

Avances genéticos en las distrofinopatías

Jesús Molano

Unidad de Genética Molecular

INGEMM

Hospital Universitario La Paz

Madrid

Distrofias musculares hereditarias

Definición:

Grupo de enfermedades hereditarias caracterizadas por debilidad muscular progresiva y cambios degenerativos en el tejido muscular

Distrofias mas frecuentes:

Distrofia muscular de Duchenne/Becker

Distrofias miotónicas 1y 2

Distrofia muscular de cinturas escapulohumeral y pélvica

Distrofia muscular de Emery-Dreifuss

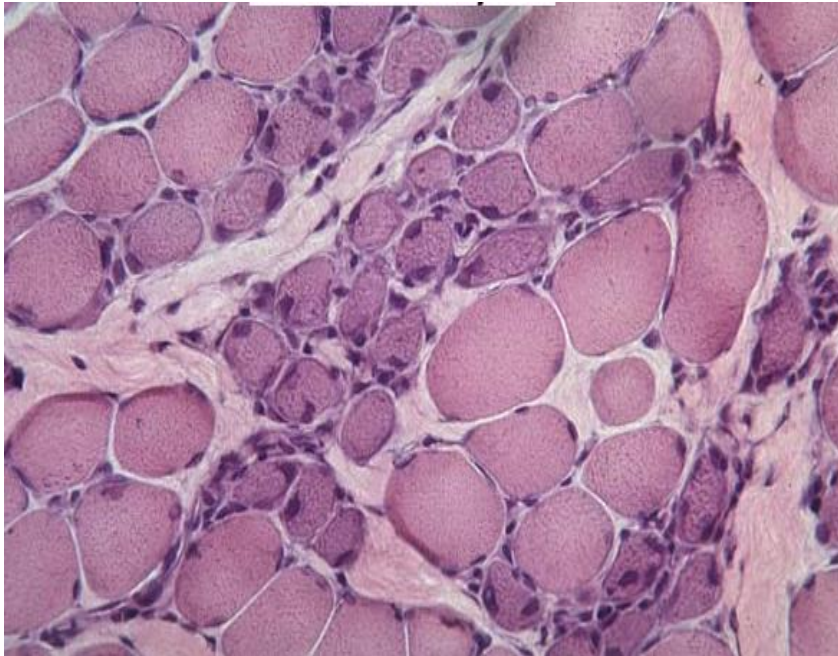
Distrofia muscular facioescapulohumeral

Distrofia muscular oculofaríngea

Distrofias musculares congénitas, etc.

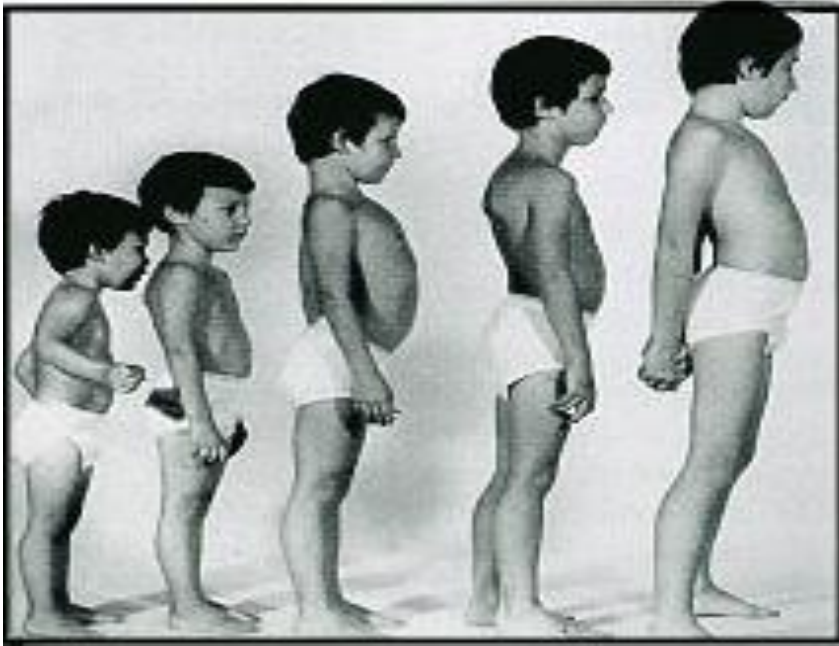
Anatomía patológica en las distrofias musculares

Degeneración muscular progresiva con desaparición de tejido muscular y aumento del tejido conjuntivo. Pueden llevar alteraciones cardiacas asociadas



Distrofia muscular de Duchenne

- Enfermedad grave
- Degeneración muscular y fibrosis
- Miocardiopatía dilatada
- Leve déficit intelectual
- Esperanza de vida: 20 años



1-4 años:

- Inicio de los síntomas
- Dificultad para andar y levantarse.
- Maniobra de Gowers

5-10 años:

- Hiperlordosis.
- Pseudohipertrofia de pantorrillas.
- Debilidad en brazos y cuello.

10-15 años:

- Necesidad de aparatos ortopédicos y silla de ruedas.
- Escoliosis.
- Cardiopatía y problemas respiratorios.
- Fallecimiento antes de los 20 años.



Distrofia muscular de Duchenne/Becker

Herencia mendeliana ligada al cromosoma X recesiva

- La enfermedad la padecen exclusivamente los varones
- Solamente las mujeres pueden transmitir la enfermedad
- La probabilidad de una mujer portadora de tener un hijo afectado es de 1 en 4

Herencia en la distrofia muscular de Duchenne/Becker

- 1/3 de los casos son debidos a mutaciones de novo en la línea germinal materna
- Aproximadamente el 60-65 % de los casos se deben a deleciones de gran tamaño en el gen de la distrofina
- Algunos pacientes sufren una forma leve de la enfermedad llamada distrofia muscular de Becker

When to suspect DMD

Retraso en el andar

(old)

If there is a positive family history of DMD:

Historia familiar

Elevación de
las transaminasas

Determinación de
CK en sangre

Confirming the diagnosis

Deleciones y duplicaciones
en gen DMD

Biopsia muscular

No es una
distrofinopatía

Secuenciación
gen DMD

Dystrophin

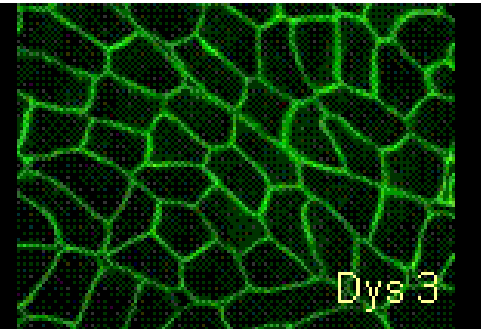
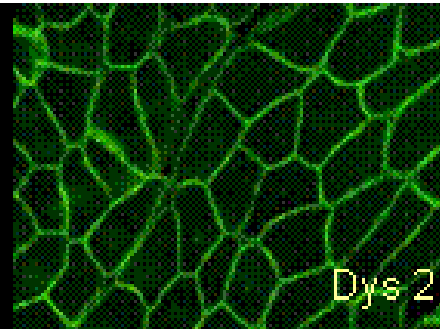
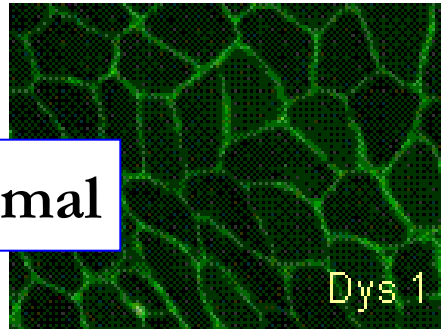
Diagnóstico de distrofinopatía

→ No
→ Yes

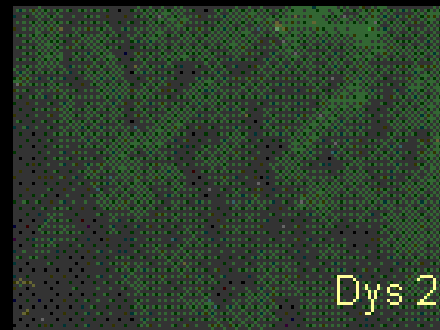
Post-diagnosis

- For patients diagnosed by muscle biopsy, dystrophin genetic testing is also necessary
- For patients diagnosed by genetic testing, muscle biopsy is optional to distinguish DMD from milder phenotypes
- Referral to specialised multidisciplinary follow-up is needed
- Genetic counselling is highly recommended for any at-risk female family members
- Patient and family support and contact with patient organisations should be offered

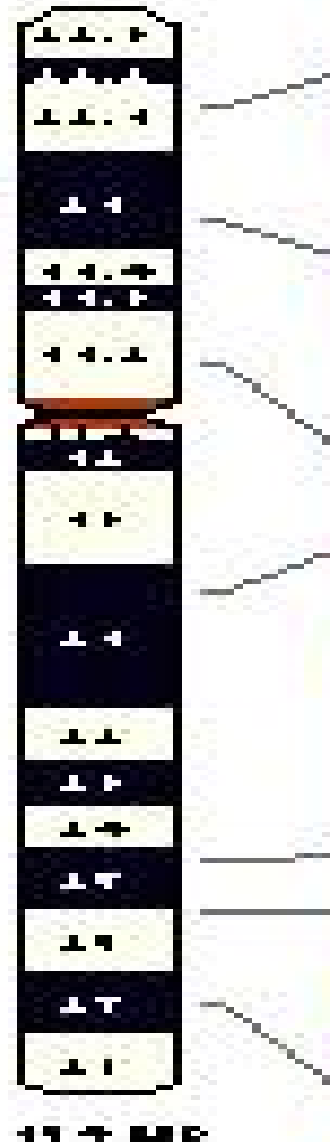
Músculo normal



**Músculo de distrofia
de Duchenne**



DND → **-**



Cromosoma X

Características de la distrofina y de su gen

Gen de la distrofina

>2000 Kb

14 Kb mRNA

79 exones

Proteína distrofina

427 Kdalton

3685 aminoácidos

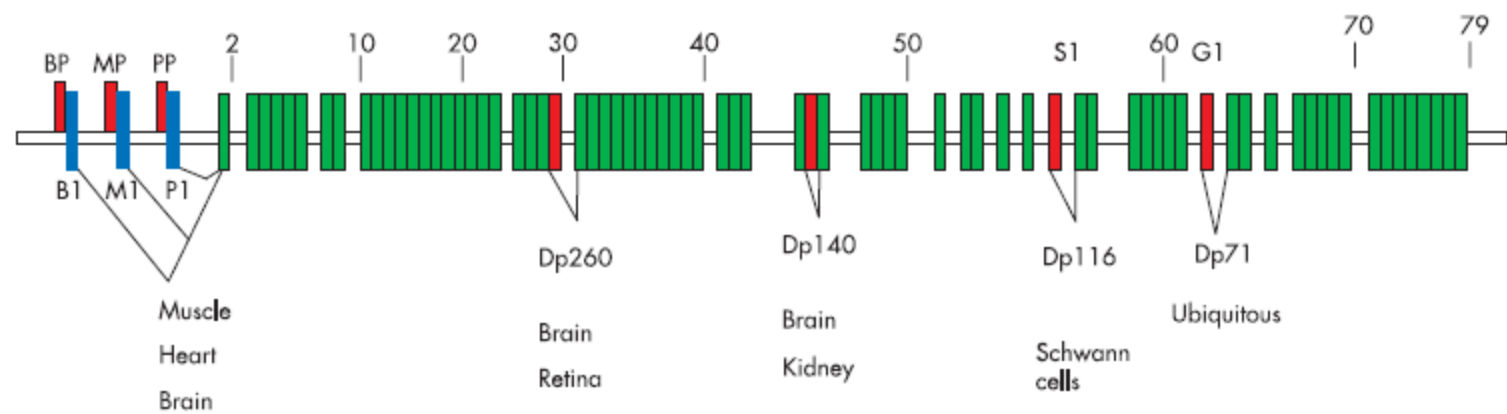
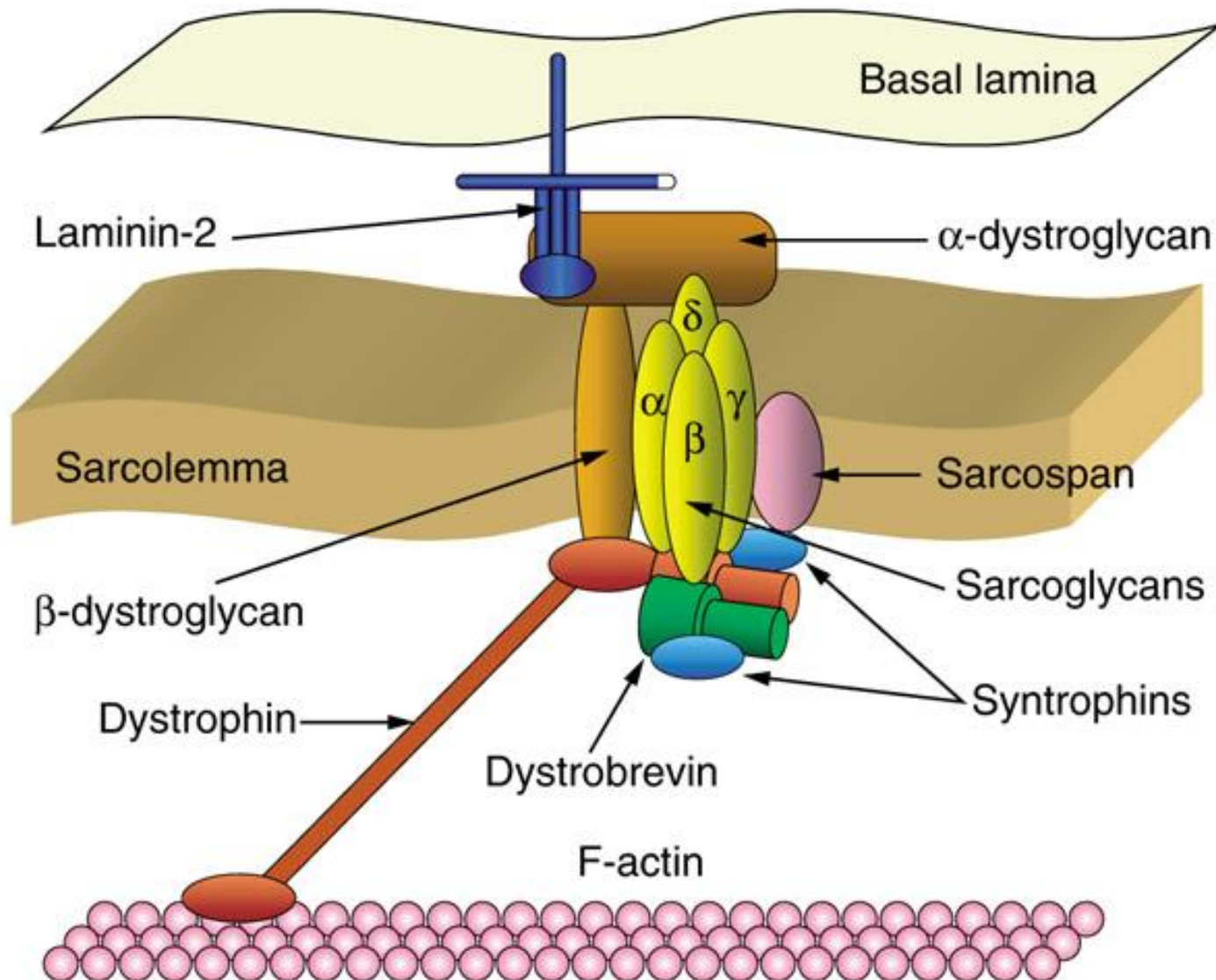


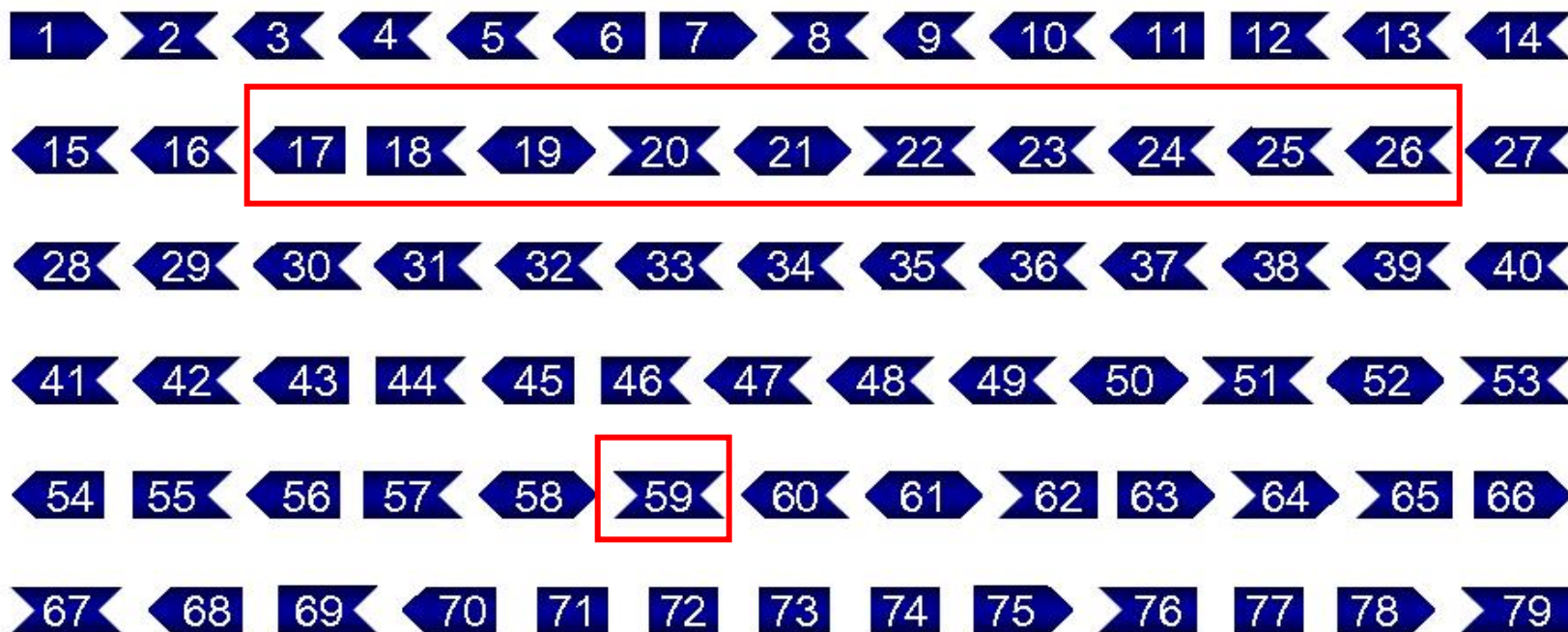
Figure 1 Physical map of the dystrophin gene. Green boxes indicate exons, blue boxes indicate exons specific for each promoter (B1, first brain exon; M1, first muscle exon; P1, first Purkinje exon), and red boxes indicate promoters (BP, brain promoter; G1, general type promoter; MP, muscle promoter; PP, Purkinje promoter; S1, Schwann cell promoter). Not drawn to scale.

Cohen y Muntoni. Heart 2004;90:835–841



Chakkalakal et al. *FASEB J.* **19**, 880–891 (2005)





Los exones del gen DMD

www.dmd.nl

Formas clínicas de distrofinopatía según la delección que presenta el paciente

En fase alterada

En fase correcta

Distrofia de Duchenne

96

4

Distrofia de Becker

16

84

La forma clínica se corresponde con el tipo de delección (frameshit/non-frameshift)

Patient ID	Deleted exons as detected by MLPA analysis	Clinical form as predicted by the frameshift hypothesis	Actual disease
HDL	45-50	DUCHENNE	DUCHENNE
RPG	45-54	DUCHENNE	DUCHENNE
JFA	8-27	DUCHENNE	DUCHENNE
RCC	11-17	DUCHENNE	DUCHENNE
AMS	45	DUCHENNE	DUCHENNE
ACS	18-41	DUCHENNE	DUCHENNE
JSL	45	DUCHENNE	DUCHENNE
VAG	8-30	DUCHENNE	DUCHENNE
JDM	51-55	DUCHENNE	DUCHENNE
JHG	43-45	DUCHENNE	DUCHENNE.
JMG	56	DUCHENNE	DUCHENNE
JRP	46-47	DUCHENNE	DUCHENNE
JBC	Pm-44	DUCHENNE	DUCHENNE
MGF	45-54	DUCHENNE	DUCHENNE
EOG	45-55	BECKER	BECKER
MRF	45-53	BECKER	BECKER
CAV	45-53	BECKER	BECKER
DGJ	45-52	DUCHENNE	DUCHENNE
FDG	53-55	DUCHENNE	DUCHENNE
PAV	45-51	BECKER	BECKER
APD	8-11	DUCHENNE	DUCHENNE
JGG	45-47	BECKER	BECKER
MG	14-29	BECKER	BECKER
MAC	12-20	DUCHENNE	DUCHENNE
JCP	34	INGEMM	BECKER

Tratamiento de la distrofia de Duchenne

Corticoides

Terapia génica

El ratón *mdx* como modelo animal de la distrofia de Duchenne

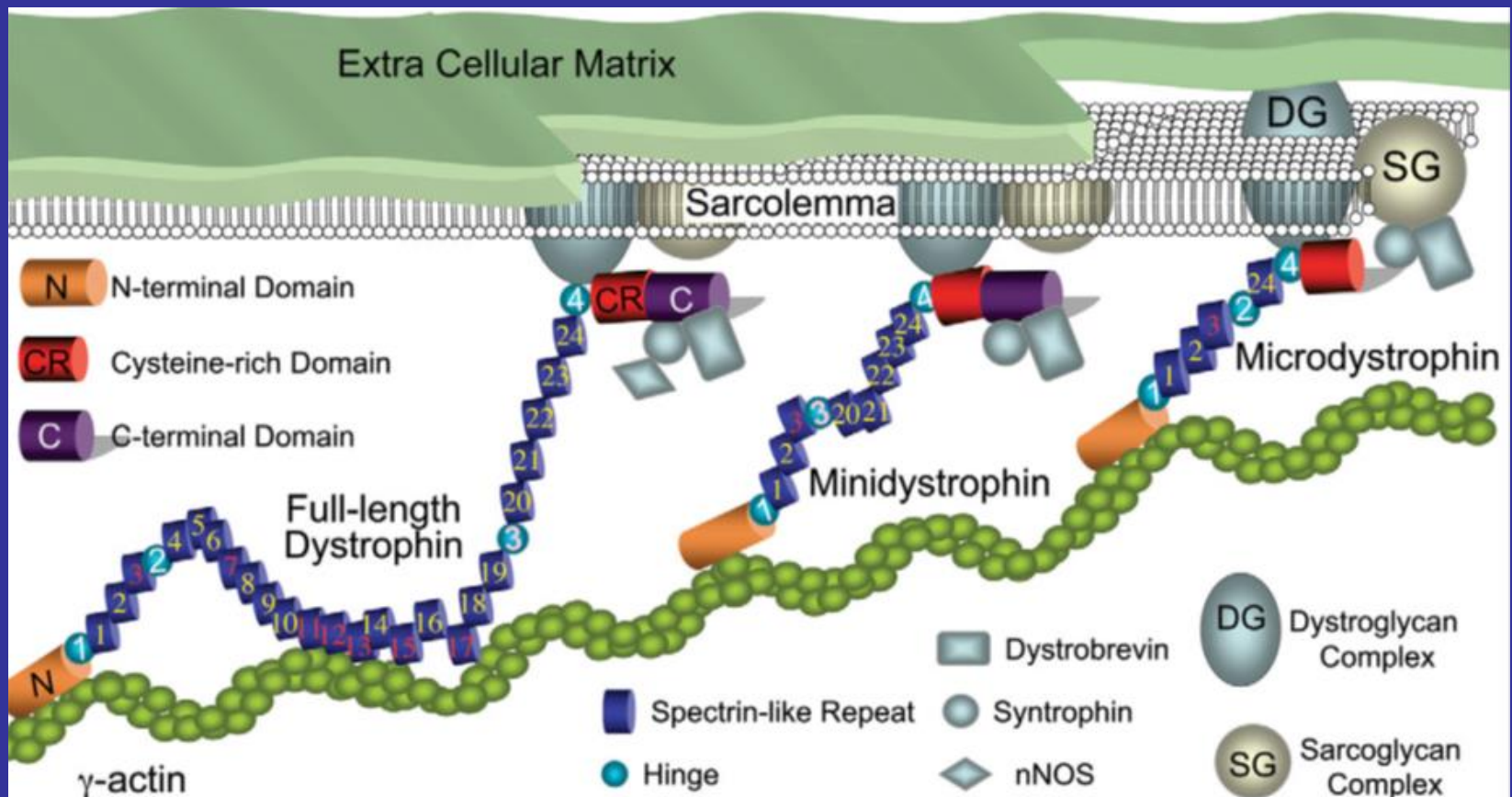
<u>Distrofia de Duchenne</u>		<u>Ratón <i>mdx</i></u>
Distrofina en músculo	No	No
Fibrosis endomisial	Si	No
Regeneración muscular	Poca	Sí
Mutaciones	Deleciones, duplicaciones inserciones puntuales,etc	Mutación Stop en exón 23
Gravedad de la distrofia muscular	Elevada	Moderada

Terapia génica de la distrofia de Duchenne

Reposición del gen (Minigenes)

Vectores virales

Adenovirus modificados, AAV, EBV, HSV



Dystrophin levels as low as 30% are sufficient to avoid muscular dystrophy in the human

Marcella Neri ^{a,b}, Silvia Torelli ^a, Sue Brown ^a, Isabella Ugo ^a, Patrizia Sabatelli ^b,
Luciano Merlini ^b, Pietro Spitali ^b, Paola Rimessi ^b, Francesca Gualandi ^b, Caroline Sewry ^{a,c},
Alessandra Ferlini ^{a,b}, Francesco Muntoni ^{a,*}

^a *Dubowitz Neuromuscular Centre, Imperial College, Hammersmith Hospital, Du Cane Road, London W12 0NN, UK*

^b *Medical Genetics Section, Department of Experimental Diagnostic Medicine, University of Ferrara, Italy*

^c *Wolfson Centre for Inherited Neuromuscular Disorders, Department of Musculoskeletal Pathology,
Robert Jones and Agnes Hunt Orthopaedic Hospital, Oswestry, UK*

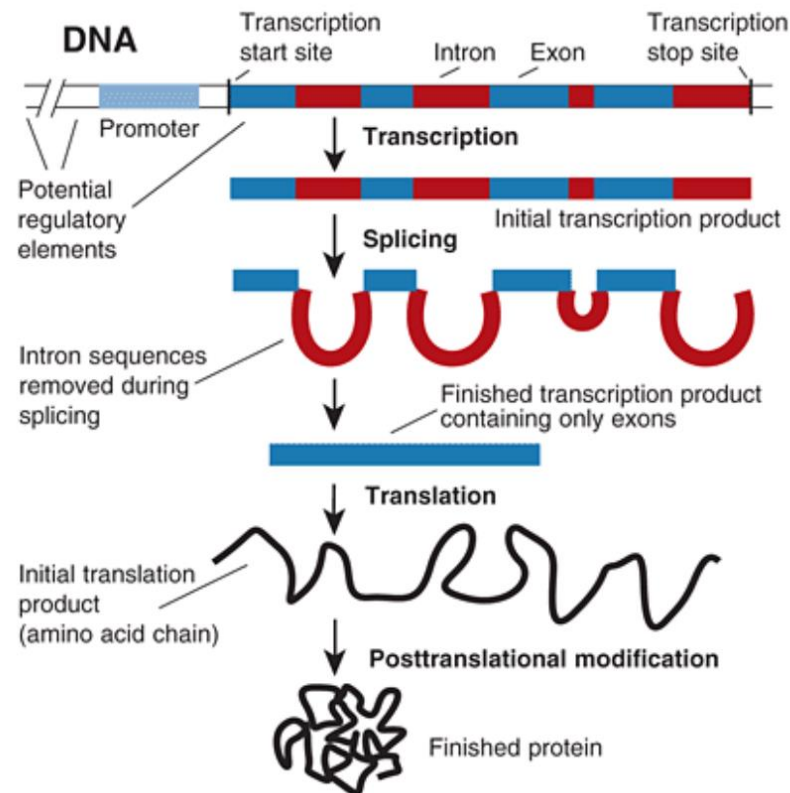
Received 2 May 2007; received in revised form 9 July 2007; accepted 16 July 2007

Reparación del gen

Reparación del mRNA: oligonucleótidos antisense (AON, GSK2402968)

Traducción de mRNA's con mutaciones stop :

Aminoglucósidos, PTC124



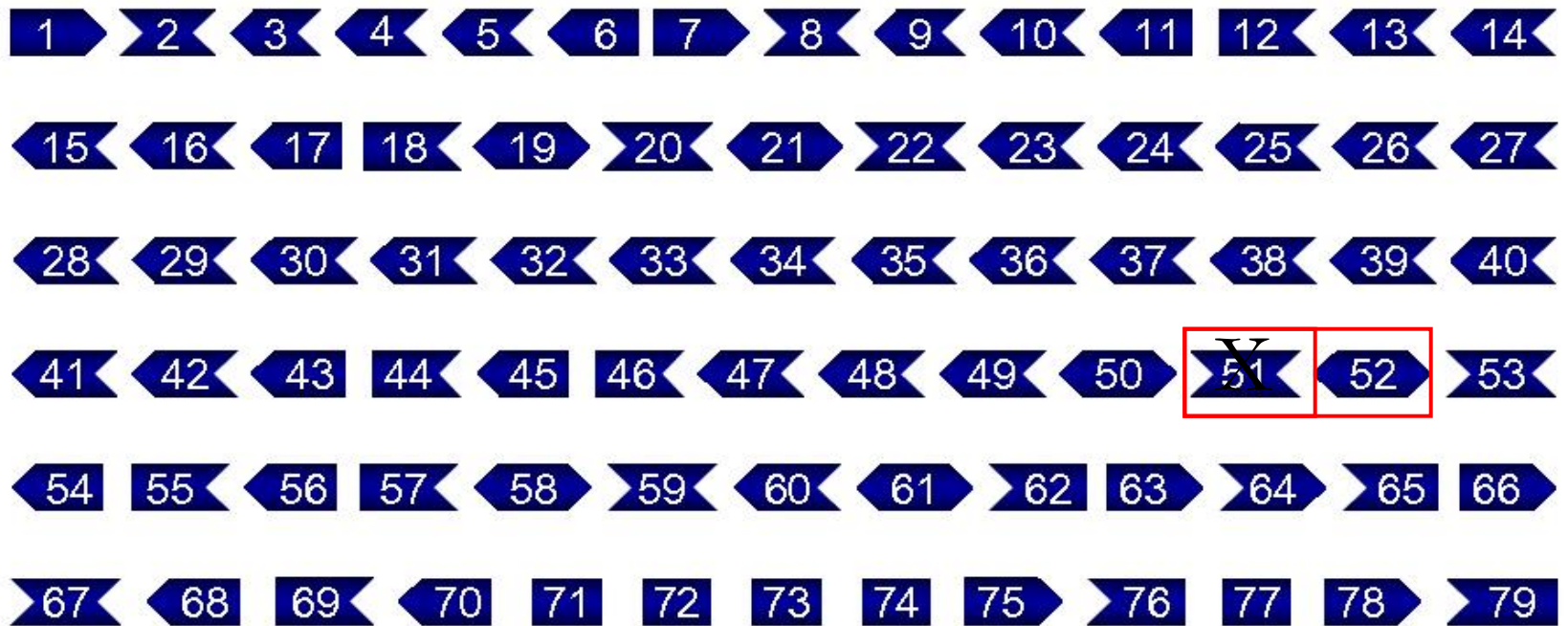
Reparación del gen

Reparación del mRNA: oligonucleótidos antisense (AON, GSK2402968)

Traducción de mRNA's con mutaciones stop :

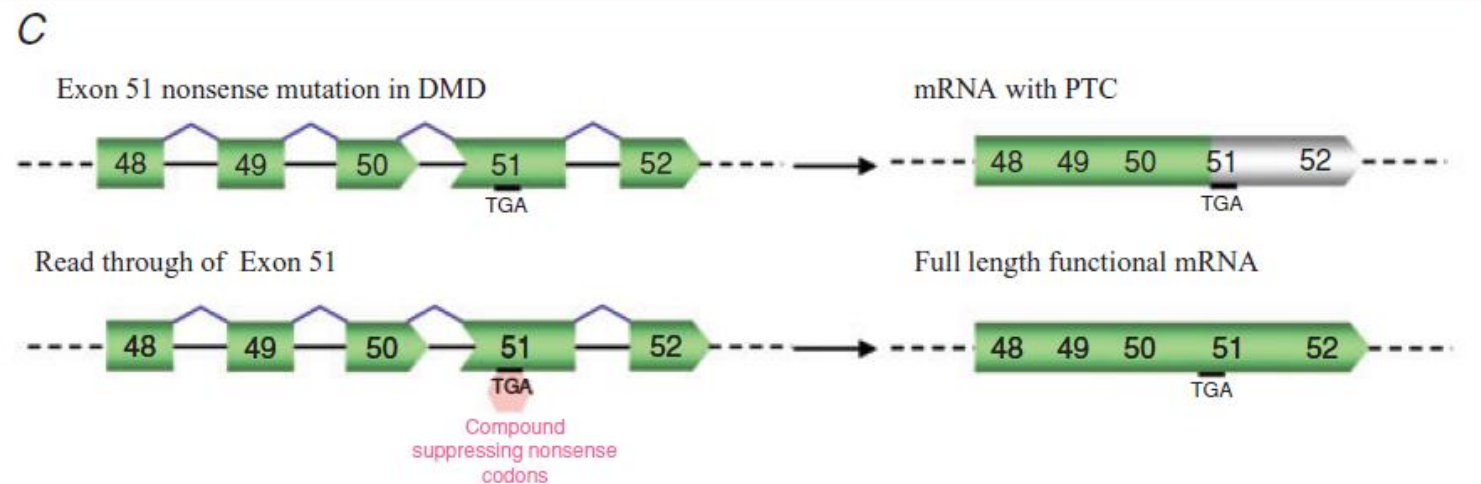
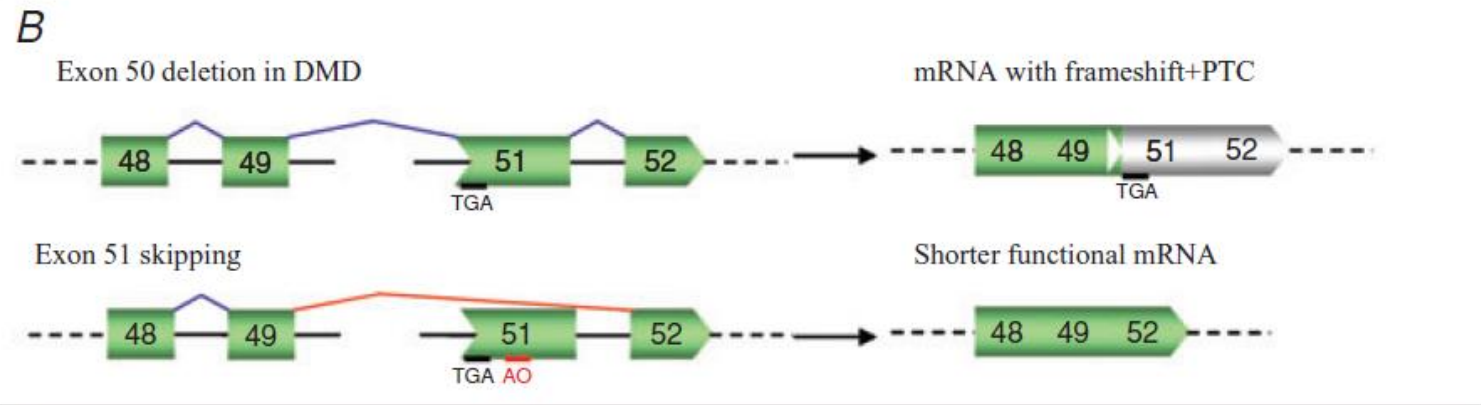
Aminoglucósidos, PTC124

Terapia génica mediante “exon skipping”

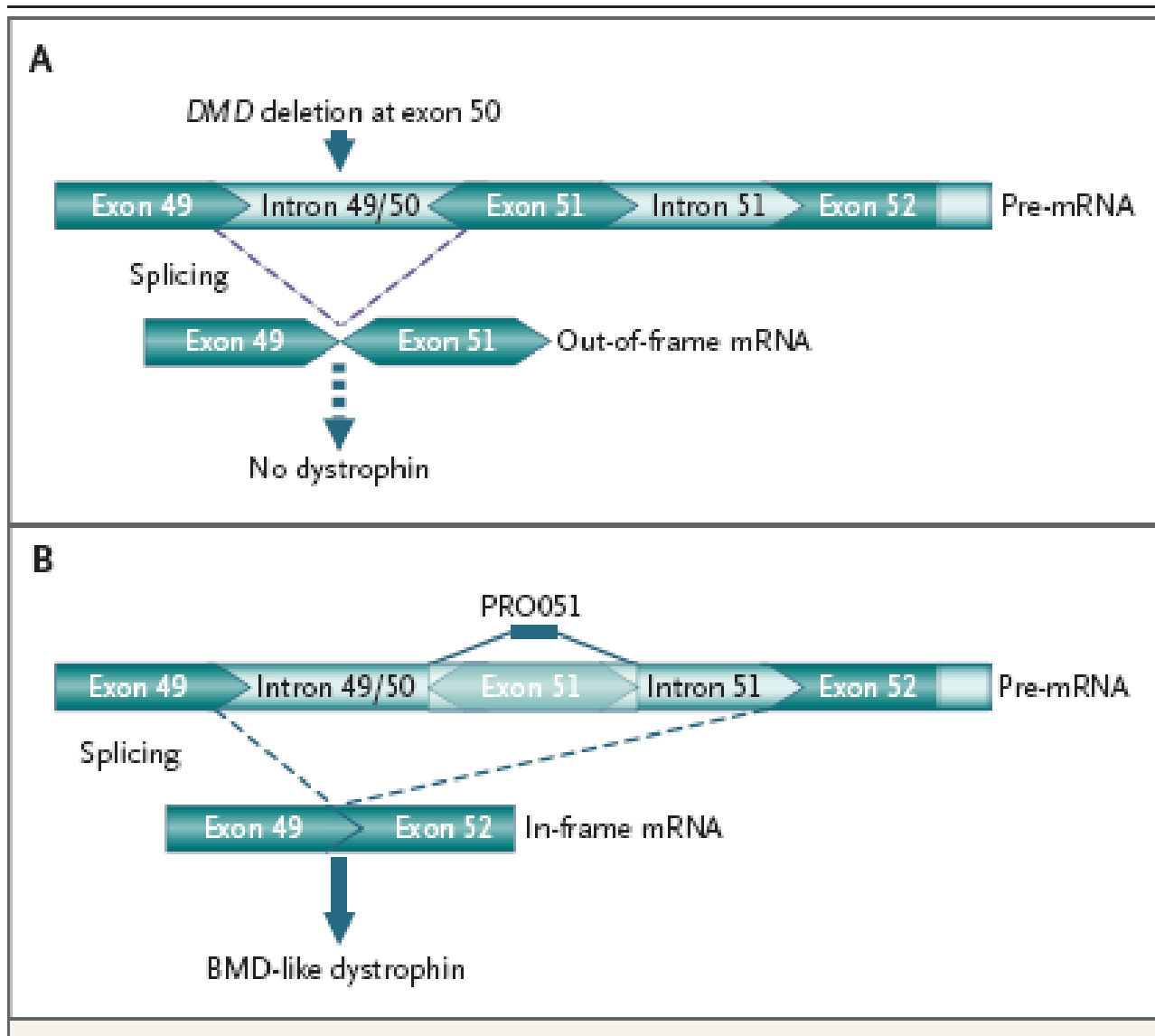


Los exones del gen DMD

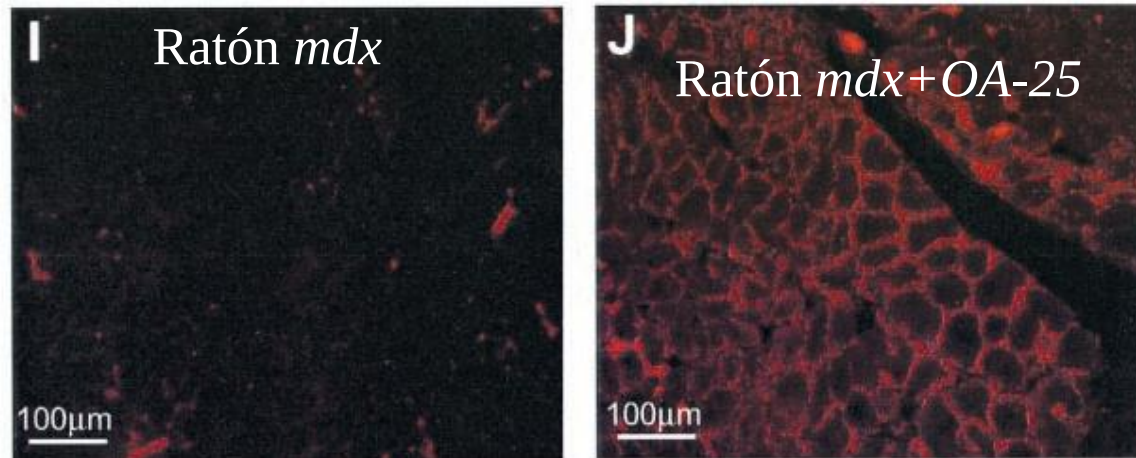
www.dmd.nl



La delección provocada de un exón adicional restablece la fase de lectura



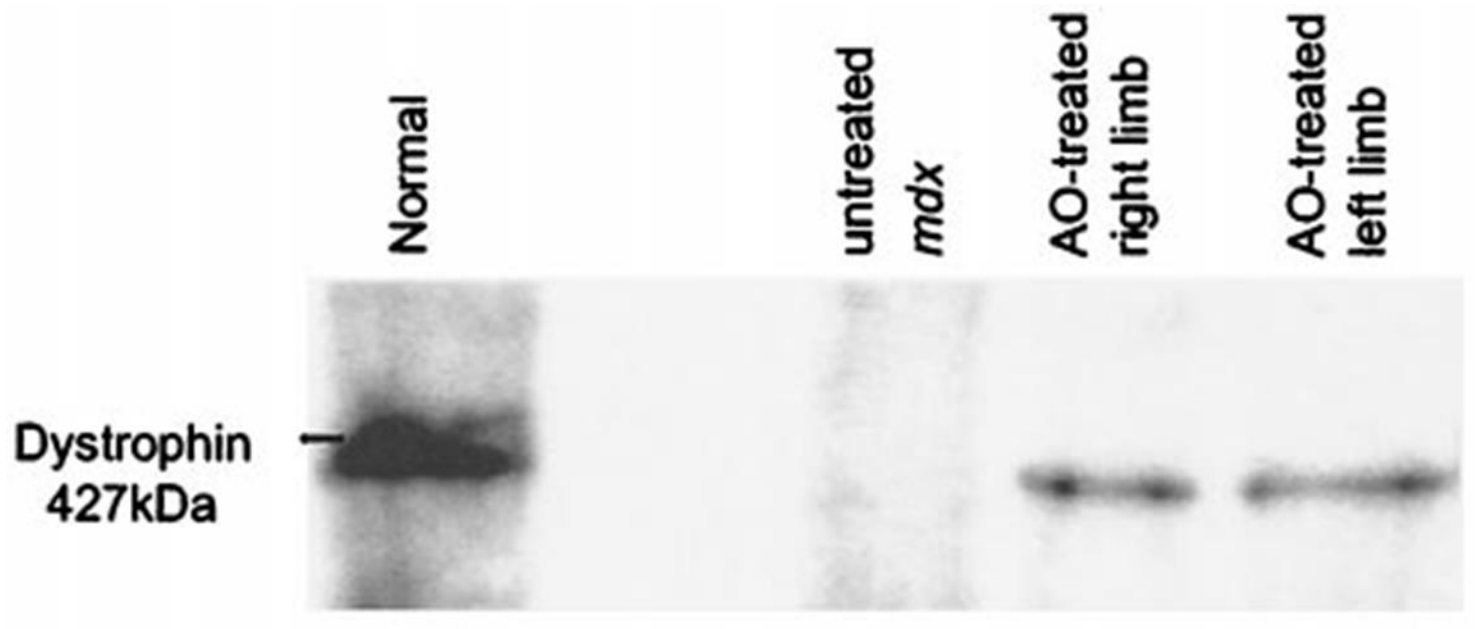
Resultado de la remoción del exón 23 del gen DMD del raton mdx



Tincion con anticuerpos anti-beta-sarcoglicano de músculo de ratón *mdx* después de la inyección intramuscular de OA-25

Mann et al. Proc.Nat.Acad. Sci. 2001

Resultado de la remoción del exón 23 del gen DMD del raton *mdx*



Western blot con anticuerpos DYS2 (distrofina) de los musculos del raton *mdx* despues del tratamiento con OA-25

Mann et al. Proc.Nat.Acad. Sci. 2001

Expresión de utrofina (SMT C1100)



Estimulación del efecto del NO para favorecer la circulación sanguínea (Tadalafil)

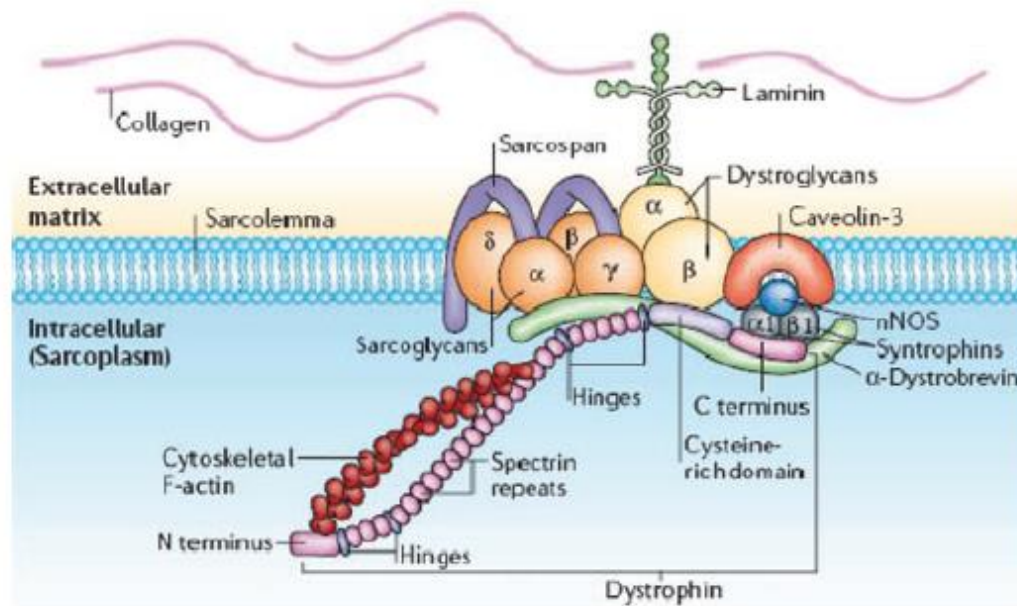


Figure 1. The dystrophin-associated protein complex in skeletal muscle

The complex of proteins acts as a link between the muscle fibres and the extracellular matrix, therefore providing stability to the muscle cell. nNOS, neuronal nitric oxide synthase. Originally published in *Nature Medicine* by Davies & Nowak (2006).

Resumen de terapias génicas en Duchenne

- Reposición del gen (minigen) mediante AAD
- Reparación del mRNA mediante exón “skipping”
- Expresión parcial del mRNA con una mutación “stop” mediante derivados de aminoglicósidos
- Estimulación de la expresión de utrofina
- Estimulación de la circulación mediante inhibidores de la PHDE5

Han pasado ya más de 20 años desde la identificación del gen de la distrofina y el desarrollo de una terapia para la distrofia de Duchenne está llevando un largo tiempo. A pesar de los retos pendientes, los ensayos clínicos actuales son muy prometedores porque aunque una estrategia no funcione con suficiente eficacia, su combinación podrá dar sus frutos. La evolución futura de la investigación en este campo promete ser muy emocionante para los científicos, para los médicos y sobre todo para los pacientes y sus familias.