal topo normale (wild-type), ma durante attivazioni da stiramento ripetute, la forza emessa è inferiore pur mantenendo l'integrità del sarcolemma: ciò suggerisce che il γ -SG non ha un ruolo meccanico nella resistenza di membrana agli insulti [15]. Il modello transgenico α -SG privo non esprime il trascritto e la proteina α -SG; riporta perdita completa del complesso sarcoglicanico e del sarcospano, e la DM sviluppata è simile alla forma umana omologa LGMD-2D [15].

Il modello transgenico β -SG privo riporta ipertrofia, ridotta forza specifica generata (intesa come forza per unità di sezione muscolare) come avviene nei topi α - e δ -SG privi. Mancano dati sulla rigidità passiva e sull'attivazione ripetitiva da allungamento [15]. Il modello transgenico disferlina-privato ma con intatte le componenti del DGC, creato da Bansal e colleghi, riporta una deficiente capacità di riparo Ca^{2+} -dipendente della membrana plasmatica dopo un danno indotto (normalmente in presenza di Ca^{2+} il riparo avviene entro pochi secondi). Le fibre muscolari non soggette a necrosi in questo modello transgenico evidenziano difetti strutturali, accumulo di vescicole sotto il sarcolemma e tentativo di riparo con uno o più strati di vescicole a ridosso delle lesioni, ma tali vescicole non sono in grado di fondersi. Probabilmente la disferlina è responsabile di tale fusione, ipotesi suffragata dal fatto che la disferlina contiene sei domini C2, e uno è calcio-legante. I domini C2 nelle sinaptogamine (proteine di membrana) fungono da sensori del calcio nel traffico vescicolare, nell'esocitosi e nei fenomeni di rilascio in neurotrasmissione. [38]

5.3.3 CRICETO

Identificato nel 1962, il criceto Bio 14.6 riportava una miopatia distrofica recessiva, e colpisce il muscolo scheletrico e cardiaco. Riporta i segni classici di distrofia muscolare, tra cui nucleazione centrale, miofibre di dimensioni variabili e necrosi. Nel 1997 si è scoperto che la mutazione loss-of-function risiede nel gene del δ -SG. Come nell'uomo la sua perdita provoca la deficienza degli altri tre sarcoglicani. I caratteri istopatologici e biochimici sono sovrapponibili alla LGMD-2F, ma l'andamento clinico è diverso: il criceto mostra ipertrofia muscolare notevole e morte precoce per arresto cardiaco, mentre l'uomo ha un coinvolgimento cardiaco limitato. [15]

Negli studi meccanici questo modello mostra secondo alcuni un aumento della compliance muscolare, mentre secondo altri non vi è un decremento di rigidità passiva [15]; questi referti contrastano in ogni caso con quelli ottenuti dal topo mdx e ciò suggerisce che le proprietà viscoelastiche del muscolo sono correlate in modo critico alla presenza-assenza di specifiche proteine ma anche al modello animale considerato [15].

5.3.4 CANE

La DM ereditaria del cane Labrador Retriever viene considerata abbastanza simile alle DM dei cingoli degli arti dell'uomo (LGMD). Era conosciuta anche come "disfunzione delle miofibre di tipo II", sospettata di essere associata a disfunzioni neuroendocrine, essendo presente una atrofia selettiva delle miofibre tipo II nell'ipotiroidismo e altre endocrinopatie [2]. È una malattia autosomica recessiva [1][2] non molto diffusa, presente in Europa, Nord America e Australia [2], ed è più frequentemente riscontrato nelle razze da lavoro o da sport che non nelle razze da mostra [1]. Colpisce cuccioli di entrambi i sessi ed è conclamata all'età di due mesi [1][24], con intolleranza all'esercizio e andatura rigida [24]. Escluse le mutazioni relative ai complessi glicoproteici di membrana e della distrofina, si ritiene che il difetto risieda nell'espressione della proteasi neutra calpaina 3 [2], come avviene nella forma LGMD-2A dell'uomo [nda].

I soggetti affetti manifestano segni di debolezza neuromuscolare entro i primi sei mesi di vita, con intolleranza all'esercizio fisico fino a collasso durante l'esercizio prolungato o esposizione al freddo. La perdita del riflesso tricipitale e patellare sono caratteristici. L'elettromiografia riporta esagerata attività spontanea ma normale velocità di conduzione nervosa. La SCK e l'AST, in genere nella norma, possono essere lievemente aumentate. Può essere presente megaesofago. [1]

L'esame anatomopatologico riporta marcata atrofia dei muscoli della testa, del tronco e degli arti. I muscoli appaiono di colore pallido e consistenza fibrosa. Vi sono piccoli e grandi gruppi di miofibre atrofiche, ipertrofia con fessurazioni e ringbinden, centralizzazione dei nuclei [2] e segmenti sparsi di fibre in necrosi o rigenerazione [1]. Si rinviene anche un raggruppamento di fibre per tipo (clustering), tipico dei disordini neuropatici, ma non vi sono segni di lesioni nervose periferiche [1]. La presenza occasionale di miofibre sottili e basofile con nuclei vescicolari indica lievi tentativi di rigenerazione [2]. È stato dimostrato che non sono colpite solo le fibre tipo II: ciò varia da muscolo a muscolo e da soggetto a soggetto [1]. Negli stadi avanzati compare rigonfiamento delle miofibre, infiltrazione lipidica, fibrosi progressiva dell'endomisio e perimisio [2], ed è stata notata spesso l'aumento delle fibre tipo I [1], e quindi loro netta prevalenza [2].

La diagnosi è basata sui rilevamenti clinici e deve essere confermata dalla biopsia muscolare. Sebbene la malattia non sia progressiva dai sei-dodici mesi in avanti, gli animali affetti devono condurre una vita da cane da compagnia [1], e devono essere esclusi dalla riproduzione.

È segnalata anche una Distrofia muscolare distale del cane Rottweiler. Nel muscolo dei cuccioli colpiti risulta diminuita la concentrazione di carnitina. È una malattia primaria che comporta anomalie di postura (posizione plantigrada e zampe anteriori

aperte all'infuori -mancinismo nda-). Le miofibre risultano atrofiche, vi è lieve mionecrosi, fibrosi endomisiale e sostituzione del muscolo con tessuto adiposo: fenomeni più gravi nei muscoli distali che nei prossimali. [2]

Tab_5.3.4.a [22;modificata]. Differenziazione clinica e diagnostica tra la Miopatia del Labrador Retriever e la Distrofia muscolare X-linked del cane.

	Miopatia del Labrador Retriever	CXMD
Sesso	Maschio e femmina	Generalmente maschi
Segni clinici	Scarso sviluppo muscolare, postura anomala	Rigidità dell'arto pelvico, disfagia, ipertrofia della lingua, ptialismo
Riflessi spinali	Ariflessia riflesso patellare	Normoriflessia o eventualmente iporiflessia
Età di insorgenza	3-4 mesi	Alla nascita o entro poche settimane di vita
SCK	Normale o lieve aumento	Aumento anche di 100X
Istopatologia	Cambiamenti miopatici e neuropatici	Cambiamenti distrofici (degenerazione, rigenerazione, fibrosi, calcificazione)
Prognosi	Stabilizzazione in 12 mesi	Infausta
Ereditarietà	Autosomica recessiva	X-linked
Deficit primario	Sconosciuto ?	Deficienza di distrofina
Terapia	Di supporto (evitare basse temperature; L-carnitina: 50 mg/kg per via orale due volte al giorno)	Non disponibile

5.3.5 VISIONE

Il visone fu uno dei primi modelli animali adottato per lo studio delle distrofie muscolari. Tra il 1974 e il 1976 G.A. Hegreberg e colleghi pubblicarono quattro articoli, descrivendo rispettivamente gli aspetti istopatologici (Apr 1974), istochimici (Ott 1974), genetici (Mar-Apr 1975) della malattia, e nella quarta pubblicazione (Apr 1976) definirono il visone come utile modello animale per gli studi comparati. Allora il fenotipo del visone ricalcava quello determinato nell'uomo dalle cosiddette "forme amiotoniche di distrofie muscolari" [49], con tutta probabilità da riferire oggi alle LGMD. Non sono riportati in bibliografia ulteriori lavori oltre a quelli citati. [nda] Sembra essere trasmessa in modo autosomico recessivo (in eterozigosi le alterazioni non sono presenti) [50]. Colpisce visoni dall'età di due mesi. Il primo sintomo è un'andatura malferma [2]. I muscoli degli arti sono atrofici, così come i muscoli temporali, per cui la testa appare più piccola. Le miofibre quindi in genere

sono ridotte di volume, ma occasionalmente compaiono fibre ipertrofiche. I nuclei si centralizzano e tendono a vacuolizzare. Compaiono fenomeni di degenerazione ialina e necrosi, ma anche di modesta rigenerazione, accanto alla proliferazione dell'endomisio e del perimisio [2]. Sono colpite sia le fibre di tipo I che le fibre di tipo II [49].

5.4 Distrofia muscolare congenita (CMD, congenital muscular dystrophy)

Il termine CMD è stato usato per varie sindromi infantili che manifestano: 1) debolezza alla nascita o entro i primi mesi di vita 2) quadro istologico distrofico da biopsia muscolare 3) ipotonia, artrogrifosi e contratture (contractures) in modo variabile 4) progressione variabile, talora stazionaria, a volte con recupero funzionale o lento peggioramento [9].

5.4.1 UOMO

Come avviene per le LGMD, rientrano in questo raggruppamento distrofie muscolari dell'uomo molto eterogenee dal punto di vista clinico e genetico. Sono forme autosomiche recessive ad insorgenza precoce, con frequente coinvolgimento articolare e spesso anche del sistema nervoso centrale [33]. Così sono state raggruppate da alcuni Autori [33]:

TAB_ 5.4.1.a [33]

Distrofie muscolari congenite [33]	Localizzazione [33]	Prodotto genico [33]
1. Deficit di merosina (MCMD)	6q22-q23	Laminina, catena $\alpha 2$
2. Deficit di integrina $\alpha 7$	12q13	Integrina $\alpha 7$
3. CMD Fukuyama	9q31-q33	Fukutina
4. CMD muscolo-occhio-encefalo	1p32-p34	ignoto
5. Sindrome di Walker-Warburg	ignota	ignoto
6. CMD non linked	ignota	ignoto

Sono stati individuati i geni delle prime tre forme di CMD sopra riportate [33].

Nella CMD da deficit di merosina (o MCMD, Merosin-deficient congenital muscular dystrophy [10]) viene a mancare il legame che la merosina (detta anche $\alpha 2$ -laminina, catena pesante del complesso della laminina-2) stabilisce con l' α -distroglicano connettendo il complesso DAGs con la matrice extracellulare [33], di cui la laminina-2 fa parte risultando un forte supporto strutturale citoscheletro-membranario [15]. L'integrina $\alpha 7\beta 1$ D è recettore della laminina-2 che trasduce i segnali che derivano dall'interazione sarcolemma-matrice; la subunità $\beta 1$ è ubiquitaria, l' $\alpha 7$ è muscolo-specifica [33]. La deficienza di merosina sembra dislocare l' $\alpha 7\beta 1$ -integrina dal sarcolemma, interrompendo la trasduzione di un

segnale mediato dall'integrina essenziale per la sopravvivenza della miofibra: questo suggerisce che la patogenesi della CMD non sia riferibile a una instabilità di membrana, tanto che il ruolo del calcio appare coinvolto negli stadi terminali della cascata di eventi patogenetici, riscontrandone livelli elevati nei muscoli degli arti nell'uomo e nei modelli animali [8]. Ipotonia, contratture alle anche, alle ginocchia, ai gomiti [33] e degenerazione miofibrillare su ampia scala compaiono già alla nascita [33], talvolta anche in fase prenatale [15]. Riporta debolezza muscolare e associate artrogrifosi o ipotonia [9]. Successivamente si osserva perdita di rigenerazione e debolezza profonda [15]. Solo in alcuni casi compaiono neuropatie periferiche, ma tipica è la ipomielinizzazione della materia bianca cerebrale [33] e dei motoneuroni periferici [10]. Questa forma di CMD è detta anche "pura" [9]. Quadro istologico distrofico ma senza necrosi o rigenerazione; possibile infiltrazione fibroadiposa. SCK normale o elevata. Nessun deficit mentale. L'esame tomografico e la risonanza magnetica al cervello generalmente sono nella norma [9].

La CMD di tipo Fukuyama, presente prevalentemente in Giappone, è un caso molto interessante per lo studio della genetica di popolazione, in quanto la quasi totalità degli individui colpiti condivide un aplotipo comune che pare risalire ad un unico individuo vissuto in Giappone circa 2000 anni fa. Non solo: sarebbe il primo caso di malattia indotta da un'inserzione errata di un retrotrasposone. Il retrotrasposone è una sequenza di DNA che viene trascritto a RNA, si sposta in un nuovo sito genico e vi si inserisce dopo essere retrotrascritto a DNA [33]. In questa forma si ha una deficienza parziale di merosina [9]. Il quadro clinico che ne deriva è gravissimo: il tessuto muscolare e nervoso sono molto compromessi [33]: l'esame istologico evidenzia un pattern distrofico [9]; vi è un grave ritardo mentale [9] [33] dovuto a notevoli alterazioni cerebrali evidenti in diagnostica per immagini e all'autopsia (TAC e RM) [9], e in particolare si notano polimicrogiria, talora idrocefalo, fusione interemisferica focale e ipoplasia del tratto cortico-spinale [33]; i soggetti non imparano a camminare [33]. Tuttavia i soggetti sopravvivono nella maggior parte dei casi oltre l'infanzia [9].

La CMD muscolo-occhio-encefalo presenta debolezza muscolare e pattern istologico distrofico come la CMD classica; vi è ritardo mentale come nella CMD tipo Fukuyama, ma è contraddistinta da alterazioni oculari, ossia severa miopia, strabismo, cataratta, glaucoma, atrofia retinica. In alcuni casi si manifestano crisi epilettiche; alterazioni dell'esame elettroencefalografico e l'aumento della SCK in genere si rinvengono da un anno di vita in poi. [9]

La sindrome di Walzer-Warbrung appare come una forma più lieve della CMD muscolo-occhio-encefalo, anche se ancora non si esclude che possano essere due forme distinte. Si rinvengono debolezza muscolare, ritardo mentale, lissencefalia di II grado (con malformazione dei giri cerebrali e diminuzione delle interdigitazioni tra

corteccia e sostanza bianca cerebrale), aumento di spessore della corteccia cerebrale, lievi alterazioni oculari. [9].

5.4.2 TOPO

Una sperimentazione interessante è stata condotta da Kuang W et al. (1998) [10] in due modelli murini per la MCMD. Si conoscono infatti i seguenti modelli animali: 1) il topo dy , mutante spontaneo: esprime parzialmente la merosina, 2) il topo dy^w , mutante indotto: completamente privo di merosina 3)) il topo dy^{2j} , mutante spontaneo: esprime la merosina in quantità quasi normali ma troncata (mutazione puntiforme). [10]

Sfruttando la regolazione di un promotore della creatina-kinasi muscolo specifica, si sono creati topi transgenici da dy^w e dy^{2j} esprimenti il transgene della merosina umana (per distinguerla da quella endogena murina all'esame immunostochimico). [10]

I risultati ottenuti dal confronto della longevità, dello sviluppo fisico e dei preparati muscolari immunostochimici tra i modelli wild-type (ceppi selvaggi), dy^w e dy^{2j} transgenici e non, sono significativi. Tutti e tre i modelli transgenici, compreso il topo dy^w che era completamente deficitario della merosina, esprimono la proteina transgenica a livello muscolare (vedi FIG_5.4.2.a) [10].

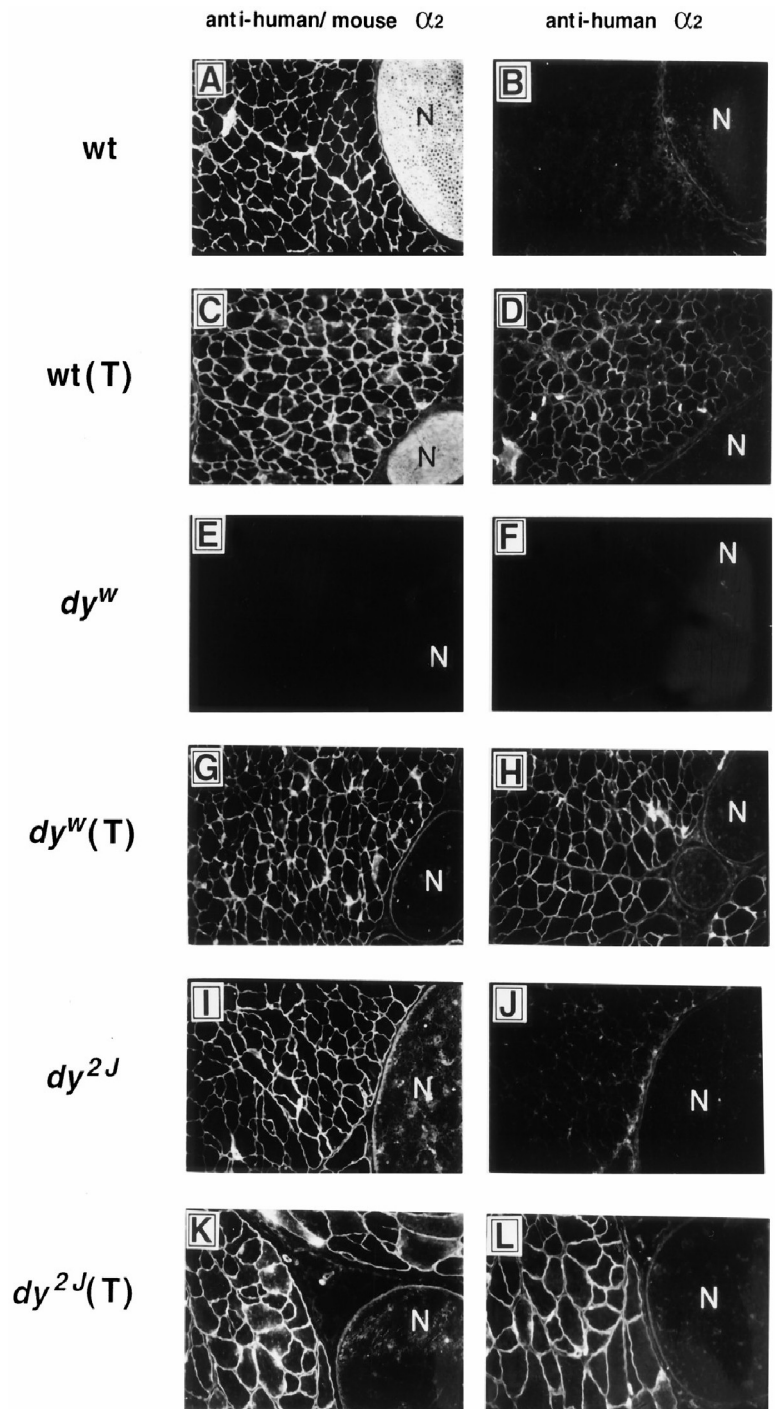
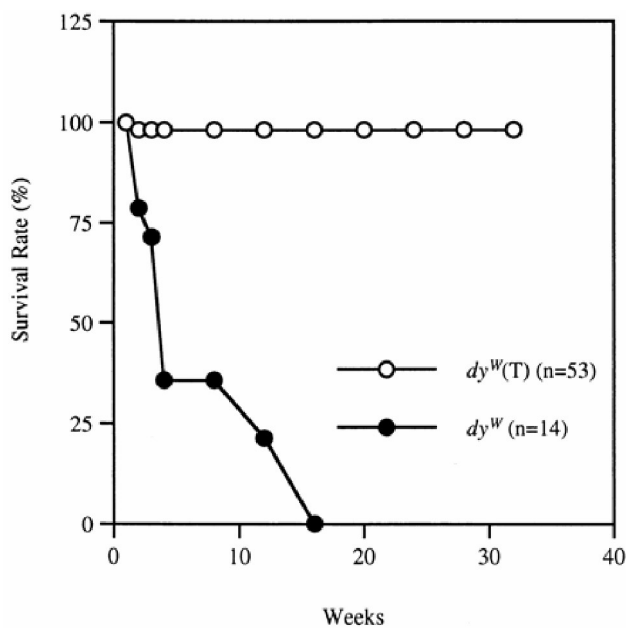


FIG. 5.4.2.a_ [10]

Wt: wild-type
Wt (T): wild type transgenico
dy^w: topo dy^w senza transgene umano lama-2
dy^w(T): topo dy^w transgenico lama-2
dy^{2J}: topo dy^{2J} senza transgene lama-2
dy^{2J}(T): topo dy^{2J} transgenico lama-2

anti-human / mouse α -2 :
preparato immunohistochimico con anticorpi marker specifici per merosina umana transgenica e merosina murina endogena

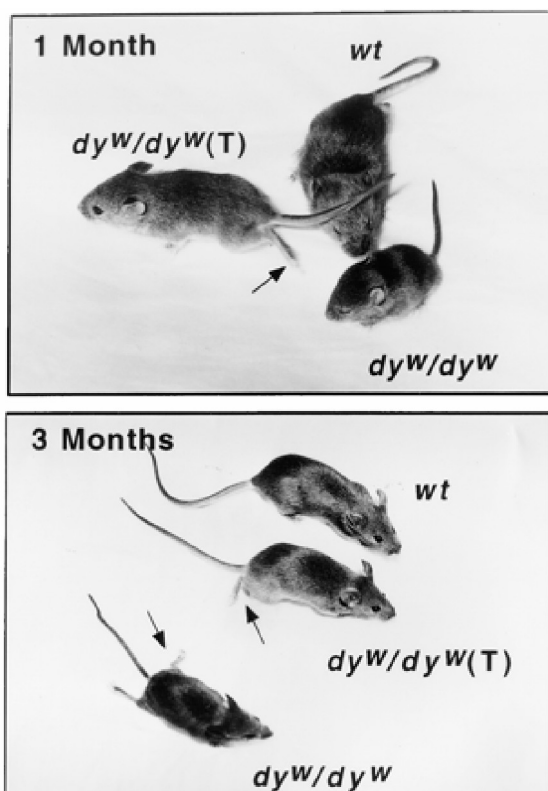
anti-human α -2 :
preparato immunohistochimico con anticorpi marker selettivi solo per merosina umana transgenica



In figura 5.4.2.b è riportato in grafico il tasso di sopravvivenza dei topini omozigoti dy^W e transgenici omozigoti $dy^W(T)$. Solo un topino $dy^W(T)$ è morto nelle prime settimane di vita, contro la drastica mortalità dei topini dy^W entro le 18 settimane di vita [10].

FIG_5.4.2.b [10].

In figura 5.4.2.c invece è mostrato il fenotipo a un mese di vita (foto sopra) e a tre mesi di vita (foto sotto) dei topi wild-type, omozigoti dy^W/dy^W ed eterozigoti $dy^W/dy^W(T)$.



Lo sviluppo muscolare del fenotipo eterozigote è quasi normale, in quanto simile all'individuo wild-type, pur presentando la zoppia e contratture ai posteriori (indicata dalla freccia). Ciò sta ad indicare che il difetto è stato corretto a livello muscolare ma non in altri tessuti dove il deficit di merosina permane [10].

Fig_5.4.2.c [10]

Queste ricerche hanno permesso lo studio degli effetti della deficienza di merosina nei tessuti dove è espressa oltre a quello muscolare, quali il timo, la tiroide e i nervi periferici, altrimenti non possibile data la morte precoce dei soggetti non transgenici (ricordando che anche gli omozigoti dy^{2J} esprimono in parte la merosina murina e non riportano mortalità precoce). [10]

La sperimentazione alimenta le speranze di successo di una futura terapia genica che si proponga di correggere la mutazione in un singolo tessuto, ad esempio la deficienza di distrofina che coinvolge il solo tessuto muscolare nella DMD-BMD. [10]

5.5 Distrofia muscolare oculo-faringiale (OPMD, ocularpharyngeal muscular dystrophy)

5.5.1 UOMO

Probabilmente le prime osservazioni pubblicate di questa distrofia risalgono al 1915, condotte da Taylor su quattro persone di una stessa famiglia canadese di origine francese. Riportavano ptosi palpebrale ad insorgenza tardiva, progressiva disfagia per difficoltà di deglutizione e successiva morte per inanizione. Questo e pochi altri lavori (Amyot,1948; Saucier,1954) furono poco presi in considerazione e solo nel 1962 Victor, Hayez e Adams attribuirono il nome distrofia muscolare oculo-faringiale a questo disordine, dopo averne analizzato un caso di tipo sporadico e nove casi di tipo familiare. Tra gli anni '60-'90 fu descritta, oltre che in altre famiglie canadesi, anche in famiglie uruguaiane, californiane e del New Mexico, spesso di origine ebraica. Fino ad oggi è stata riportata in oltre 30 paesi [35].

Si manifesta tra i 50-60 anni, ed ha una progressione molto lenta. Il muscolo elevatore della palpebrale e la muscolatura faringiale sono i primi ad essere coinvolti, per cui ptosi palpebrale e disfagia sono i primi sintomi. In fase avanzata possono essere coinvolti i muscoli estrinseci dell'occhio e manifestarsi disfunzione dei movimenti oculari, talora diplopia (visione doppia), raramente oftalmoplegia. Se non tenuta sotto controllo la disfagia conduce a denutrizione e morte per polmonite ab ingestis. Altri sintomi compaiono in base alla muscolatura coinvolta, per cui debolezza e atrofia si riscontrano nei muscoli linguali, masticatori, facciali e temporali, talora nei muscoli del cinto pelvico, meno comunemente nel cinto toracico. All'autopsia i muscoli più colpiti appaiono i linguali, i faringiale, gli extraoculari e il diaframma [35].

L'esame istologico evidenzia alcune lesioni tipiche delle distrofie muscolari: 1) perdita di fibre muscolari 2) variabilità abnorme delle dimensioni delle fibre 3) aumento dei nuclei 4) centralizzazione dei nuclei 5) infiltrazione fibro-adiposa. Necrosi e fagocitosi delle fibre non sono frequenti [35].

L'esame istochimico riporta due particolarità: a) presenza di fibre angolate (in questo caso dovuta più all'età che al fenomeno di denervazione); b) vacuoli ad anello (rimmed vacuoles), figuranti tra le fibre come spazi vuoti orlati da anelli irregolari basofili. Questi vacuoli sono comuni ad altre patologie muscolari, quali la miosite a corpi inclusi, ma la loro presenza è un elemento biotipico di supporto alla diagnosi di OPMD [35].

L'esame di microscopia elettronica dimostra il carattere autofagico dei rimmed vacuoles in quanto contengono strutture membranose, granuli di glicogeno e residui

proteici anomali di componenti muscolari non identificate. In particolare la microscopia elettronica mette in luce la presenza di inclusioni filamentose intranucleari (INIs). Tali strutture tubolari si rinvencono nei nuclei delle fibre e non nei nuclei di altri tipi cellulari muscolari (ad esempio fibroblasti, adipociti, cellule endoteliali). Hanno un diametro esterno di 8,5 nm, un diametro interno di 3,0 nm, una lunghezza di 0,25 µm, talvolta hanno una striatura di passo periodico di 7-7,5 nm, non presentano ramificazioni ma possono disporsi a palizzata o presentarsi aggrovigliati. Nei nuclei affetti al microscopio appaiono come zone bianche circondate da cromatina. Nei soggetti omozigoti affetti da OPMD l'incidenza di INIs è del 9,4%, nei soggetti in eterozigoti è del 4,9%. Non è più ritenuto che le INIs siano un tipo speciale di corpi inclusi da miosite (IBM). Questi ultimi sono comunque presenti ma a livello citoplasmatico, e solo in via del tutto eccezionale anche a livello intranucleare. [35]

Questa distrofia è dovuta ad una mutazione al gene della proteina PABPN-1 (polyadenylate-binding protein nuclear-1), localizzato sul cromosoma 14q11.1, ed è ereditato come disordine allelico dominante. Il fenotipo più grave si esprime negli omozigoti dominanti e negli eterozigoti di una mutazione dominante e una recessiva. L'omozigosi recessiva esprime fenotipo simile alla dominante ma compare in età più avanzata. [35]

La PABPN-1 è una proteina molto abbondante nel nucleo e sembra indispensabile per la poliadenilazione dell'RNA messaggero [15][35]. La mutazione al dominio di polialanina causa un eccessivo allungamento dell'estremità polilalaninica N-terminale. La molecola acquisisce così una tossicità dovuta al suo accumulo anomalo e alla sua interferenza con i normali processi cellulari. Oligomeri polialaninici possono formare macromolecole sia in vivo che in vitro, sono resistenti alla degradazione chimica e da proteasi. Complessati con proteine degradate, questi oligomeri formano inclusioni filamentose intranucleari (INIs) il cui accumulo, superata una certa espansione, è deleterio per il nucleo.

La diagnosi parte senza dubbio dal rilevamento dei segni clinici. La conferma diagnostica, un tempo affidata all'esame di microscopia elettronica (evidenziazione delle INIs), oggi è ottenuta in tempi, modi e costi più vantaggiosi dai test del DNA. La PCR rivela il carattere di portatore ed ha una sensibilità e una specificità prossime al 100%. [35]

Una terapia risolutiva non è disponibile. Le cure mirano ad evitare l'indebolimento del paziente a causa della disfagia somministrando diete iper-proteiche, tenendo in considerazione l'eventualità di polmoniti ab-ingestis. Si consiglia un buon esercizio fisico, che però può avere effetti negativi se eccessivo. Si può correggere chirurgicamente la ptosi palpebrale qualora impedisca la visione (resezione

dell'aponeurosi del muscolo elevador palpebrae e della sospensione frontale delle palpebre). [35]

Questa distrofia non è stata segnalata negli animali [nda].

5.6 Distrofia muscolare lipomatosa (Lipomatosi muscolare)

Alcuni Autori [1] usano come sinonimo di lipomatosi il termine steatosi muscolare. Secondo altri Autori [2] ciò non è corretto in quanto il termine steatosi è riservato alla degenerazione grassa delle miofibre per cause acquisite, secondarie a fenomeni degenerativi. Si tende a considerare la lipomatosi una forma ereditaria in conformità a quanto osservato nel suino, anche se si è già proposta la multifattorialità nella patogenesi; infatti in un terzo delle lesioni si riscontra insufficiente sviluppo muscolare, mentre in un quarto dei casi si riscontra sostituzione selettiva di miofibre di tipo II, come avviene nelle rigenerazioni abortive in miopatie da sforzo e nutrizionali. Inoltre il carattere istologico prettamente atrofico e non degenerativo contrasta con la definizione di distrofia. Frequente nel giovane bovino e nel suino, segnalata anche in pecora, cavallo e cane [2]. Nel bovino Nei casi di distrofia lipomatosa di grado lieve non è facile differenziarla dalla marezzeria (marbling), ossia l' infiltrazione di grasso apprezzabile ad occhio nudo tra l'endomio dei fasci muscolari di II ordine, fisiologica quando presente. La malattia resta un rilievo anatomopatologico al macello, in quanto asintomatica in animali sani. Coinvolge diversi muscoli di una sola regione, talvolta di un solo arto. Può avere caratteri di bilateralità simmetrica. Raramente sono coinvolti quasi tutti i muscoli. L'abbondante interposizione di grasso nello stroma muscolare esalta in modo evidente la striatura longitudinale in sezione sagittale e l'aspetto reticolato in sezione trasversale. Lo spessore del muscolo è inalterato. I limiti del processo infiltrativo non sono precisi. Le miofibre vicine alle infiltrazioni sono al limite atrofiche ma non degeneranti. Gli adipociti derivano dalle cellule connettivali dell'endomio che mantengono tale capacità di differenziazione [2]. Il suino esprime la malattia in particolari linee genetiche ottenute in incroci di razza Duroc, da cui l'ipotesi che sia una distrofia ereditaria. Secondo alcuni essa rappresenta un difetto secondario ad uno sviluppo ritardato della rete vascolare muscolare che causa ischemie estese specie nella regione dei lombi [2]. Nel cane incide in età avanzata, nei muscoli delle cosce e dei lombi, da cui le lesioni simmetriche si estendono anche ai gruppi muscolari adiacenti. Si è osservato che talvolta ricorrono in sedi di interventi chirurgici, concomitanza che comunque non spiega il carattere decisamente evolutivo.[2]

5.7 Distrofie muscolari miotoniche o Sindromi miotoniche

Rientrano nel quadro delle patologie dei canali ionici (ion channelopathies), alle quali appartengono anche l'ipertermia maligna (sindrome da stress) dei suini, la miastenia grave, la paralisi periodica iperpotassiemica.

Alla base del fenomeno dunque non vi è un'alterazione del motoneurone o della placca motrice, ma il malfunzionamento dei canali ionici del sarcolemma che causa un'abnorme produzione di depolarizzazioni ripetitive, seguite da ripolarizzazioni, e ritardo del rilasciamento. La miotonia infatti consiste clinicamente nella difficoltà alla decontrazione muscolare dopo lo sforzo, sintomo tuttavia che recede se l'esercizio viene continuato. [2]

Negli animali domestici rinviene in quattro condizioni morbose [2]: la miotonia congenita e la paramiotonia (congenite e probabilmente ereditarie), la distrofia miotonica (congenita non ereditaria), la miotonia acquisita (acquisita) [2].

Miotonia congenita (malattia di Thomsen [17]). È da riferire ad una mutazione dei canali del cloro a livello dei tubuli T (gene ClC-1 [17]), per cui è diminuita la conduttanza di tali ioni [2]. Il cloro, che all'esterno delle cellule è circa 27 volte più concentrato rispetto all'interno (l'osmolarità del cloro è circa 108 mOsm nel liquido interstiziale e 4 mOsm nel citoplasma [44]), tenderà a concentrarsi all'interno delle fibre, nonostante il richiamo elettrico degli ioni sodio, creando squilibri elettrici.

Rinvenuta in capre Angora [2][17], in vitelli [17] in cani Chow Chow [2][1][17] (un disordine simile è rinvenuto nello Stafford terrier [1]), in via eccezionale nel gatto, in cui si hanno soprattutto fenomeni di disfagia e disfonia [2]. Nel cavallo è stata descritta, e pur essendo sospetto il difetto a canali ionici, il tipo di ereditarietà non è accertato. Ancora non si sa se si tratta di una vera e propria miotonia congenita o di un disordine simile, tanto che è stata definita anche forma Distrofia miotonica-simile (Myotonic dystrophy-like) o forma Distrofia muscolare-simile (Muscular dystrophy-like) [1], entrambe giustificabili dai dettagli descritti più avanti [nda]. Secondo alcune fonti [17], la presenza nel cavallo di complicazioni a comparsa tardiva, quali ipoplasia testicolare, cataratta e distrofia renale, la rendono sovrapponibile alla distrofia miotonica umana (Malattia di Steinert), se non per un aspetto: la risposta all'azione dell'apamina, anch'essa descritta più avanti [nda].

Nel cane colpisce entrambe i sessi [1], è ereditaria, ma non progressiva come le comuni distrofie [2]. Si manifesta nei primi mesi di vita con difficoltà a rialzarsi dopo decubito imposto e ipertrofia dei muscoli della coscia e della spalla (ipertrofia atletica). Pur non aggravata dal freddo, la sintomatologia migliora con l'esercizio [2]. L'animale cammina con gli arti anteriori addotti e rigidi, mentre gli arti posteriori possono evidenziare un'andatura a "balzi di coniglio" [1], tra l'altro segno tipico di displasia dell'anca [nda].

L'esame macroscopico non evidenzia particolari lesioni e quello microscopico è aspecifico: l'ipertrofia delle fibre è accompagnata da degenerazione ialina in fase acuta e fibrosi endomisiale in fase cronica. Al microscopio elettronico i mitocondri sono ingrossati [2]. In fase iniziale i muscoli sono nella norma. L'ipertrofia è rilevabile solo all'esame port-mortem, ed è presente in gruppi specifici di muscoli. Con il tempo compare ipertrofia e atrofia, e segmenti sparsi di fibre in necrosi e in rigenerazione. La fibrosi è leggera, spesso in apparenza [1].

L'elettromiografia riporta il suono caratteristico della miotonia: potenziali miotonici che crescono e decrescono producendo il rumore tipico di un aereo che si avvicina e si allontana (waxing and waning myotonic bursts, o "dive bomber"[nda]) [1].

Nel gatto la miotonia manifesta una ipertrofia simile alla distrofia X-linked, ma meno marcata. SCK e AST sono nella norma o lievemente aumentate. La diagnosi differenziale può essere confermata proprio con l'elettromiografia, che riporta i potenziali tipici sopra descritti [1].

Nel cavallo la sintomatologia è simile a quella del cane: marcata intolleranza all'esercizio, rigidità della stazione fin dalla nascita (che tende a diminuire con l'esercizio), ipertrofia marcata e ben definita di alcuni gruppi muscolari. Dal punto di vista macroscopico non ci sono variazioni oltre all'ipertrofia, sennonché alla palpazione del muscolo la fossetta digitale tende a permanere (prolonged dimpling after percussion)[1]. In microscopia compaiono masse sub-sarcollemali, fibre ad anello ("Ringbinden" o "ring fiber") [1], centralizzazione dei nuclei [1][17], proliferazione dell'endomisio e del perimisio, variazione del diametro delle fibre e splitting pronunciato [17]. Non sono molto diffusi focolai di necrosi e rigenerazione: è molto più facile in fase cronica riscontrare la sostituzione di miofibre con depositi di tessuto adiposo [1][17]. Questi ultimi caratteri anatomopatologici giustificerebbero la denominazione Muscular dystrophy-like [nda], ma i parametri sierologici di SCK e AST e i riscontri elettromiografici sono quelli tipici della miotonia sopra riportati [1]. Appare quindi più appropriata la definizione Myotonic dystrophy-like, tenendo conto del fatto che, qualora ci sia una notevole sofferenza cronica, il deposito di grasso potrebbe essere inevitabile in masse muscolari così ben sviluppate come nel cavallo, che tra l'altro risultano qui marcatamente ipertrofiche [nda]. Ma un ulteriore aspetto che differenzia questa forma dalla distrofia miotonica umana e la rende simile alla miotonia congenita è la reazione del muscolo all'apamina. Questa sostanza tossica ricavata da un veleno è un bloccante selettivo ad alta affinità per i canali del potassio calcio-attivati, responsabili dei potenziali prolungati post-iperpolarizzazione osservati nelle cellule nervose e nel tessuto muscolare embrionale. Tali canali sensibili all'apamina sono assenti nel muscolo umano sano e nel muscolo di pazienti con miotonia congenita (probabilmente perché mantengono un fenotipo embrionale); sono invece presenti nel muscolo di

pazienti affetti da distrofia miotonica e sembrano esserne responsabili dell'attività miotonica-simile. L'apamina è in grado perciò di bloccare le scariche del muscolo affetto da distrofia miotonica, ma non le scariche del muscolo con miotonia congenita. Ebbene nel cavallo affetto dalla forma in questione, l'apamina non ha effetto, così come accade nella miotonia congenita. Non si esclude comunque che si tratti di Distrofia muscolare espressa in un specifico fenotipo equino, né che si tratti di una particolare miopatia equina da riferire ad altra forma umana [17].

Paramiotonia. Le alterazioni muscolari non sono rilevanti, sebbene i sintomi della paramiotonia siano notevoli, comparendo rigidità dei movimenti, debolezza e tremori più o meno accompagnati da paralisi. Inoltre i sintomi, a differenza delle altre sindromi miotoniche, peggiorano sia dopo esercizio che con l'azione del freddo [2].

Nell'uomo la patologia è riferita ad una mutazione nel cromosoma 17q, nel gene della subunità α (alfa) dei canali del sodio voltaggio dipendenti, che esita in un aumento della conduttanza del sodio, quindi in un suo aumento entro il sarcolemma e conseguente depolarizzazione. A livello istologico, sempre nell'uomo, appaiono variabilità di diametro, centralizzazione dei nuclei, moderata fibrosi e vacuoli intermiofibrillari PAS-positivi nelle miofibre tip IIB; in microscopia elettronica il reticolo sarcoplasmatico risulta dilatato e appaiono fascicoli di microtuboli di 60-90 nm di diametro, dimostrabili sotto forma di aggregati tubulari sarcoplasmatici anche nella metodica istochimica NADH-TR (NADH tetrazolio reduttasi).[2]

Nel cavallo è una malattia ereditaria [2], autosomica dominante, e perciò manifestata sia in omozigosi, più severa, che in eterozigoti, con sintomi variabili [1]. Ne sono affetti soprattutto i Quarter horse, e in particolar modo le linee discendenti dallo stallone Impressive [1]. Segni tipici sono episodi di paralisi e aumento del potassio ematico, perciò detta anche paralisi iperpotassiemia equina (Hyperkalemic Periodic Paralysis, HYPP) [2][1]. In omozigosi i puledri riportano disfunzione dei muscoli laringei che porta a laringospasmo e respirazione difficoltosa. I sintomi più frequenti in eterozigosi sono tremore e debolezza, talvolta collasso. I cavalli affetti possono non riportare sintomi per anni, avere episodi multipli di collasso, o soccombere per morte improvvisa. SCK e AST sono nella norma, ma è notevole l'iperpotassiemia, dovuta al disordine primario dei canali del sodio nella fibra muscolare: il sarcolemma compensa il sodio in eccesso entrato nella fibra espellendo ioni potassio, che dall'interstizio si riversa nel torrente ematico. L'elettromiografia riporta anche in questo caso potenziali miotonici [1].

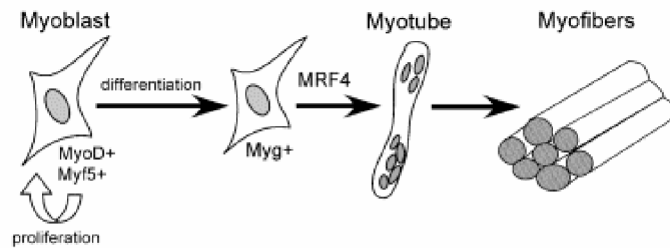
Le alterazioni microscopiche riportate nell'uomo non sono sempre tutte riconoscibili, e quella vacuolare è la più rappresentativa [2] soprattutto nelle fibre tipo II [1]. Ad un livello ultrastrutturale vi è un segno caratteristico di HYPP: le cisterne terminali del reticolo sarcoplasmatico risultano dilatate [1]. La terapia consiste nel limitare

l'apporto di potassio nella dieta; nei casi severi il farmaco diuretico acetazolamide favorisce l'eliminazione di potassio [1], ed è sempre consigliabile monitorare il profilo per evitare una depauperazione dello ione [nda]; nei casi acuti l'iniezione intravenosa di calcio-destrosio è efficace [1].

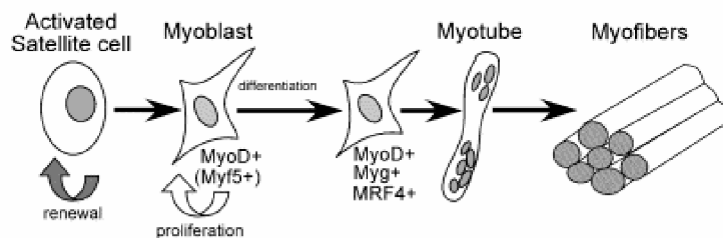
Nel cane e nel gatto è segnalata la paralisi periodica iperpotassiemica, con una caratteristica: può manifestarsi come paramiotonia ipopotassiemica [2].

Distrofia miotonica (malattia di Steinert [17]). Nell'uomo è stata descritta la prima volta nel 1909 da H. Steinert, ed è il primo esempio di malattia causata da un RNA patologico [45]. È ereditata in forma autosomica dominante [45], ed ha un'incidenza di 1/8000 [46]. Il riferimento a [17], sembra che fino ai primi anni novanta del secolo scorso (1992) la distrofia miotonica umana fosse attribuita a mutazioni al gene della proteina kinasi miotonina, situato nel cromosoma 19, mentre pochi anni dopo (1994;1996) furono analizzate forme genetiche distinte: la distrofia miotonica prossimale (PROMM) e la distrofia miotonica tipo 2 (DM2) [17]. Oggi si parla di due forme, definite DM1 (Distrofia Miotonica-1) e DM2 (Distrofia miotonica-2) [46] : non crei comunque confusione l'abbreviazione DM, in genere usata, e non solo in questa sede, per Distrofia muscolare [nda]. Il difetto della forma DM1 risiede nel cromosoma 9, a livello del gene della distrofia miotonica-proteina kinasi (DMPK), e più specificamente nella regione non tradotta dell'estremità 3'; il difetto è un'espansione CTG del DNA (che nell'RNA diviene CUG per sostituzione della Timina con Uracile) [46]. Il difetto della forma DM2 risiede nel cromosoma 3, nel primo introne della zinc finger protein 9 (ZNF9) [45], ed è un'espansione non tradotta CCTG (nell'RNA CCUG)[46]. Tali espansioni tuttavia attribuiscono all'RNA nuove potenzialità (in inglese tale acquisizione è definita gain-of-function), e in particolare la capacità di provocare splicing alternativi nei confronti di vari prodotti genici [46]. Nella patogenesi della malattia perciò sembrano essere coinvolte varie proteine, tra cui sicuramente la Six 5, la cui omologia con il gene UNC-39 di *C.elegans*, rinvenuta nel 2004, ha aperto nuove e più facili strade per le future sperimentazioni [48]. I meccanismi patogenetici sono infatti ancora molto oscuri, ed è stato riscontrato che in definitiva le mutazioni suddette causano una inibizione della differenziazione dei mioblasti in miofibre [45]. Gli studi condotti sulle modalità di inibizione mioblastica hanno evidenziato tre modalità di differenziazione dei mioblasti in miofibre, schematizzate in [FIG_5.7.a](#) [45]: A) differenziazione embrionale B) differenziazione rigenerativa C) differenziazione tipo C2C12, riscontrata nel muscolo murino e completata in vitro. L'espressione di determinati fattori di differenziazione e dei loro recettori è discriminante per l'una o l'altra via, e l'alterazione nell'espressione di tali specifiche proteine in determinati momenti altera anche la rispettiva via di differenziazione [45].

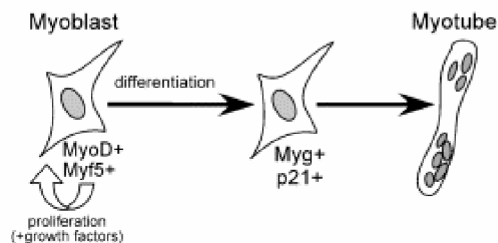
A. Embryonic myogenesis



B. Regenerative myogenesis



C. C2C12 myogenesis



Fig_5.7.a [45]. Vie di differenziazione miocenica: embrionale (A), rigenerativa (B) e mioblastico C2C12 . MyoD and Myf5 sono espressi dai precursori miogenici.

La forma DM1 può comparire in due forme. La forma congenita (CMD1), più severa, compare alla nascita con ipotonia, ritardo mentale e sviluppo muscolare difettoso; si ha 25% di mortalità e i sopravvissuti sviluppano entro i vent'anni la forma adulta. Nella forma adulta, in quanto distrofia, compare debolezza e deperimento muscolare [45], ma si hanno complicazioni multisistemiche: atrofia delle gonadi, endocrinopatie, disturbi di conduzione nervosa, disturbi mentali, cataratta [48]. Sebbene i fenotipi negli adulti colpiti da DM1 e DM2 siano simili, casi congeniti e difetti di sviluppo muscolare non sono stati riportati per la DM2 [45]. La biopsia nella DM1 riporta fibre di ridotte dimensioni perché immature, e aumento del numero di cellule satelliti [45]. Le fibre di piccole dimensioni non devono essere confuse con fibre atrofiche, in quanto in questo caso hanno i caratteri di fibre immature.

Nel 2004 è stata eseguita una correzione della mutazione al gene DMPK con l'uso di ribozimi, piccolissime molecole di RNA (400 basi) capaci di eseguire clivaggi a livello

di RNA (idrolizzando i legami fosfodiesterici [33]) [47]. I ribozimi in natura eseguono azione autocatalitica (definita cis-) su RNA specifico; sono Mg^{++} o Mn^{++} dipendenti e sono nuovamente disponibili dopo reazione. Sono stati ottenuti ribozimi per catalizzare tagli in altri siti molecolari (trans-), e complementari a particolari triplette. Il ribozima che agisce sulla tripletta CUG nella DM1 è detto ribozima forcina, per la sua forma caratteristica [33].

Per riassumere, la DM dell'uomo è caratterizzata da atrofia muscolare e, a stadi avanzati, da potenziali miotonici elettromiografici. Istologicamente compaiono centralizzazione dei nuclei, fibre ad anello, atrofia delle fibre di tipo I e ipertrofia delle fibre di tipo II. È associata a disturbi sistemici, in particolare cataratta, atrofia delle gonadi ed endocrinopatie [16].

Nel cane e nel cavallo, è una distrofia congenita progressiva ma non ereditaria, dove la capacità rigenerativa del muscolo non è sufficiente, e in particolare risultano: le fibre di tipo II ipertrofiche con eventuale atrofia di alcune fibre di entrambe i tipi I e II; i nuclei si centralizzano in tipiche file continue anche di trenta o più unità; elevata presenza di Ringbinden; infiltrazione di tessuto fibroso e in parte adiposo negli spazi atrofici [2]. Nel cavallo i potenziali elettromiografici sono tipicamente miotonici [16].

Nel topo, né mutazioni loss-of-function né sovraespressione della DMPK sono esitate in anomalie di sviluppo muscolare. Finora non si è riusciti a riprodurre la malattia nei modelli murini [45].

Miotonia acquisita. Rara, detta anche miopatia steroidea in quanto compare nel cane e nel gatto in corso di iperadrenocorticismo iatrogeno, endogeno o esogeno. Risulta impoverimento intracellulare del potassio, alterato metabolismo del calcio e alterata trascrizione proteica, da cui un ricambio fibrillare deficitario. La rigenerazione è inefficace e ne deriva un'atrofia progressiva che colpisce soprattutto le fibre di tipo II, e in particolar modo i muscoli masticatori del cane.[2]

5.8 Miopatia diaframmatica del bovino Meuse-Rhine-Yssel

Distrofia muscolare progressiva e probabilmente ereditaria [2] autosomica recessiva [1], riscontrata in bovini olandesi di razza Meuse-Rhine-Yssel in Europa (Olanda[24]) in età compresa tra i due e i dieci anni [24][2], in media cinque anni [2], e in alcune linee di bovine Friesian Holstain in Giappone [2][1]. Colpisce principalmente il diaframma e i muscoli intercostali [24][2]. Non è riportato il deficit genetico primario [nda].

I muscoli appaiono pallidi, tumefatti e rigidi [2][24]. Il diaframma è colpito più gravemente. Le fibre di tipo I sembrano essere meno soggette a ipotrofia o ipertrofia [24]. Il diametro delle fibre è molto variabile: dapprima più grande, e in seguito compare atrofia di tutti i tipi di miofibrilla. Rari i segni di rigenerazione (comparsa di sottili miofibre basofile). Evidente la proliferazione dell'endomisio e del perimisio. Alcune fibre risultano ipercontratte, altre frammentate, altre ancora calcificate; possibile fagocitosi di segmenti degenerati (degenerazione ialina) [2][24]. Un aspetto tipico è la presenza di central cores, ossia la presenza di lunghi tratti di sarcoplasma prive di fibrille [24]. Nei soggetti Friesian Holstein invece la debolezza compare dalla nascita, e all'esame istologico si distinguono scarsa presenza di fibre (ipoplasia miofibrillare) e assenza dei dischi Z, cui consegue disorientamento dei sarcomeri e assenza del reticolo delle triadi [24].

5.9 Distrofia muscolare progressiva degli ovini

Rinvenuta in pecore Merinos australiane con un'incidenza annua nella progenie dell'1-2%, diagnosticata a 1-4 mesi di vita [24]. Sicuramente congenita e progressiva, quasi sicuramente ereditaria [1][2]. Sono colpiti sia maschi che femmine [24]. Gli animali evidenziano: debolezza muscolare entro il primo mese di vita, andatura rigida e intolleranza all'esercizio [1], crescita stentata, difficoltà nella flessione degli arti posteriori a partire da tre-quattro settimane di età [2]. Muoiono per inanizione in età compresa fra i sei e i diciotto mesi di vita [2]. I livelli di CK e AST sono aumentati [1]. Non si conosce il difetto genetico primario, ereditato in via autosomica recessiva [1]. Non è riportato il deficit genetico primario [nda].

Essendo colpite prevalentemente le fibre di tipo I, le lesioni sono più facilmente evidenziabili nei muscoli a netta predominanza di tali fibre (soprattutto nell'arto inferiore i muscoli vasto intermedio [1][2] e vasto mediale [2]) [1]. Tuttavia alcuni muscoli composti principalmente da fibre di tipo I sono scarsamente o per nulla coinvolti [24]. In fase avanzata compare infiltrazione adiposa e sono colpiti anche i

muscoli degli arti anteriori e della testa, risultando induriti e di color grigiastro. Alcuni Autori hanno descritto gli aspetti anatomopatologici del muscolo in base all'età dell'animale: all'inizio il muscolo è pallido e ipotonico, ma di dimensioni normali; dopo pochi anni diventa consistente, atrofico e il colore assume toni sempre più grigio-bianchi col progredire dell'infiltrazione fibroadiposa [1].

Le fibre tipo I risultano dapprima ipertrofiche e accorciate, e in seguito vi è degenerazione a focolai che esita in atrofia e infine in infiltrazione fibroadiposa [2]. Appaiono segni miopatici quali nuclei interni e masse subsarcolemmali [1]. La perdita di fibre può raggiungere l'80-100% in due anni [24]. Sembra che la degenerazione inizi dai dischi Z (frammentazione). Sempre in fase avanzata, sono coinvolte anche le fibre tipo II [2], divenendo atrofiche e in seguito rimpiazzate da tessuto fibroadiposo, ma non vanno mai incontro a fenomeni di splitting come le fibre tipo I [24].

Alcuni aspetti sono simili alla central core disease, alla miopatia nemalinica (rinvenuta nel cane e nel gatto, caratterizzata da corpuscoli del sarcoplasma scuri in colorazione tricromica di Gomori, a forma di ago o bastoncino, e che in microscopia elettronica appaiono come corpi osmiofili simili alle bande Z, e composti in parte da α -actinina [2]), e alla miopatia centronucleare [2]. Non vi è terapia per questa forma e gli individui affetti non dovrebbero essere riprodotti [1].

5.10 Miopatia progressiva familiare suina

Miopatia ereditaria, detta Pietrain creeper syndrome, si riscontra in questa razza e nei Landrace. Insorge a 2-4 settimane di età incidendo in circa un terzo della nidiata di suinetti. Presentano tremori, andatura "in punta dei piedi" e decubito permanente dopo circa 65 giorni. Le miofibre dei muscoli prossimali degli arti, soprattutto anteriori, hanno volume fortemente variabile, i nuclei si centralizzano e in parte degenerano [2]. Non è riportato il tipo di ereditarietà. È una forma di cui risultano esserci ancora poche informazioni [nda].

6. TERAPIA

Come avviene per la maggior parte delle malattie genetiche, le terapie attuabili possono essere di due tipi. La terapia sintomatica mira ad alleviare la sintomatologia secondaria al deficit primario, spesso molto compromettente. La terapia genica cerca di trasferire alle cellule con mutazione genetica il gene sano. Anche l'uso di cellule staminali miogeniche ottenute da midollo osseo ha condotto a risultati incoraggianti ma non per un approccio terapeutico in un futuro prossimo [55]. Alcuni studi sul topo hanno messo in evidenza nuclei marcati, provenienti dal midollo osseo trapiantato, a livello di miofibre dopo l'induzione di rigenerazione muscolare [33]. Nel topo mdx tale trapianto ha dato origine a un numero minimo di fibre che esprimono la distrofina normale in percentuale inferiore all'uno per cento, per tutto l'arco di vita dell'animale [55].

6.1 Terapia sintomatica

La terapia di tipo sintomatico e di supporto è quella convenzionalmente usata nella maggior parte delle distrofie muscolari [33][22]. Include nutrizione appropriata e diete caratterizzate da supplementi di vitamine e cofattori quando necessario [22]. Le contratture muscolari si prevencono attuando dello stretching, mentre la funzionalità polmonare e la forza muscolare sono sostenute con l'uso ricorrente di corticosteroidi, ma in modo discontinuo a causa degli effetti collaterali [33].

L'uso di corticosteroidi nell'uomo come negli animali non è però sostenibile nel lungo periodo, a motivo dei severi effetti collaterali sistemici che comporta. Questi farmaci tuttavia hanno effetti benefici indiscussi sulla muscolatura, favorendone la contrazione attraverso meccanismi sconosciuti, probabilmente stimolando la miogenesi, avendo un effetto anabolico sul muscolo aumentandone la massa, stabilizzando le membrane, attenuando la necrosi e stabilizzando i flussi di calcio [56]. Nell'uomo si usa prednisolone 0,75-1 mg/kg/giorno in somministrazione continua per 13-15 anni, fino a riduzione per i motivi sopra citati a 0,35 (0,15-0,75) mg/kg/giorno [56]. Nel Labrador retriever affetto da miopatia deve essere assicurato riparo dal freddo, terapia di supporto e integrazione di L-carnitina (50 mg/kg per via orale due volte al giorno) [22], mentre non si fa riferimento ad un protocollo a base di corticosteroidi. Per controllare il sintomo dell'ipertonicità invece è consigliata la somministrazione di metisergide 0,1-0,6 mg/kg per via orale: l'effetto compare due ore dopo la somministrazione e dura circa otto ore [22].

6.2 Terapia genica

Alcuni Autori [33], descrivendo gli studi preclinici sulla terapia genica, attuati cioè sui modelli animali, usano il termine terapia genica sostitutiva [nda]. Quando si parla di terapia sostitutiva in senso stretto si intende però la somministrazione di una molecola di cui il paziente è carente o deficitario [33], e ciò implica che la molecola sia rimpiazzata con interventi continui nel tempo [nda]. Lo scopo della terapia genica invece è quello di arrivare a sostituire il gene mutato con il gene sano in modo permanente, non temporaneo [nda]. Si intende quindi sottolineare che il termine terapia genica sostitutiva fa riferimento al carattere transitorio dell'espressione del gene trasdotto nei protocolli sperimentali, e che rappresenta un importante aspetto della terapia genica da migliorare [nda]. Infine lo stesso discorso può essere fatto per la terapia cellulare, che può essere intesa come terapia sostitutiva fino a quando, nell'ambito delle distrofie muscolari, si tenterà di sostituire le cellule satelliti mutate con mioblasti sani eterologhi, per cui i fenomeni di rigetto obbligherebbero interventi ripetuti (cosa impensabile): qualora si introdurranno mioblasti dell'ospite ingegnerizzati, tali da esprimere il prodotto genico sano in modo duraturo, allora probabilmente si parlerà di terapia genica cellulare, in quanto attuata con entrambi i principi [nda].

La terapia sostitutiva delle DM ha uno scopo ben preciso: far recuperare alla miofibrilla muscolare la trascrizione e traduzione della forma sana di distrofina. Occorre attuare una correzione a livello del gene, e per fare questo occorrerebbero a loro volta strumenti che ci permettono di integrare in un numero ragionevolmente cospicuo di fibre muscolari e in modo duraturo il gene sano, o la parte di esso da correggere, senza creare problemi di intolleranza immunitaria. Questi propositi, che fino a qualche decennio fa potevano sembrare fantascientifici, oggi sono stati in parte raggiunti, e si stanno migliorando sempre più le strategie sperimentali per raggiungere l'obiettivo ideale sopra menzionato [nda].

La chiave di svolta che ha reso realizzabile ciò che prima era ipotizzabile è stato l'uso di vettori virali per sostituire il gene mutato con il gene sano. Furono creati secondo lo scopo negli anni '70 ma introdotti solo alla fine degli anni '80, quando la terapia genica ottenne l'approvazione in campo clinico sperimentale (cura dell'immunodeficienza da deficit dell'enzima adenosina deaminasi) [33].

Prima ancora dei vettori virali si sono usati vettori plasmidici ricavati dai plasmidi batterici (sequenze di DNA extracromosomico in grado di replicarsi), in grado però di trasportare sequenze nucleotidiche molto più corte dei vettori virali. Ma il cDNA della distrofina risulta troppo grande per essere inglobato anche in un vettore virale, e si è cercato così di ricavare mini-geni di dimensioni compatibili al trasporto

in vettori e in grado di esprimere distrofine più piccole ma funzionali [33]. Essendo i vettori efficaci solo nelle vicinanze del sito di inoculo muscolare, risulterebbe improponibile dal punto di vista pratico trasdurre interi gruppi muscolari. A questo proposito, per rendere i vettori il più efficaci possibile dal punto di vista terapeutico, è necessario intervenire sul loro targeting trasduzionale e sul loro targeting trascrizionale. Il primo intervento mira ad aumentare il tropismo dei vettori per il sarcolemma, così da poter far giungere i vettori al tessuto muscolare somministrandoli in uno o pochi inoculi per via endovenosa, anziché fare molteplici somministrazioni direttamente in muscolo. Il targeting trascrizionale mira a rendere la trascrizione del gene trasdotto nei tessuti sotto l'esclusivo controllo di promotori o enhancer muscolo-specifici (come quello della CK muscolare o della troponina I) [33].

I plasmidi hanno un'efficienza di trasduzione bassa, in genere del 2%, ma si stanno ottenendo risultati incoraggianti associando l'uso dell'elettroporazione, tecnica che consente di aumentare la permeabilità della membrana plasmatica ai plasmidi formando dei pori tramite impulsi elettrici ad alto voltaggio [33]

I vettori retrovirali sono stati introdotti con l'intento di correggere la mutazione nelle cellule satelliti attivate, così da creare un pool di cellule sane in grado di automantenersi nel rimpiazzo delle miofibre degenerate. Purtroppo hanno una bassa efficienza di trasduzione, circa del 6% nell'area adiacente al sito di inoculo [33].

I vettori adenovirali hanno un'efficienza di trasduzione del 50% e sono attivi su cellule proliferanti e quiescenti, anche se i mioblasti hanno un maggior numero di recettori adenovirali rispetto alle miofibre differenziate. Il loro uso è limitato per varie ragioni. Innanzitutto quelli di prima generazione stimolano il sistema immunitario all'uccisione T-dipendente delle cellule trasdotte; rimangono poi in forma episomica, non sono cioè inglobati nel DNA ospite e hanno una replicazione indipendente. Anche i vettori adenovirali cosiddetti «gutless», quelli cioè privati di tutti i geni virali eccetto le estremità ITR (ripetizioni terminali invertite, necessarie per la replicazione virale) e la sequenza di incapsidazione, pur potendo potenzialmente ospitare l'intero cDNA distrofinico, sono poco utilizzati [33] perché, mentre in natura gli Adenovirus possono funzionare da helper per la replicazione di altri virus difettivi, quali i Dependovirus (sub-famiglia Parvovirinae, famiglia Parvoviridae), detti appunto virus adeno-associati (AAV) [34], nella forma «guttless» sono gli Adenovirus a dover essere contaminati da virus helper, necessari per il packaging [33].

I vettori adeno-associati, utilizzati nel trattamento delle sarcoglicanopatie dove il gene da trasferire è di piccole dimensioni, garantiscono elevata efficienza di

trasduzione anche nelle miofibre mature, l'espressione è stabile e non evocano risposta immunitaria [33].

I vettori erpetici permettono l'inserzione dell'intero cDNA distrofinico e probabilmente anche una trasduzione stabile. Quelli di seconda generazione, difettivi di molti geni virali precoci, sono meno tossici per le cellule ospiti. Molto incoraggianti sono i risultati ottenuti in vitro su mioblasti e miotubi di topi mdx (i miotubi sono sincizi multinucleati derivati dalla fusione di mioblasti e che si differenziano in miofibre mature; vedi paragrafo 5.7) [33].

Il modello animale per eccellenza rimane il topo. Più di 30 forme di DM sono state caratterizzate e possono essere diagnosticate, ma i progressi in terapia sono lenti [6]. La terapia di recupero del gene ha dato buoni risultati al momento, ma rimane non attuabile per:

- la notevole estensione dei geni in questione (al momento si è alla creazione di una "mini-distrofina" relativamente efficiente di 167 kDa: circa metà della grandezza della distrofina)[6]
- la difficoltà di farli esprimere in più gruppi muscolari (circa 500 nel corpo umano)[6]
- la richiesta di tecnologie avanzate per distribuire il gene per via circolatoria e la captazione specifica del tessuto muscolare [6]
- problemi di reazione immunitaria verso i vettori virali [33] e verso il prodotto genico espresso prima assente [6] [33]
- possibili nuove mutazioni in altri geni indotte dalle tecniche [6]
- la trasduzione del gene rimane transiente, anche con vettori erpetici e retrovirali, ossia il gene non è integrato nel genoma cellulare e viene progressivamente diluito a mano a mano che il pool di miofibre si espande [33]

La terapia di recupero cellulare consiste in un trasferimento mioblastico, anch'esso molto difficile da realizzare [15]. Nei modelli animali si è osservato che i mioblasti possono fondersi con miofibre rigeneranti o in crescita: le nuove miofibre hanno nuclei di entrambi i tipi e citoplasma comune. Con questa manovra si rimpiazzano le cellule satelliti esaurite dal processo cronico di degenerazione/rigenerazione, ma si hanno due grossi limiti. Il primo è che la distrofina integra rimane localizzata in vicinanza dei nuclei normali che la esprimono, e risulta improponibile eseguire, come si è stimato, iniezioni di 30-50 milioni di mioblasti per cm³ di muscolo nei bambini per ottenere un eventuale effetto terapeutico. Il secondo limite è la risposta immunitaria citotossica scatenata dai mioblasti iniettati, essendo disponibili al momento solo cellule di origine eterologa [33].

Rispetto ad un approccio terapeutico ai deficit primari di ogni singola forma di DM, sembra più realistico il trattamento di manifestazioni secondarie comuni a più forme di DM, quali l'instabilità di membrana, la necrosi e l'infiammazione. Ciò favorendo l'espressione di prodotti genici che limitano la degenerazione o favoriscono la rigenerazione. Il limite nel loro uso risiede nella loro tossicità, relativa al corretto splicing della prodotto proteico. Il sito, il livello e i tempi di espressione sono poi determinanti. Da sottolineare l'importanza che questi geni hanno nella comprensione dei meccanismi patogenetici delle DM. L'espressione di alcuni booster genes ("geni di supporto") sono stati sperimentati in topi mdx (distrofina-privi) e topi dy ($\alpha 2$ -laminina-privi).[6]:

- integrina $\alpha 7\beta 1$: proteina di uno dei due maggiori complessi di adesione cellulare nel muscolo, assieme alle glicoproteine associate alla distrofina (DAGs). Una sovraespressione due/tre volte superiore alla norma nel topo distrofina-utrofina-privi ha prolungato notevolmente la vita dell'animale, attenuando il decorso patologico sostituendosi in parte alle DAGs. [6]
- mini-agrina : di 120 kDa, costruita con il dominio amino-terminale (che lega la laminina) e il dominio carbossi-terminale (che lega i distroglicani). Questa proteina, creando un ponte fra i distroglicani e la $\alpha 5$ -laminina previene i deficit morfofunzionali della $\alpha 2$ -lamininopatia. Questa strategia evita problemi di immunogenicità. [6]
- GalNac transferasi : enzima responsabile della glicosilazione dei distroglicani, necessaria perché leghino la laminina. La sovrageglicosilazione rende più saldo il legame riducendo gli aspetti microscopici della degenerazione. L'effetto è sorprendente vista l'influenza negativa che questa sovraespressione ha nello sviluppo muscolare del topo non mutante. Tuttavia sono segnalate DM dovute a difetti di glicosilazione. [6]
- nNOS(ossido nitrico sintasi neuronale): è normalmente presente nella membrana della fibra muscolare, ma nel topo mdx è dissociata dalla membrana ed è ridotta la produzione di ossido nitrico. La sovraespressione di nNOS transgenica normalizza i livelli di ossido nitrico, riduce la necrosi, i livelli plasmatici di CK, il chemiotropismo monocitario. Anche livelli 50 volte superiori la norma non sono tossici. [6]
- ADAM12 (A-Disintegrina e metalloproteasi12) : una delle 30 metalloproteasi con potere di legare l'integrina; altamente espressa nel muscolo in via di sviluppo o in fase rigenerativa, ma non nel muscolo formato. Nel topo mdx riduce gli aspetti distrofici, probabilmente favorendo l'adesione cellulare legando integrine e sindecani, potenziando la presenza dell'utrofina e modulando i fattori di crescita nella rigenerazione [6].

- IGF1: promuove la proliferazione e la differenziazione delle fibre muscolari. Aumentando la fosforilazione della proteina antiapoptotica Akt favorisce la sopravvivenza delle fibre sane. La sovraespressione nel topo mdx riduce la necrosi, aumenta la massa e la forza muscolare. Compare il rischio di ipertrofia cardiaca se espressione troppo elevata.[6]

- calpastatina : inibitore specifico di alcune calpaine, proteasi attivate dal calcio. L'afflusso di calcio e di altre molecole nella fibra distrofina-priva non è controllato data l'instabilità membranaria. La superattivazione di queste proteasi gioca un ruolo chiave nella degenerazione muscolare. Sovraesprimendo la calpastatina, si limita la necrosi pur non limitando il deficit membranario.[6]

- miostatina : agente di blocco della rigenerazione muscolare. Il blocco o la riduzione della sua espressione riduce la fibrosi e la deposizione di tessuto adiposo tipiche delle DM. Ancora discussa la capacità di ridurre necrosi, osservata insieme alla riduzione di SCK dopo somministrazione di anticorpo neutralizzante la miostatina per via intraperitoneale nel topo dmx, e non osservata nel topo mdx miostatina-privo (come controprova), dove persiste necrosi e infiammazione. La terapia anti-miostatina è dunque pratica per la possibilità di trattamenti sistemici, usando il suo prodominio, la follistatina, e suoi recettori solubili.[6]

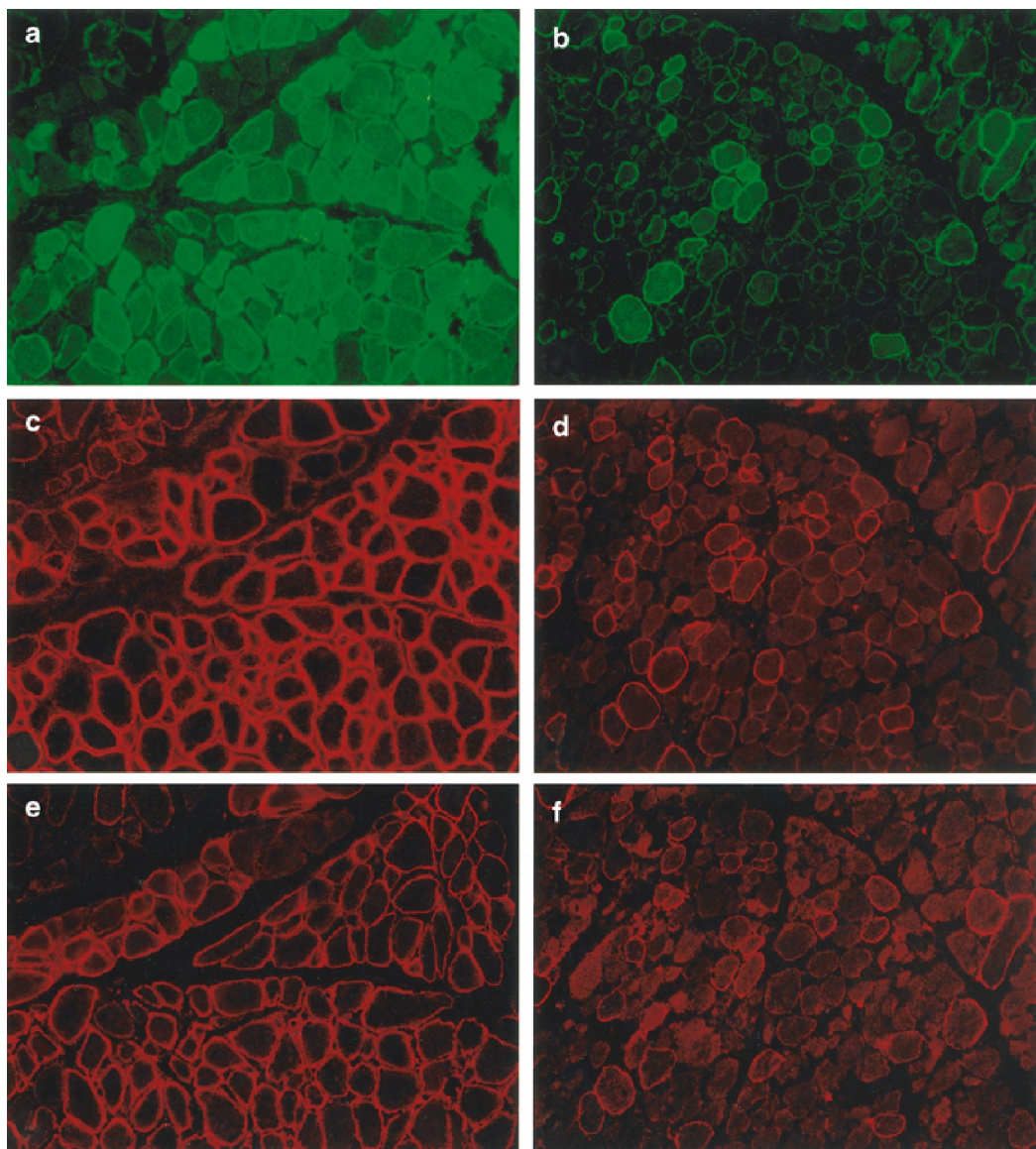
Sempre nel topo, alcuni studi hanno evidenziato che l'utrofina può sostituire la distrofina impedendo la perdita di componenti proteiche dei complessi transmembranari, stabilizzando il sarcolemma e assicurando la sopravvivenza della miofibra. Ma sviluppare una strategia realizzabile clinicamente è il vero limite di questo approccio terapeutico, che presume un'espressione di utrofina nel muscolo distrofico di entità enorme [8].

Rimanendo nell'ambito delle DM associate al cromosoma X (DMD e BMD) e dei cingoli (LGMD), che sono le forme più frequenti e gravi tra le distrofie muscolari, si può dire che si stanno continuando ad eseguire molteplici sperimentazioni di terapia genica nei vari modelli animali. Con il tempo daranno risultati statistici più facilmente valutabili. In questa sede ci si limiterà solamente ad accennare qualche osservazione [nda].

Lo studio della terapia farmacologica su *C.elegans* è ritenuto essere più semplice che nei modelli animali mammiferi: il topo risulta troppo salubre per permettere uno screening su ampia scala delle sole manifestazioni fenotipiche; il cane è sicuramente più affidabile, ma i costi e le eventuali reazioni degli animalisti sono limiti notevoli. Perciò il nematode appare il più indicato: il principio attivo somministrato nel comune terreno di coltura viene assorbito per via transcuticolare od orale [19].

Il cane, pur essendo poco adatto per prime sperimentazioni a causa del tempo di generazione relativamente lungo, risulta nella pratica molto adatto allo studio di applicazioni derivate dallo studio sui topi e dirette all'uomo.[7]

Il Golden Retriever è molto usato come modello animale di DMD in sperimentazioni di terapia genica. È già stata eseguita una trasduzione, ossia il trasferimento di un gene tramite vettori virali (adenovirus, herpesvirus) che possono depositare la proteina sana da esprimere nelle cellule bersaglio [2]. Vedasi a proposito i risultati ottenuti nelle figure sottostanti.



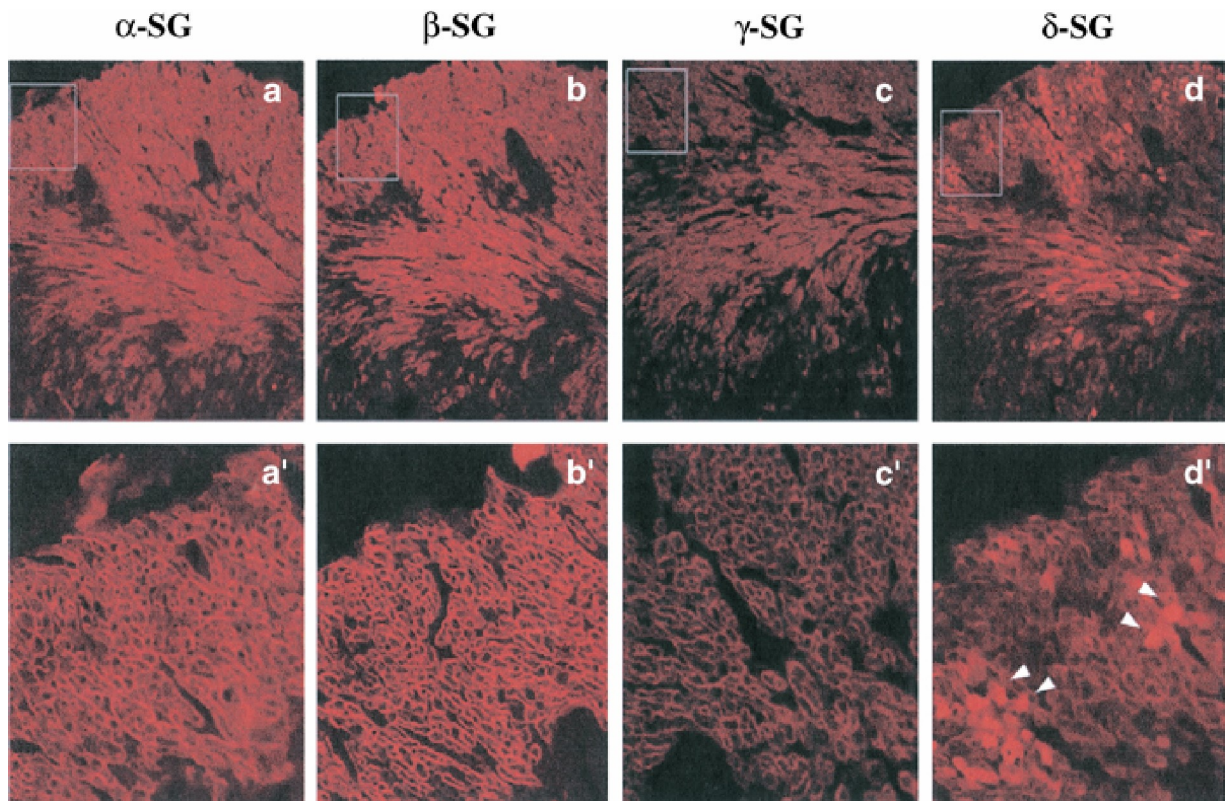
FIG_ 6.2.c [58] Esame immunoistochimico di muscolo affetto da CXMD. Il soggetto è stato trattato con iniezione di utrofina adeno-associata. Sul lato sinistro (a,c,e) è stato condotto un trattamento con ciclosporina non eseguito sui preparati di destra (b,d,f). Quindi nei preparati a e b sono stati fatti reagire anticorpi anti-utrofina; in c e d anti- β -sarcoglicano; in e ed f anti- β -dystroglicano. È evidente l'influenza

dell'immuno-soppressione con ciclosporina, e la stabilità di membrana resa dall'utrofina che garantisce l'espressione delle altre glicoproteine associate alla distrofina. 250X.

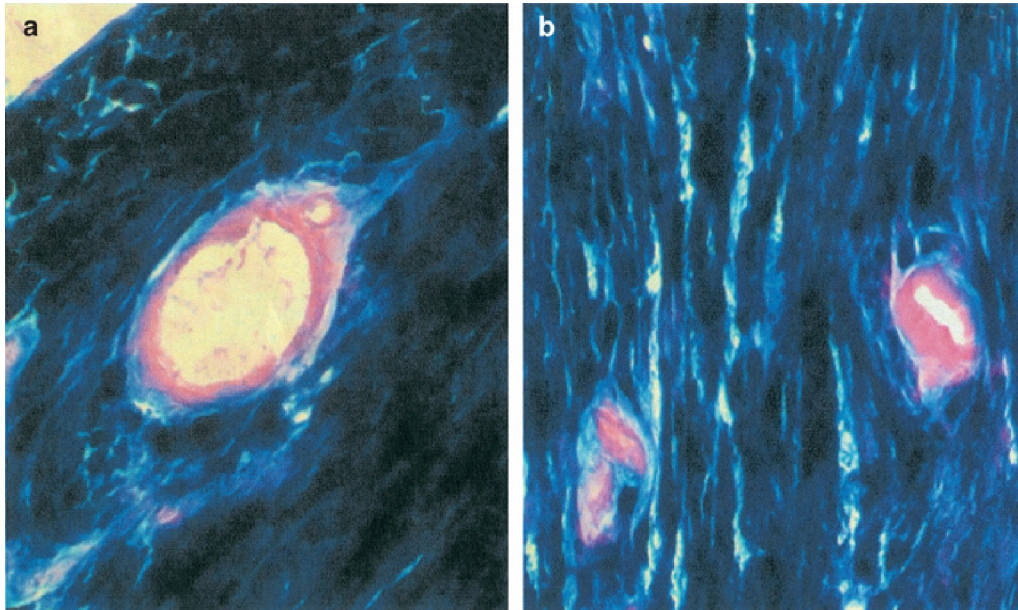
Nell'uomo naturalmente il campo d'azione è limitato, sia in ambito clinico che sperimentale. La terapia cellulare con precursori di fibre muscolari, seguita da terapia immunosoppressiva con ciclofosfamide o ciclosporina A ha dato esiti non rassicuranti, sia per i risultati negativi riportati (bassa migrazione mioblastica, bassa espressione di distrofina) sia per le scarse indagini di controllo e monitoraggio effettuate nel protocollo [33]. È invece un fattore proibitivo per la pratica clinica la risposta immunitaria data con questa metodica, e per evitare questo fenomeno le ricerche in atto programmano di inoculare mioblasti autologhi ingegnerizzati ex-vivo e contenenti il gene integro della distrofina [33].

La terapia genica non è ancora stata praticata in studi clinici per la DMD, mentre si sta valutando, in uno studio che prevede la durata di tre anni, la reazione immunitaria e la disseminazione dei vettori adeno-associati, contenenti geni dei sarcoglicani α , δ e γ , in pazienti ammalati di queste forme distrofiche e inoculati per via intramuscolare nel muscolo estensore breve delle dita [33].

Nel criceto colpito spontaneamente dalla DM autosomica recessiva per mutazione al δ -sarcoglicano (forma omologa della LGMD-2F umana), si può ottenere la guarigione con terapia genica, tramite vettori virali [2]. Questo animale ha disfunzioni muscolari lievi che in parte ricordano quelle del topo mdx, ma manifesta un'insufficienza cardiaca tale da condurlo a morte nel primo anno di vita [33]. Inoculi intramuscolari di vettori adeno-associati hanno dato alta efficienza di trasduzione, elevata espressione dei transgeni, diminuzione della degenerazione muscolare e non è stata riscontrata risposta citotossica [33].



FIG_ 6.2.a [57] Recupero del complesso sarcoglicanico sulla membrane cellulare dei cardiomiociti di un cuore trapiantato di criceto Bio14.6, dopo infusione di vettori virali Adeno-associati per via coronarica. Le figure sopra e sotto indicano rispettivamente prima e dopo l'effetto. L'espressione è avvenuta in circa il 90% dei miocardiociti, è persistita per oltre un anno, senza fenomeni di immunoreazione o espulsione del promotore.



FIG_ 6.2.b [57] Vasi sanguigni del medesimo soggetto descritto in FIG_6.2.a. La trasduzione non è risultata efficiente né nei vasi di grosso calibro (a), né in quelli di piccolo calibro (b).

ALCUNE ABBREVIAZIONI

- AD, autosomico dominante
- ALT, alanina aminotransferasi
- AR, autosomico recessivo
- AST, aspartato aminotransferasi
- BMD, distrofia muscolare tipo Becker
- DAGs (oppure DGC, dystrophin-glycoprotein complex) glicoproteine associate alla distrofina
- DAP, (dystrophin associated proteins) proteine associate alla distrofina
- DGs, Distroglicani
- DM, distrofia muscolare (sigla usata anche per abbreviare Distrofie miotoniche)
- DMD, distrofia muscolare tipo Duchenne
- EDMD, Emery-Dreifuss muscular dystrophy
- Gain-of-function locuzione attribuita ad una mutazione, quando questa fa acquisire al prodotto genico una nuova proprietà biologica
- HFMD, hypertrophic feline muscular dystrophy
- LGMD, distrofia muscolare dei cingoli pelvico e toracico
- Loss-of-function locuzione attribuita ad una mutazione, quando questa fa perdere al prodotto genico una nuova proprietà biologica
- nNOS, NOS neuronale
- NO, ossido nitrico
- NOS, enzima sintasi dell'ossido nitrico
- PK, piruvato kinasi
- SCK, creatina chinasi sierica

- SGs, Sarcoglicani
- Topo dy , topo α 2-laminina- privo
- Topo mdx , topo distrofina-privo
- UTR, utrofina
- Y2H (yeast two-hybrid assay) test di laboratorio messo a punto negli anni '80, e in seguito perfezionato, per studiare l'interazione tra varie componenti proteiche

BIBLIOGRAFIA

1. McGavin MD, Valentine BA, 2001, Muscle. In Thomson's special veterinary pathology, McGavin MD, Carlton WW, Zachary F, pgg 461-478, Saint Louis (Missouri): ed. Mosby.
2. Marcato PS, Rosmini R, Bazzo R, 2002. Sistema locomotore: muscoli. In Patologia sistematica veterinaria, Marcato PS, pg 1095-1196. Bologna: ed.Edagricole.
3. Guarda F, Castagnaro M, 2002, Muscoli scheletrici. In Trattato di anatomia patologica veterinaria, Guarda F, Mandelli G, ed.UTET, pgg 91-116, Torino: ed. UTET.
4. Aiello SE, 2003, Il manuale Merck veterinario 8^a ed, pg 852-860. Bologna: ed.Giraldi.
5. Zatz M, DePaula F, Starling A, Vainzof M, 2003, The 10 autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy, Neuromuscular Disorders (13): 532-544.
6. Engvall E, Wewer UM, 2003, The new frontier in muscular dystrophy research: booster genes, The FASEB Journal (17): 1579-1584.
7. Partridge T, 1991, Animal models of muscular dystrophy - what can they teach us?, Neuropath and Appl Neurobiol (17): 353-363.
8. Porter JD, 1998, Commentary: extraocular muscle sparing in muscular dystrophy: a critical evaluation of potential protective mechanisms, Neuromuscular Disorders (8): 198-203
9. Dubowitz V, report non pubblicato basato sui dati pubblicati in Neuromuscular Disorders: 1994, 4 (1): 75-81; 1995, 5(3): 253-258; 1996, 6(4): 295-301, con il permesso di Pergamon Press Ltd, Headington Hill Hall, Oxford.
10. Kuang W et al., 1998, Merosin-deficient congenital muscular dystrophy, J. Clin. Invest. 102 (4): 844-852.
11. Helbling-Leclerc A, Bonne G, Schwartz K, 2002, Emery-Dreifuss muscular dystrophy, European Journal of Human Genetics (10): 157-161.
12. Pasotti M, Repetto A, Pisani E, Arbustini E, 2004 Malattie associate a difetti del gene della lamina A/C: quello che il cardiologo clinico deve sapere. Ital Heart J Suppl 5 (2): 98-111.
13. Östlund C, Worman JH, 2003, Nuclear envelope proteins and neuromuscular disease, Muscle and Nerve 27: 393-406.
14. Emery AEH, 2002, Muscular dystrophy into the new millennium, Neuromuscular Disorders (12): 343-349.
15. Watchko JF, O'Day TL, Offman EP, 2002, Functional characteristics of dystrophic skeletal muscle: insights from animal models, J Appl Physiol (93): 407-417.
16. Sarli G, Della Salda L, Marcato PS, 1994, Dystrophy-like myopathy in a foal, The veterinary record 135: 156-160.
17. Montagna P, Liguori R, Monari L, et al, 2001, Equine muscular myotonia, Clinical Neurophysiology 112: 294-299.

18. Manni E, 1990, L'occhio, in *Fisiologia umana* 5°ed vol II, Rindi G, Manni E, Torino: ed. UTET, pgg 125-169.
19. Sélegat L, 2002, Dystrophin and functionally related proteins in the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Neuromuscular Disorders* (12): S105-S109.
20. Megeney L, Kablar B, Garrett K, Anderson J, Rudnicki M, 1996, MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle, *Genes Dev* (10): 1173-1183.
21. Bassett DI, Currie PD, 2003, The Zebrafish as a model for muscular dystrophy and congenital myopathy, *Human Molecular Genetics*(12): R265-R270.
22. Shelton GD, Engvall E, 2002, Muscular dystrophy and other inherited myopathies, *Neuromuscular disease*, (32) 1: 103-124
23. Overstreet RM, Barnes SS, Manning CS, Hawkins WE, 2000, Facilities and husbandry (small fish models). In *The laboratory fish*, GK Ostrander, pgg 41-63, London: Academic Press
24. TJ Hulland, 1993, Muscle and tendon. In *Pathology of domestic animals*, KVF Jubb, PC Kennedy, N Palmer, pgg 183-265, San Diego(California): Academic Press Inc.
25. JF Van Fleet, 1997, Skeletal muscle. In *Veterinary pathology*, TC Jones, RD Hunt, NW King, pgg 873-897, Baltimore (Maryland): Lippincott Williams & Wilkins.
26. JSM Pearce, 1999, Some contributions of Duchenne de Boulogne (1806-1875), *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 67: 322.
27. Khanna S, Richmonds CR, Kaminski HJ, Porter JD, 2003, Molecular organization of the extraocular muscle neuromuscular junction: partial conservation of and divergence from the skeletal muscle prototype, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44(5): 1918-26.
28. Briggs MM, Schachat F, 2002, The superfast extraocular myosin (MHY13) is localized to the innervation zone in both the global and orbital layers of rabbit extraocular muscle, *J Exp Biol*, 210(Pt20): 313-42.
29. Pedrosa-Domello F, Holmgren Y, Lucas CA, Hoh JF, Thornell LE, 2000, Human extraocular muscles: unique pattern of myosin heavy chain expression during myotube formation, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(7): 1608-1616.
30. Kjellgran D, Thornell LE, Andersen J, Pedrosa-Domello F, 2003, Myosin heavy chain isoforms in human extraocular muscles, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44(4): 1419-25.
31. Delfino G, Lanciotti E, Liguri G, Stefani M, 1996, *Medicina e Biologia. Dizionario enciclopedico di scienze mediche e biologiche e di biotecnologie*, Bologna: ed.Zanichelli.
32. Bortolami R, Callegari E, 1999, Occhio e orecchio. In *Neurologia ed estesiologia degli animali domestici*, Bortolami R, Callegari E, pgg167-210, Bologna: ed.Edagricole.
33. Lollini PL, DeGiovanni C, Nanni P, 2001, *Terapia genica*, Bologna: ed.Zanichelli.
34. Poli G, 1998, *Virologia generale*. In *Trattato di malattie infettive degli animali*, Farina R, Scatozza F, pgg 12-49. Torino: ed.Utet.
35. Brais B, 2003, Oculopharyngeal muscular dystrophy: a late onset polyalanine disease, *Cytogenetic and genome research*, 100: 252-260.

36. Bonne G, Ben Yaou R, Bérout C et al, 2003, 108th ENMC International workshop, 3rd Workshop of the myo-cluster project. 13-15 September 2002, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscular Disorders*, 13: 508-515.
37. Stamler JS, Meissner G, 2001, Physiology of Nitric Oxide in Skeletal Muscle, *Physiol Rev*, 81: 209-237. [38]
38. Hayashi YK, 2003, Membrane-repair machinery and muscular dystrophy, *The Lancet* 362 (13):843-844.
39. Durbeej M, Campbell KP, 2002, Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models, *Current Opinion in Genet and Develop* (12): 349-361
40. <http://www.wormatlas.org/handbook/contents.htm>
41. Bansal D, Campbell KP, 2004, Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy, *Trends in Cell Biology* 14(4): 206-213.
42. Passarge E, 1999, *Atlante a colori di Genetica*, pgg 190-191, Roma: Arti Grafiche editoriali.
43. Yoshioka M, Itagaki Y, Saida K, Nishitani Y, 1986, Clinical and genetic studies of muscular dystrophy in young girls, *Clin Genet*. Feb;29(2): 137-42.
44. Reece WO, 1993, Blood, circulation and cardiovascular system, in *Dukes' physiology of domestic animals*, Swenson MJ, Reece WO, pgg 01-262, Ithaca: Cornell University Press
45. Amack JD, Mahadevan MS, 2004, Myogenic defects in myotonic dystrophy, *Dev Biol*, 265(2):294-301.
46. Bates GP, Hay DG, 2004, Mouse models of triplet repeat diseases, *Methods Mol Biol*, 277:3-15.
47. Phylactou LA, 2004, Repair of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) transcripts by trans-splicing ribozymes, *Methods Mol Biol*, 252:373-83.
48. Yanowitz JL, Shakir MA, Hedgecock E, Hutter H, Fire AZ, Lundquist EA., 2004, UNC-39, the *C. elegans* homolog of the human myotonic dystrophy-associated homeodomain protein Six5, regulates cell motility and differentiation, *Dev Biol*, 272(2): 389-402.
49. Hegreberg GA, Hamilton MJ, Padget GA, 1976, Muscular dystrophy of mink: a new animal model, *Fed Proc*, 35(5): 1218-24.
50. Hegreberg GA, Padget GA, Prieur DJ, Johnson MI, 1975, Genetic studies of a muscular dystrophy of mink, *J Hered*, 66(2): 63-66
51. Gailly P, 2002, New aspects of calcium signaling in skeletal muscle cells: implications in Duchenne muscular dystrophy, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1600: 38– 44.
52. Banks GB, Fuhrer C, Adams ME, et al, 2003, The postsynaptic submembrane machinery at the neuromuscular junction: Requirement for rapsyn and the utrophin/dystrophin-associated complex, *Journal of Neurocytology*, 32, 709–726
53. Blake DJ, 2002, Dystrobrevin dynamics in muscle-cell signalling: a possible target for therapeutic intervention in Duchenne muscular dystrophy?, *Neuromuscular Disorders*, 12: S110–S117

54. Branca D, 2004, Calpain-related diseases, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322: 1098–1104

55. Ferraria G, Mavilioa F, 2002, Myogenic stem cells from the bone marrow: a therapeutic alternative for muscular dystrophy? *Neuromuscular Disorders*, 12: S7–S10

56. Muntoni F, Fishera I, Morgan JE, Abraham D, 2002, Steroids in Duchenne muscular dystrophy: from clinical trials to genomic research *Neuromuscular Disorders* 12: S162–S165.

57. Li J, Wang D, Qian S, Chen Z, Zhu T, Xiao X, 2003, Efficient and long-term intracardiac gene transfer in dsarcoglycan-deficiency hamster by adeno-associated virus-2 vectors *Gene Therapy*, 10: 1807–1813.

58. M Cerletti M, T Negri T, Cozzi F et al, 2003, Dystrophic phenotype of canine X-linked muscular dystrophy is mitigated by adenovirus-mediated utrophin gene transfer, *Gene Therapy*, 10: 750–757.