

# ***DISTROFIE MUSCOLARI***

**Gruppo eterogeneo di malattie ereditarie caratterizzate da progressiva degenerazione muscolare che si manifestano con debolezza, atrofia e dolore muscolare**

**Tutte le distrofie muscolari sono accomunate da:**

- 1. atrofia muscolare**
- 2. estrema variabilità nella dimensione delle fibre**
- 3. degenerazione e poi necrosi delle fibre muscolari (indicata dalla CK alta)**
- 4. progressiva sostituzione fibroadiposa (adiposi sostitutiva): il muscolo perde la sua componente contrattile in favore di connettivo grasso.**

Nome	Gene	Età esordio in anni	Sede preferenziale	Interessemento cardiaco	Decorso
Distrofia muscolare progressiva di Duchenne	Sesso	2-5	Cingolo	Si	Rapido
Malattia di Becker	Sesso	5-10	Cingoli	Freq	Lento
Distrofia muscolare di Emery-Dreifuss	Sesso	2 - 4	mm omero-peroneali	Si	Rapido
Distrofia facio-scapolo-omerale	AD	Fino 30	mm facciali e scapolo-omerale	No	Lento
Distrofie muscolari dei cingoli	AD - AR	Varia	Cingoli	Varia	Variabile
Distrofia muscolare	AR	Nascita	Diffuso	Raro	Lento o staziona

Tabella 27-1

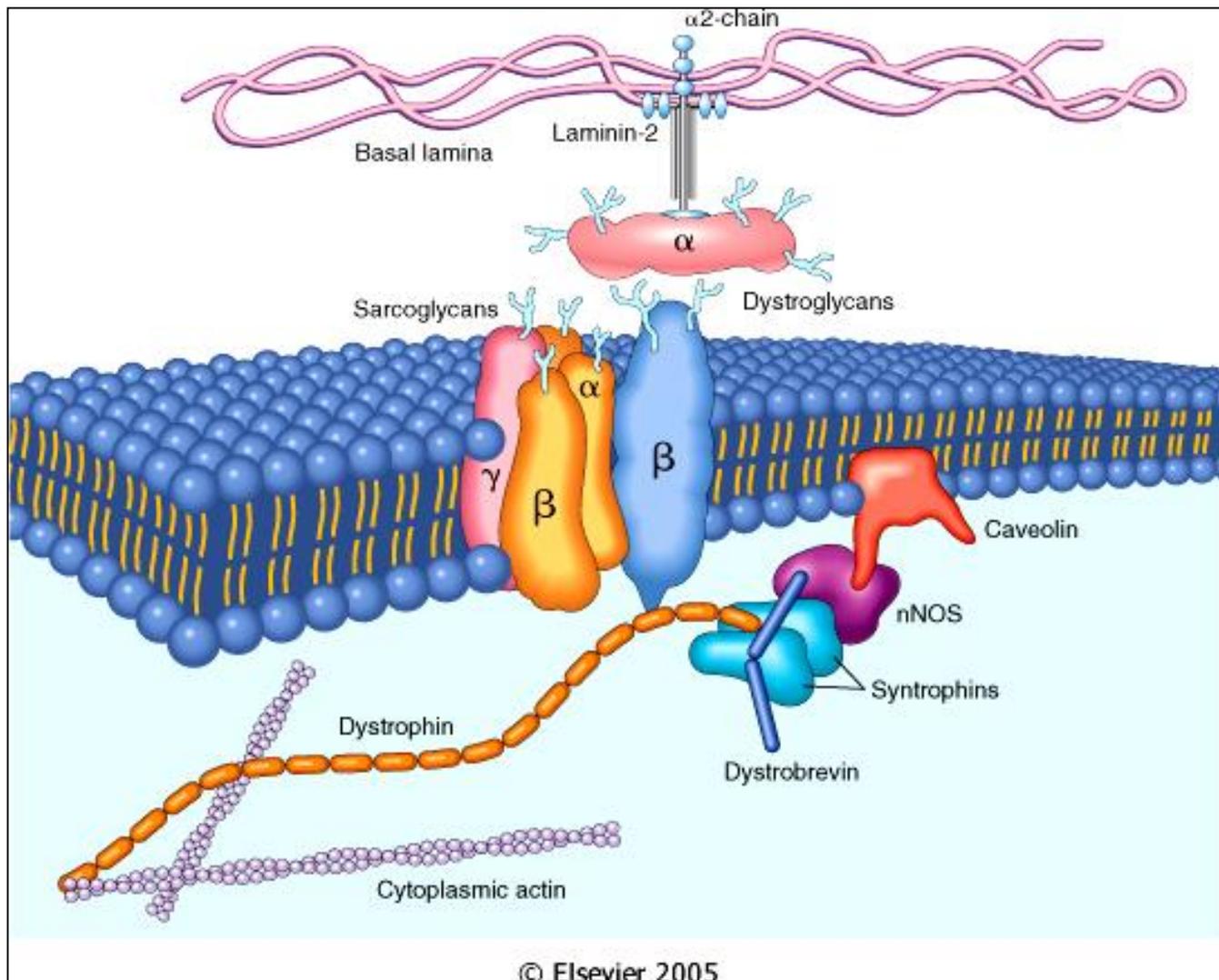
## Distrofie muscolari dei cingoli

Distrofie muscolari dei cingoli**	Proteina difettosa	Localizzazione subcellulare
LGMD1A	Miotilina	Sarcomero
LGMD1B	Lamina	Membrana nucleare
LGMD1C	Caveolina 3	Sarcolemma
LGMD1D	?	
LGMD1E	?	
LGMD1F	?	
LGMD1G	?	
LGMD2A	Calpaina 3	Sarcoplasma
LGMD2B/Miyoshi	Disferina	Sarcolemma
LGMD2C	$\gamma$ -Sarcoglicano	Sarcolemma
LGMD2D	$\alpha$ -Sarcoglicano	Sarcolemma
LGMD2E	$\beta$ -Sarcoglicano	Sarcolemma
LGMD2F	$\delta$ -Sarcoglicano	Sarcolemma
LGMD2G	Telethonina	Sarcomero
LGMD2H	Trim32	Sarcoplasma
LGMD2I	Proteina correlata alla fukutina	Golgi
LGMD2J	Titina	Sarcomero
LGMD2K	POMT1	Reticolo endoplasmico
LGMD2L	Eukutina	Golgi
LGMD2M	DOMGnT1	Golgi

\*Le LMGD1 hanno ereditarietà autosomica dominante, mentre le LMGD2 hanno ereditarietà autosomica recessiva.

Modificata da "Diseases of Muscle." In Love S, Louis DN, Ellison DW, eds. Greenfield's Neuropathology, 8th ed. New York: Oxford University Press, 2008.

Le distrofie sono per la maggior parte dei casi determinate dalla rottura di un complesso proteico situato al di sotto della membrana plasmatica della fibra muscolare



La maggior parte delle distrofie sono legate a mutazioni in geni che codificano per le proteine del complesso distrofina-DAG (dystrophin-associated glycoprotein complex) e provocano:

- Indebolimento del sarcolemma
- Microlesioni della membrana plasmatica che portano alla rottura della membrana
- Morte della fibra muscolare
- Talvolta insufficienza cardiaca e respiratoria

# Distrofinopatie

Distrofie muscolari dovute a difetti nel gene per la distrofina; è il gene collegato a malattia più G R A N D E che si conosca.

Si tratta di distrofie legate al cromosoma X, ragion per cui i maschi, emizigoti, sono affetti in forma grave, mentre le femmine manifestano la malattia in maniera variabile in base al pattern di inattivazione del cromosoma X.

Le distrofinopatie sono due:

**DMD = Distrofia Muscolare di Duchenne**, caratterizzata da un decorso clinico più grave

**BMD = Distrofia Muscolare di Becker**, con un decorso meno grave rispetto la DMD

# DISTOFIA MUSCOLARE DI DUCHENNE (DMD)

DMD è la più comune forma di distrofia muscolare dell'infanzia

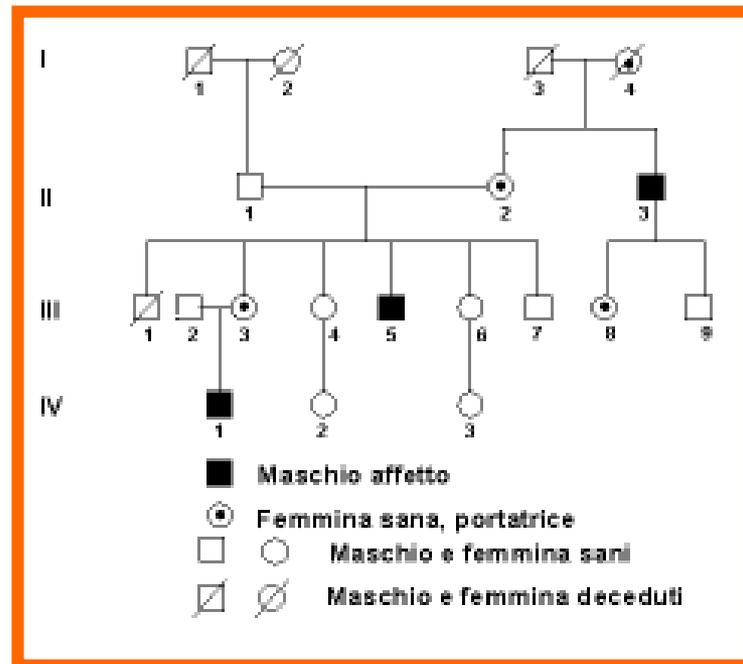
Malattia genetica recessiva legata all' X

Incidenza di 1/3500 maschi nati vivi

~30% dei casi ha una storia familiare negativa

## Fenotipo Clinico

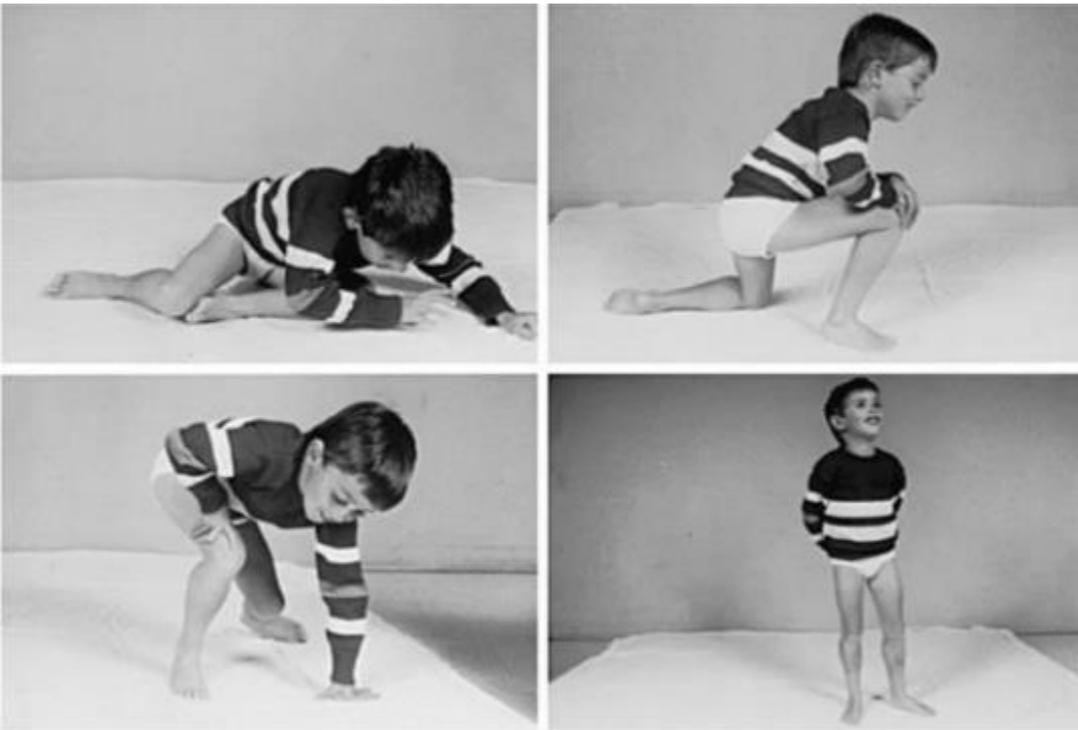
- Perdita di forza muscolare progressiva
- Deficit intellettivo
- Proliferazione di tessuto connettivo nel muscolo
- Pseudoipertrofia dei polpacci



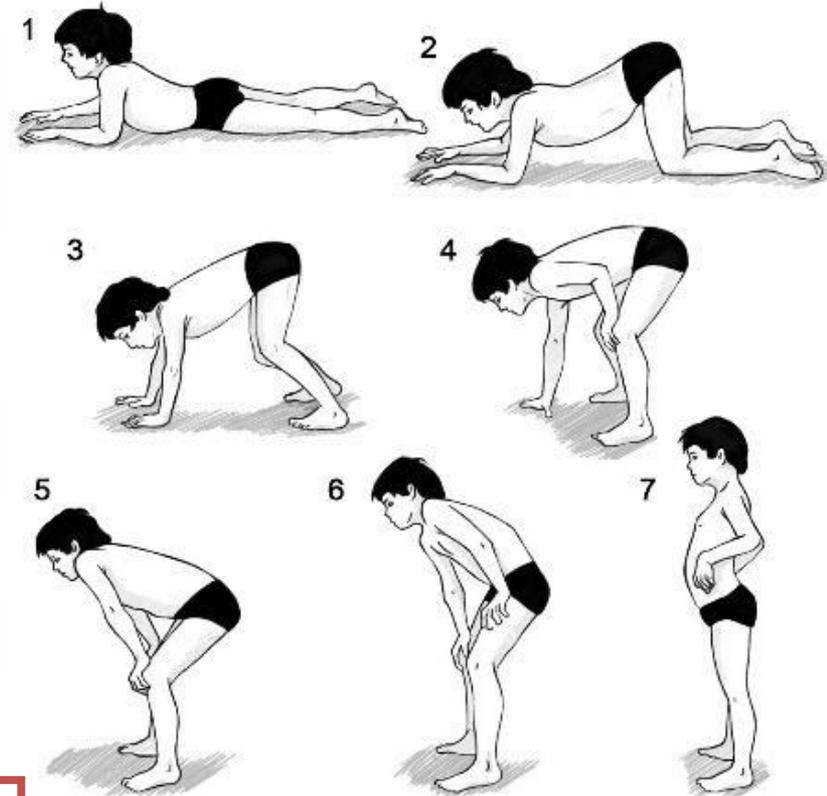
La trasmissione è legata alla X, recessiva, per cui i maschi si ammalano mentre le femmine eterozigoti sono normali o solo lievemente affette (anche se portatrici)

## SINTOMI

- Prime manifestazioni cliniche intorno ai 3-5 anni con difficoltà di deambulazione e ad alzarsi da terra (segno di Gower)
- Degenerazione progressiva dei muscoli prossimali della coscia e del bacino
- Pseudoipertrofia polpacci (infiltrazione di collagene) e perdita di forza nei muscoli della coscia
- Perdita progressiva della forza muscolare → i pazienti cessano di deambulare intorno ai 12 anni
- Elevata concentrazione sierica di creatina fosfochinasi (CPK) → rispecchia la necrosi della fibra muscolare
- QI < 70 (distrofina espressa livello cerebrale)
- perdita progressiva della forza che compromette anche i muscoli respiratori (diaframma, muscoli intercostali) e porta a deficit respiratori e cardiomiopatia dilatativa. Morte intorno ai 20 anni



Copyright © 2007 by Saunders, an imprint of Elsevier Inc. All rights reserved.



**Gowers sign.** A boy with hip girdle weakness due to Duchenne muscular dystrophy

# DISTOFIA MUSCOLARE DI BECKER (BMD)

E' una forma lieve di distrofia muscolare di Duchenne

Incidenza di 1/20.000 maschi nati vivi

Comparsa più tardiva (adolescenza)

Aspettativa di vita più lunga (~50 anni)

Deficit intellettivo meno grave

**Pseudoipertrofia dei polpacci**

**Miocardiopatia**

**Aumento CK sierica**

**Il gene affetto è lo stesso della DMD**



Pseudoipertrofia dei polpacci in un pz con distrofia muscolare di Becker



# **DISTOFIA MUSCOLARE DI DUCHENNE (DMD) E DI BECKER (BMD)**

Il gene mutato nella DMD e nella BMD è localizzato in Xp21.2

È il più grande gene associato a malattia (2400 kb, 79 esoni, impiega 24 hr ad essere trascritto)

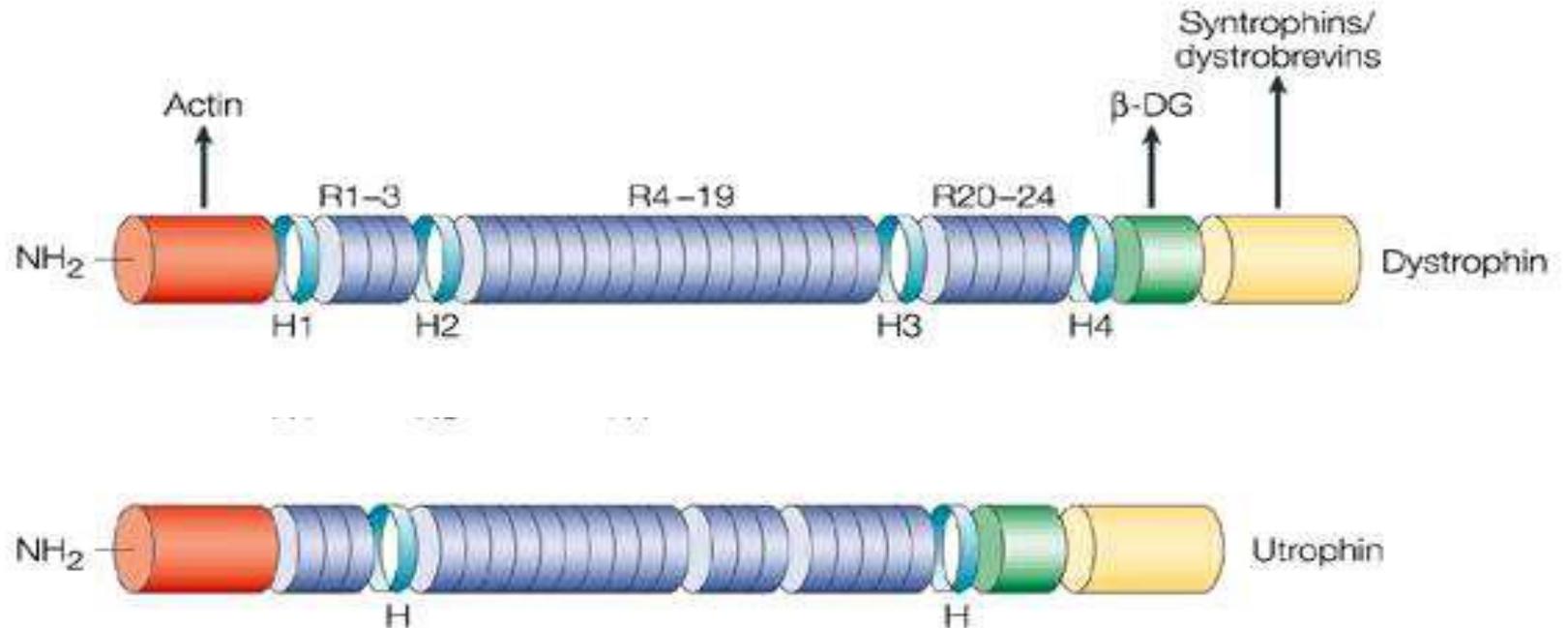
Trascritto di 14 kb codifica per una proteina di 427 kDa e 3685 aa detta

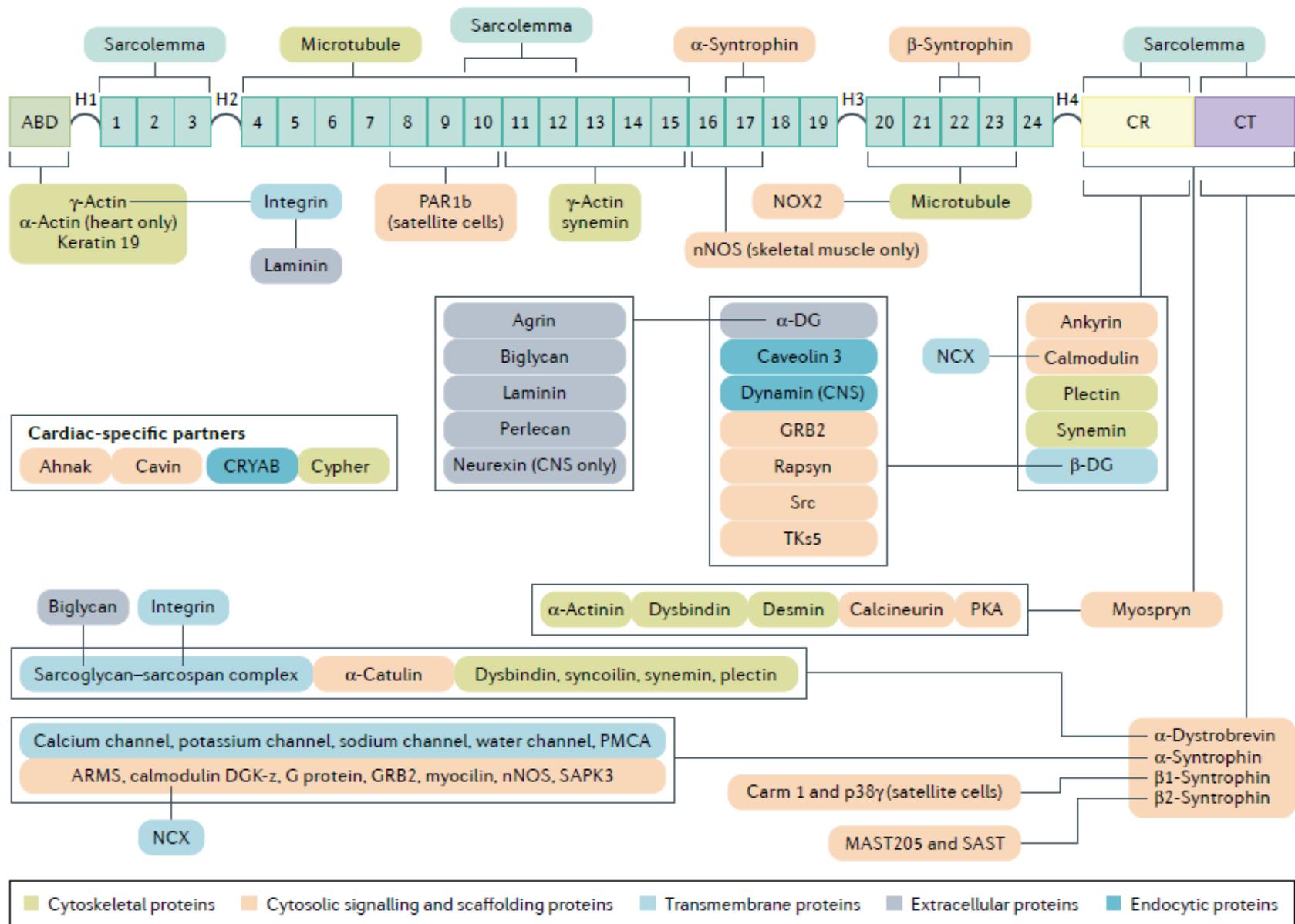
## **DISTROFINA**

Espressa in:

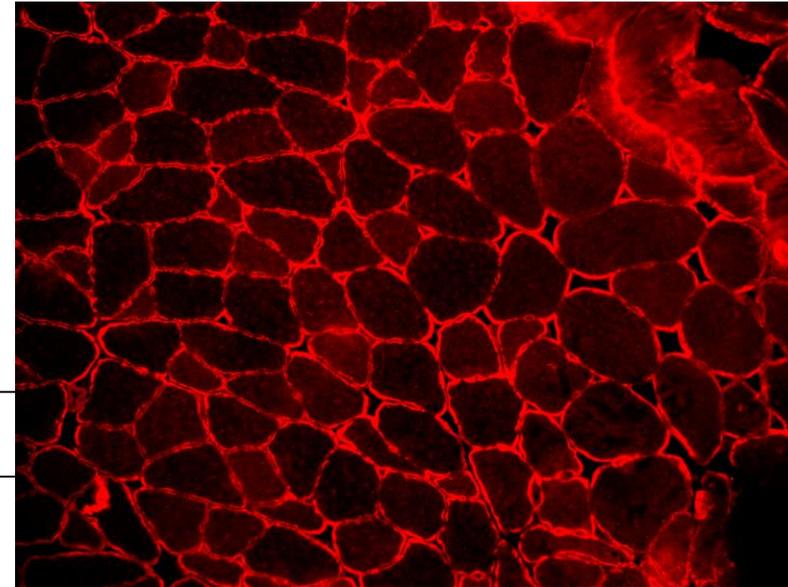
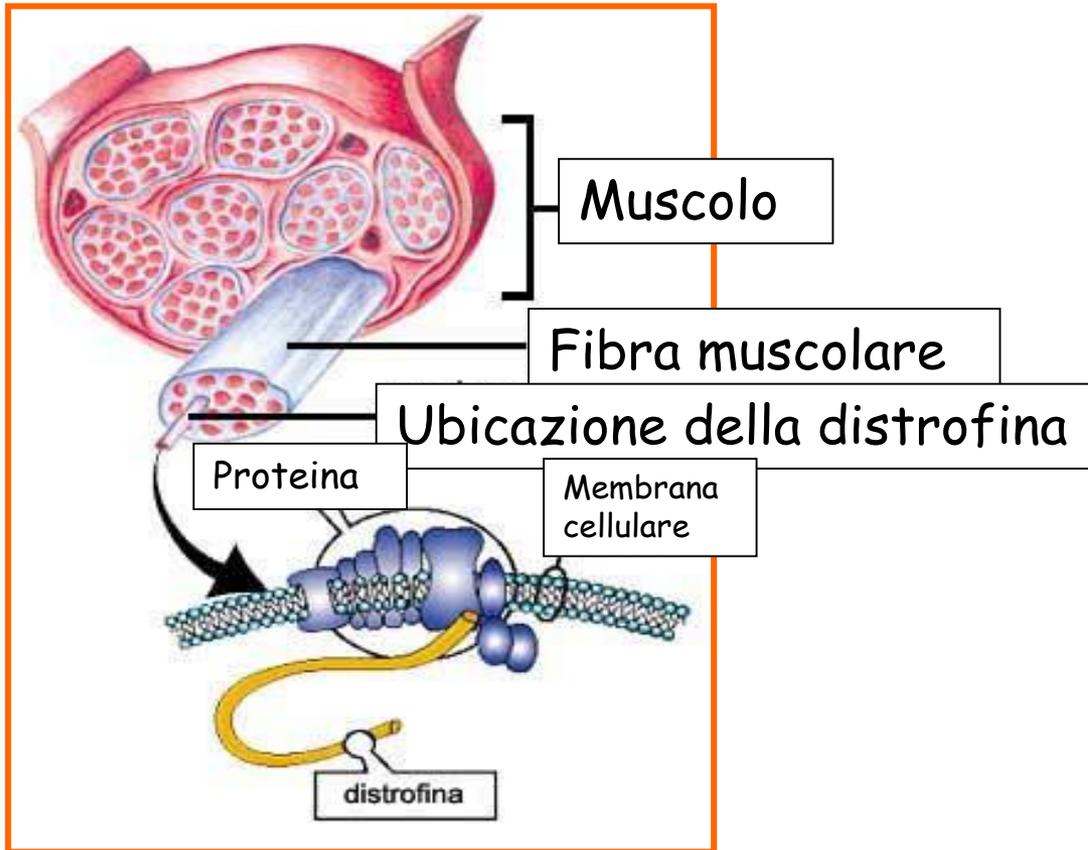
- Muscolo scheletrico
- Muscolo liscio
- Muscolo cardiaco
- Cervello

# STRUTTURA DELLA DISTROFINA





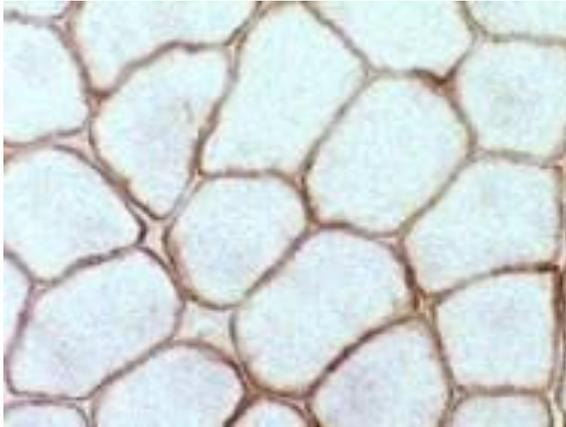
# Immunoistochimica rivela che la distrofina è una proteina muscolare sarcoplasmatica subsarcolemmale



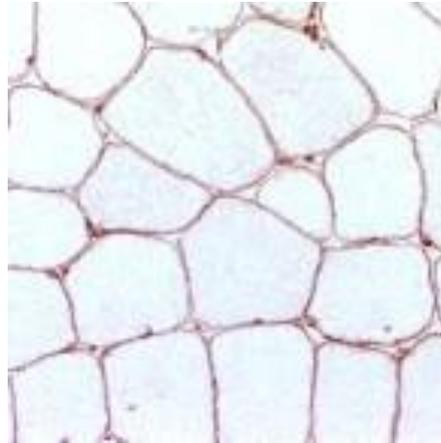
MARCATURA CON ANTICORPI FLUORESCENTI ANTI-DISTROFINA IN MUSCOLO NORMALE

# DIAGNOSI

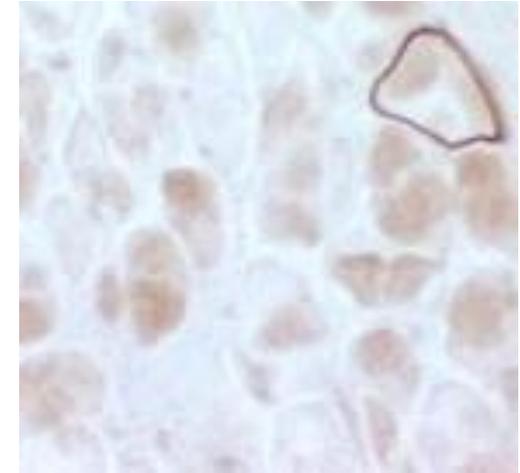
## ANALISI IMMUNOISTOCHIMICA



Colorazione della distrofina sul contorno delle fibre muscolari di soggetto sano

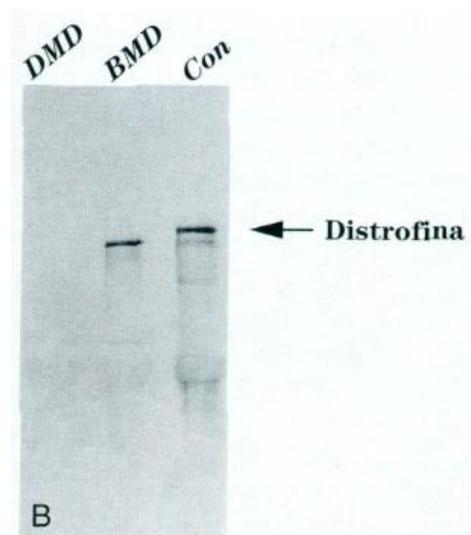


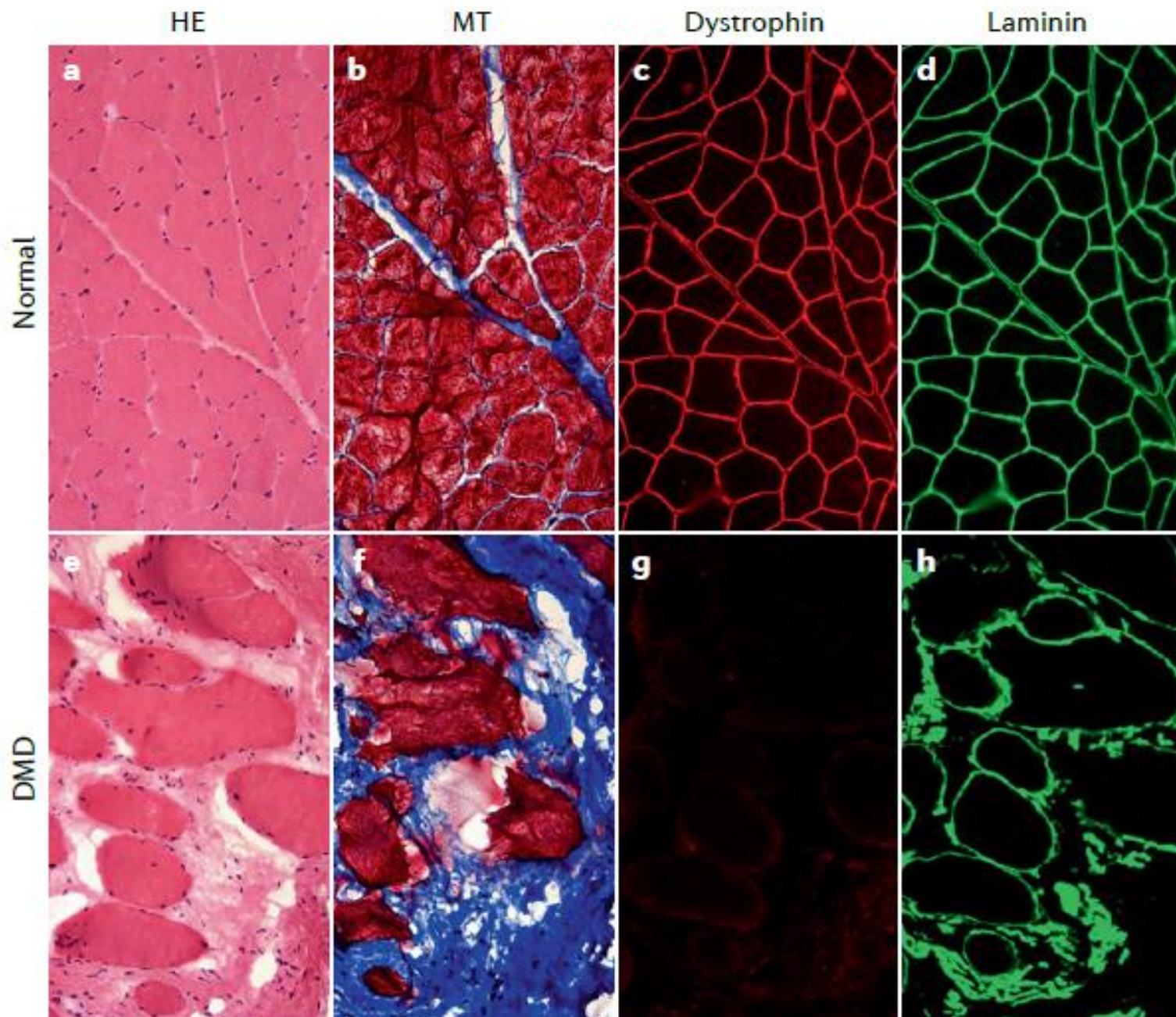
Distrofia di Becker: ridotta colorazione delle fibre



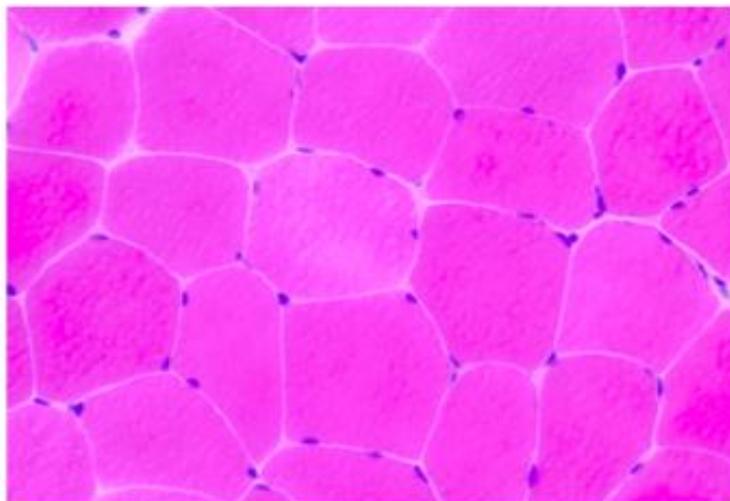
Distrofia di Duchenne: assenza di distrofina

## ANALISI BIOCHIMICA

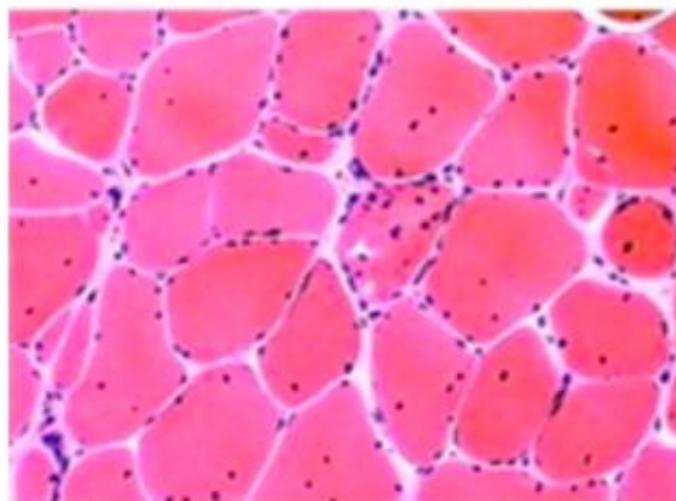




Muscolo normale



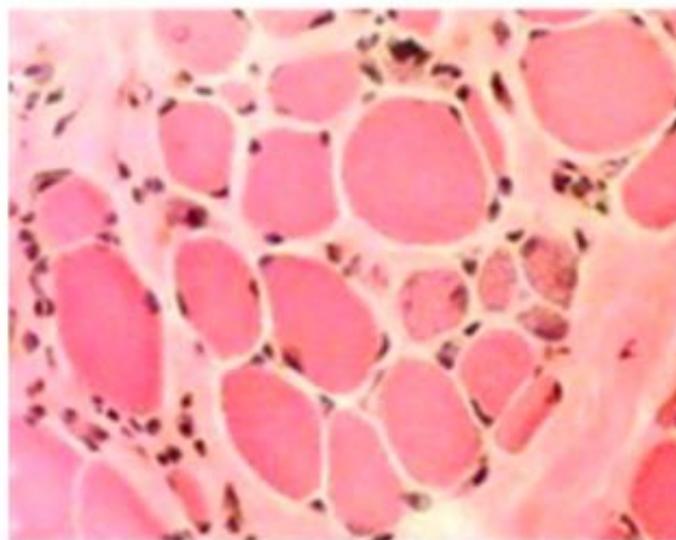
Duchenne



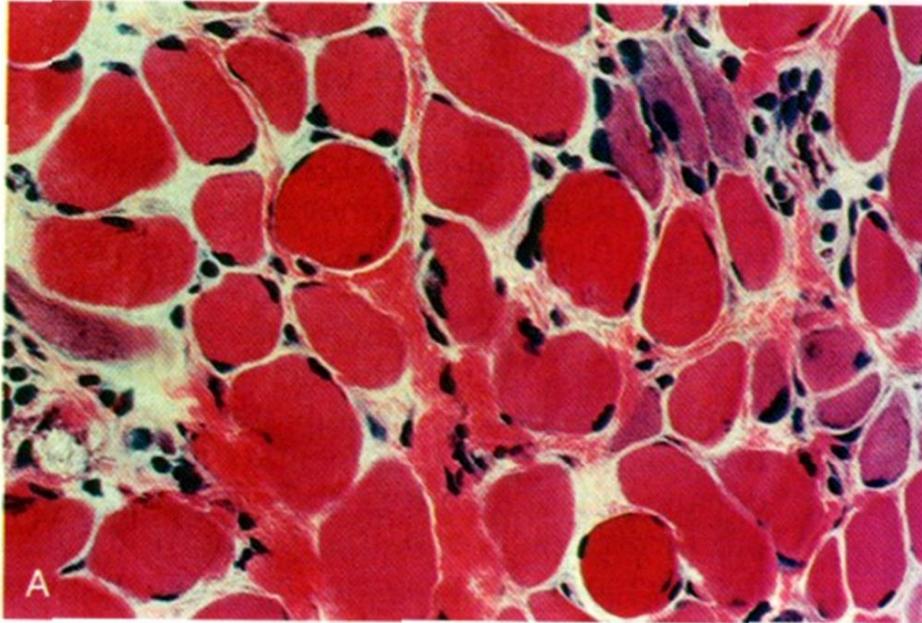
a 2 anni

### Duchenne

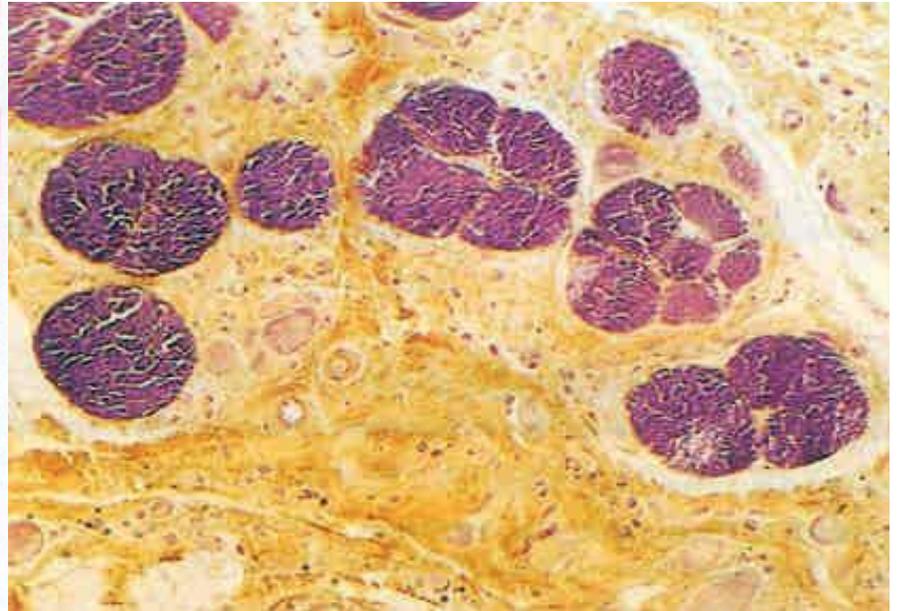
1. necrosi diffusa delle fibre muscolari
2. variabilità del diametro delle fibre
3. sostituzione fibroadiposa
4. fibre rigeneranti
5. infiammazione



a 6 anni

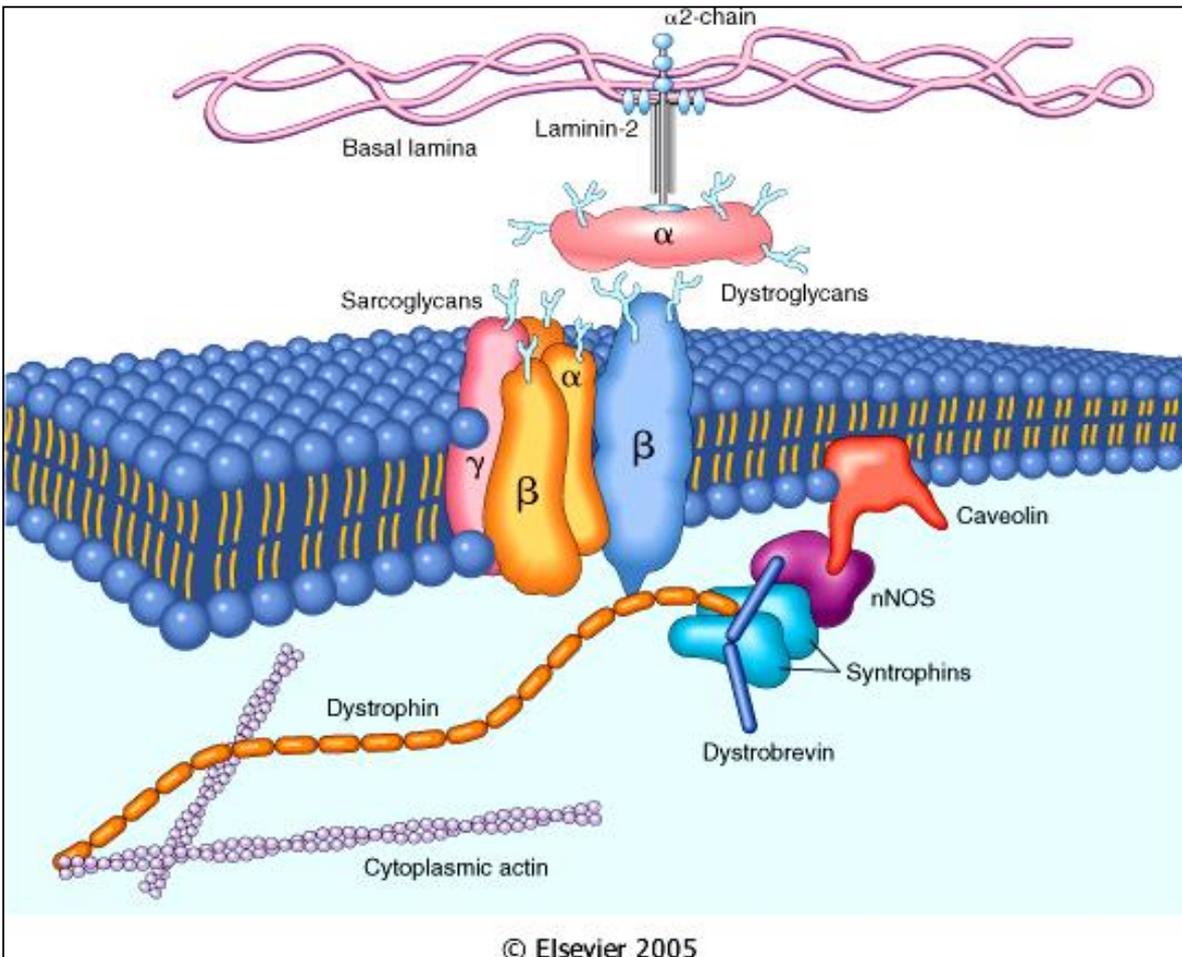


**MUSCOLO DISTROFICO PRECOCE IN CUI  
SI RISPONTRA VARIABILITA' DELLE FIBRE  
MUSCOLARI, NECROSI E INFILTRATO  
INFIAMMATORIO**



**MUSCOLO DISTROFICO AVANZATO IN  
CUI SI RISPONTRA SOSTITUZIONE CON  
TESSUTO  
FIBROSO E ADIPOSO**

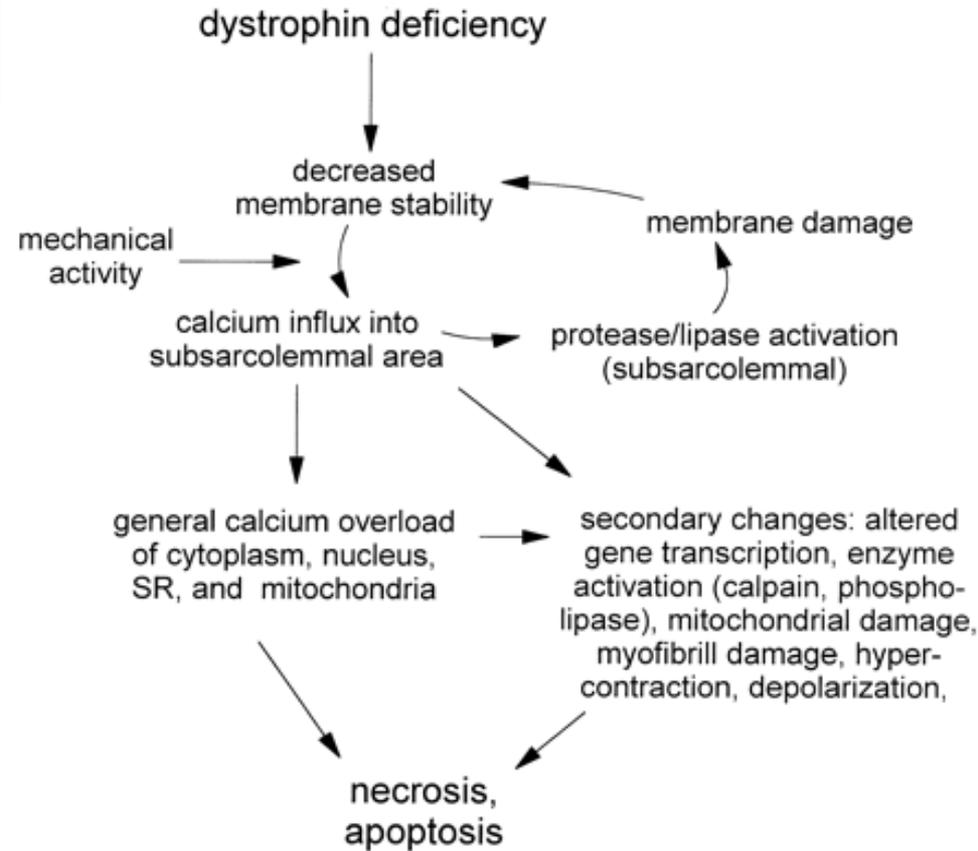
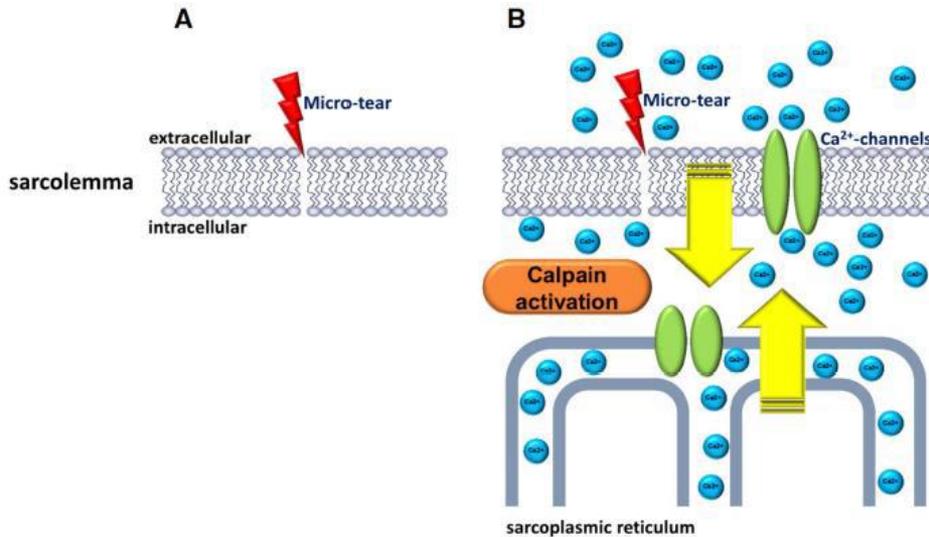
# Funzioni della distrofina



La distrofina e le proteine ad essa associate formano un ponte tra citoscheletro interno e la matrice extracellulare per impedire fratture del sarcolemma indotte da sforzo meccanico durante la contrazione delle cellule muscolari

# Mechanisms of muscle damage

V. Nigro, G. Piluso / *Biochimica et Biophysica Acta* 1852 (2015) 585–593



## MUTAZIONI IN DMD E BMD

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

**- 65% dei maschi affetti da DMD hanno delezioni del gene per la distrofina che possono coprire uno o più esoni → delezioni frameshift causano il troncamento della proteina che è instabile e viene degradata → FENOTIPO GRAVE DMD**

**- Delezioni “in frame” producono una proteina parzialmente funzionale, priva di un segmento interno → FENOTIPO LIEVE BMD**

Difetti che risultano da delezioni della porzione N-terminale o C-terminale danno DMD mentre quelli che causano delezioni in frame di porzioni centrali alfa elica danno fenotipo lieve BMD.

### Delezione

TTC GAG CGA AAG GAA GAC ATA GTG ACG TTC AGG ACA GTC CTA CAT TAC  
Lys Leu Ala Phe Leu Leu Tyr His Cys Lys Ser Cys Glu Asp Val Met

TTC GAG CGA ACA GGA CAG TCC TAC ATT  
Lys Leu Ala Cys Pro Val Arg Met Stop

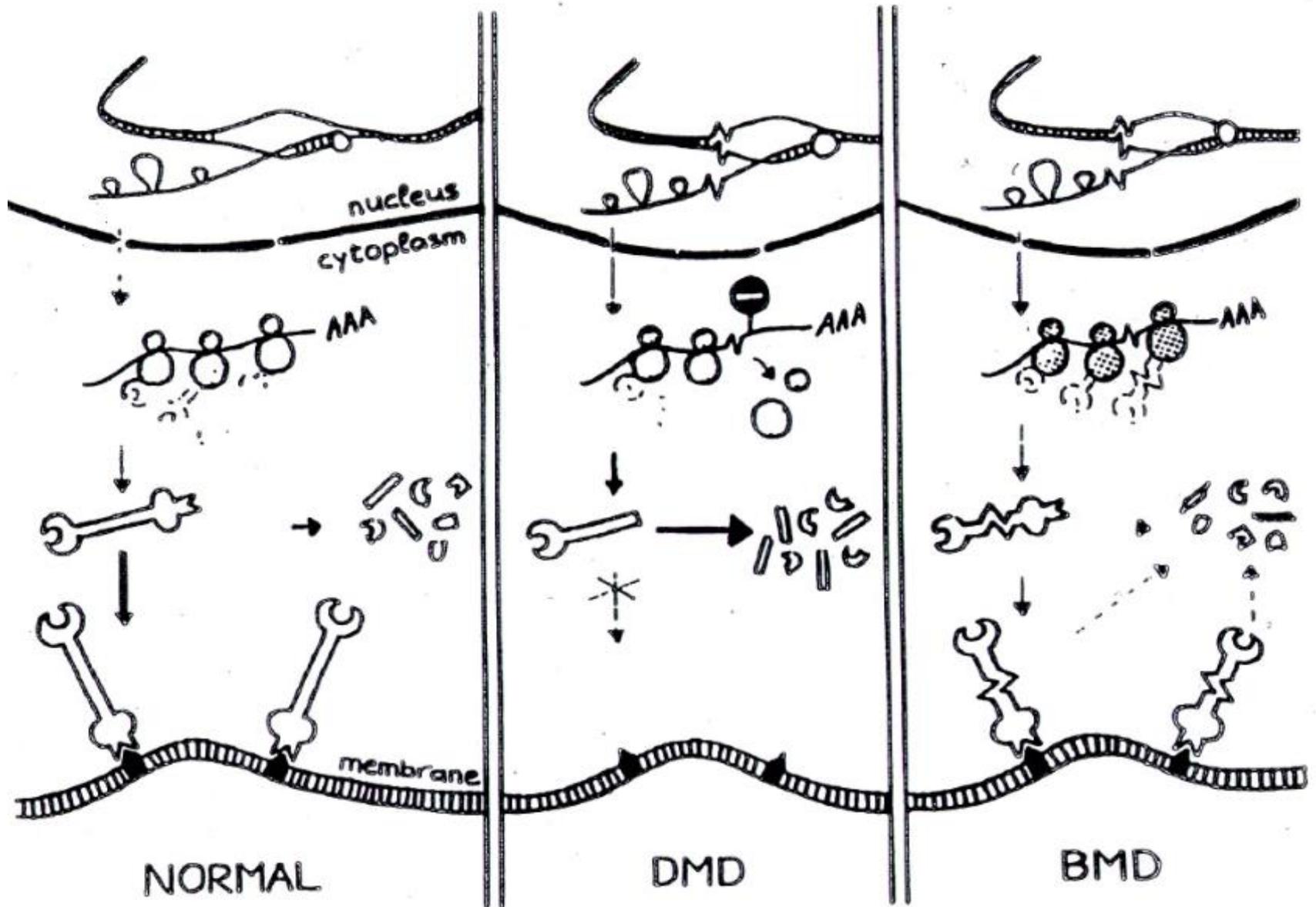
Out frame

TTC GAG CGA AAG GAA GAC ATA GTG ACG TTC AGG ACA GTC CTA CAT TAC  
Lys Leu Ala Phe Leu Leu Tyr His Cys Lys Ser Cys Glu Asp Val Met

TTC GAG CCA GTC CTA CAT TAC  
Lys Leu Gly Glu Asp Val Met

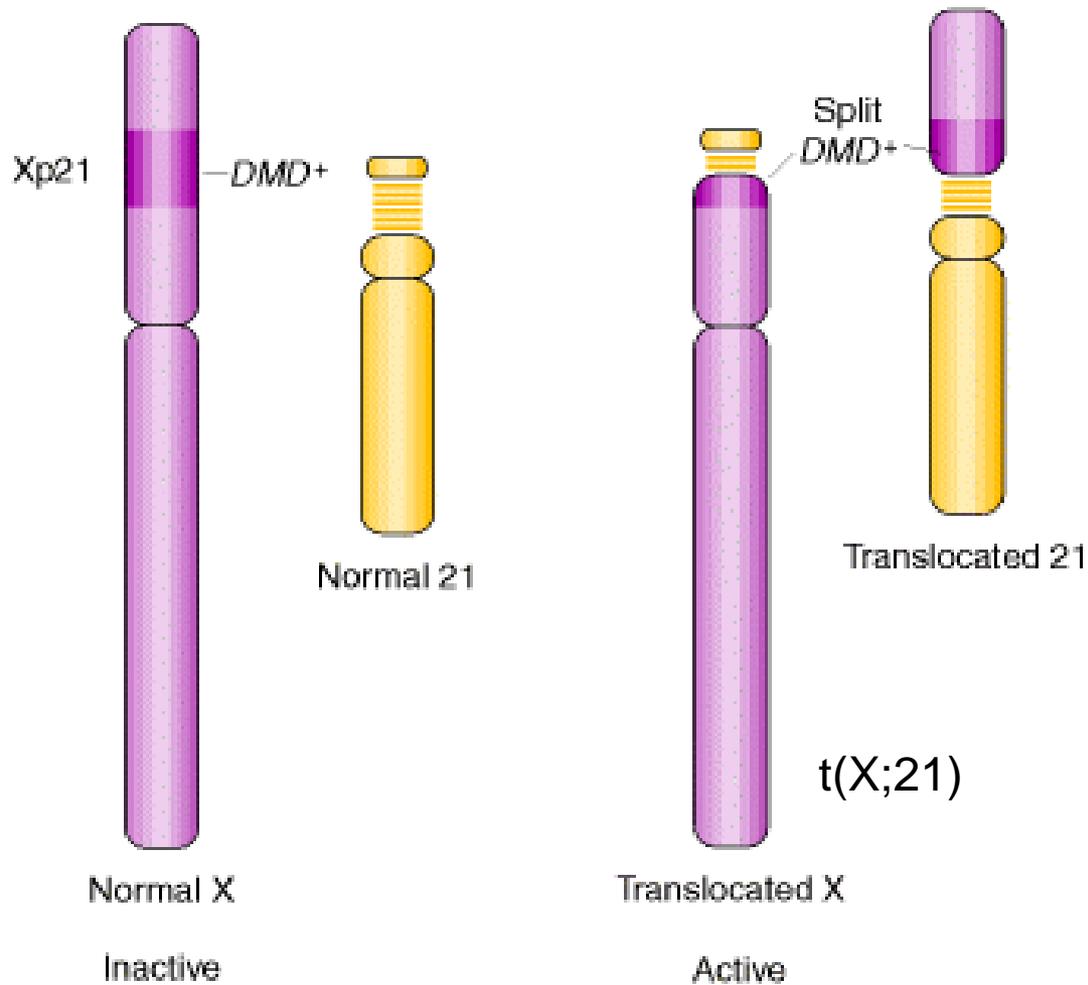
In frame

# PROCESSAMENTO DELLA DISTROFINA



- **5% dei casi dovuti a duplicazioni di uno o più esoni**
- **Il restante 30% dei casi è dovuto a mutazioni puntiformi (es. C3304Y impedisce alla distrofina di legarsi al  $\beta$ -destroglicano e causa un fenotipo grave tipo Duchenne)**

# Alcuni rari casi di DMD nelle femmine è dovuto ad una traslocazione tra il cromosoma X a livello di Xp21.2 e il cromosoma 21



La traslocazione tra i cromosomi X e 21 può interrompere la sequenza del gene DMD e causare la manifestazione della DISTROFIA MUSCOLARE DI DUCHENNE in donne eterozigoti

Inattivazione selettiva dell'X intatto

# TERAPIE PER LA DMD

## TERAPIE FARMACOLOGICHE

- Terapia con corticosteroidi (prednisone primi 10 giorni di ogni mese)
  - Riduce apoptosi dei miotubi durante l'ontogenesi e può rallentare la necrosi delle miofibre (complicanze a lungo termine della terapia cortisonica ad uso cronico: osteoporosi, aumento di peso)
- Terapia delle complicanze
  - Scompenso cardiaco, insufficienza respiratoria, ecc...
- Mantenimento di buono stato nutrizionale
  - Calcio, fluoro, peso corporeo non in sovrappeso
- Fisioterapia
- Correzione chirurgica di retrazioni muscolari

## ***TERAPIA GENICA della DMD***

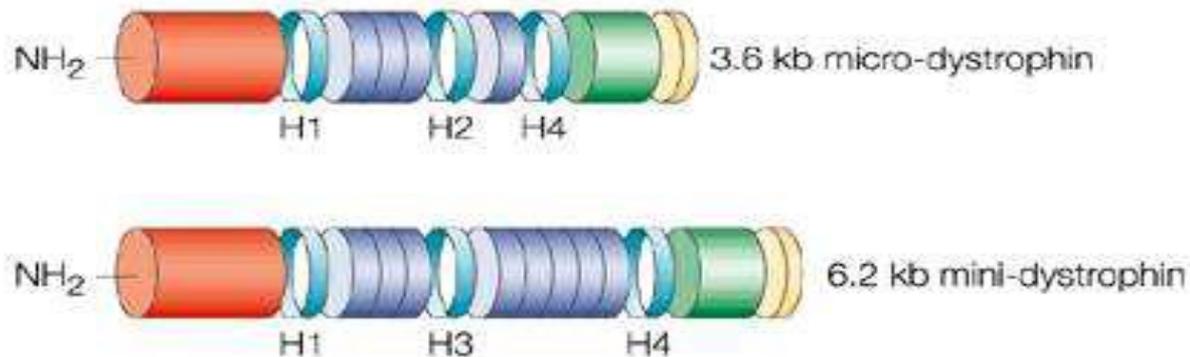
Uno degli obiettivi più ambiziosi della comunità scientifica che lavora nel campo della distrofia muscolare di Duchenne è riuscire a ripristinare la produzione di distrofina, veicolando il gene sano direttamente all'interno del tessuto muscolare. Purtroppo le grandi dimensioni del gene della distrofina, hanno reso l'impresa molto ardua poiché i virus utilizzati per trasferire i geni nelle cellule hanno, per contro, una capienza piuttosto limitata.

### **Terapia genica presenta difficoltà derivanti da:**

- lunghezza del gene per la distrofina è maggiore della capacità di incorporazione di un adenovirus**
- usati anche Retrovirus ma poiché questi infettano solo cellule in attiva proliferazione, il gene è stato introdotto in mioblasti embrionali → mioblasti reimpiantati in vitro esprimono la distrofina solo transitoriamente**

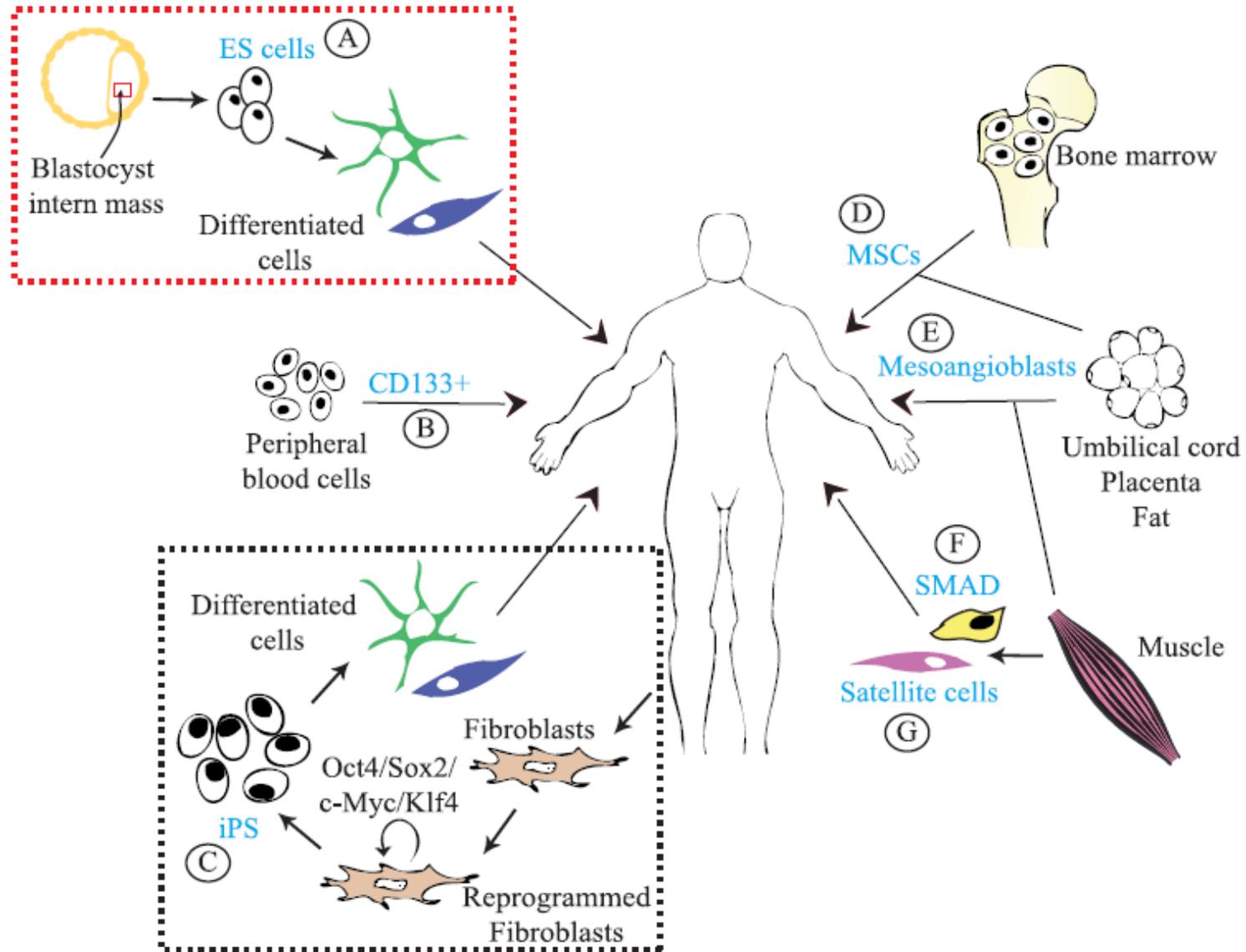
# NUOVE STRATEGIE DI TERAPIA GENICA PER DMD

**Virus Adeno-Associati (AAV)** hanno il vantaggio di avere una **buona efficienza** di trasferimento nelle cellule muscolari e cardiache, mantenendo una risposta immunitaria ridotta, e conferiscono espressione stabile ma non possono veicolare materiale genetico superiore alle 5-6mila basi di lunghezza → uso di micro o minidistrofina → conversione da fenotipo Duchenne a fenotipo Becker



Based on evidence of phenotypic improvement without adversary effects in *mdx* mice one mini-dystrophin (rAAV2.5- CMV-mini-dystrophin) is in phase I (NCT00428935) and one micro-dystrophin (rAAVrh74.MCK) (NCT02376816) is currently enrolling for a phase II

# TERAPIA CELLULARE DELLA DMD



Cells from healthy donor → IMMUNOLOGICAL RISK

# TERAPIA GENICA COMBINATA CON TERAPIA CELLULARE

F. Barthélémy, N. Wein/*Neuromuscular Disorders* 28 (2018) 803–824

817

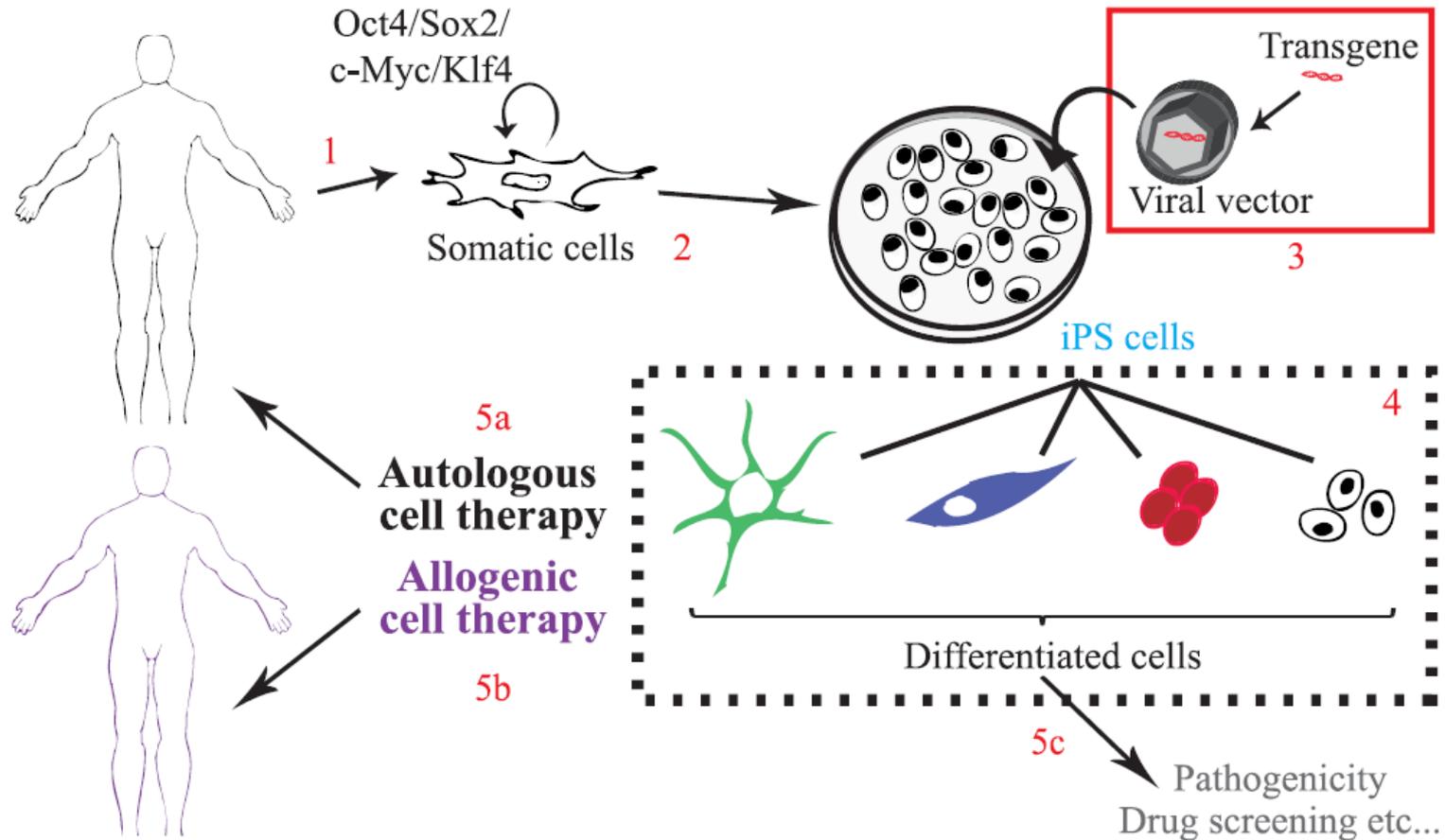
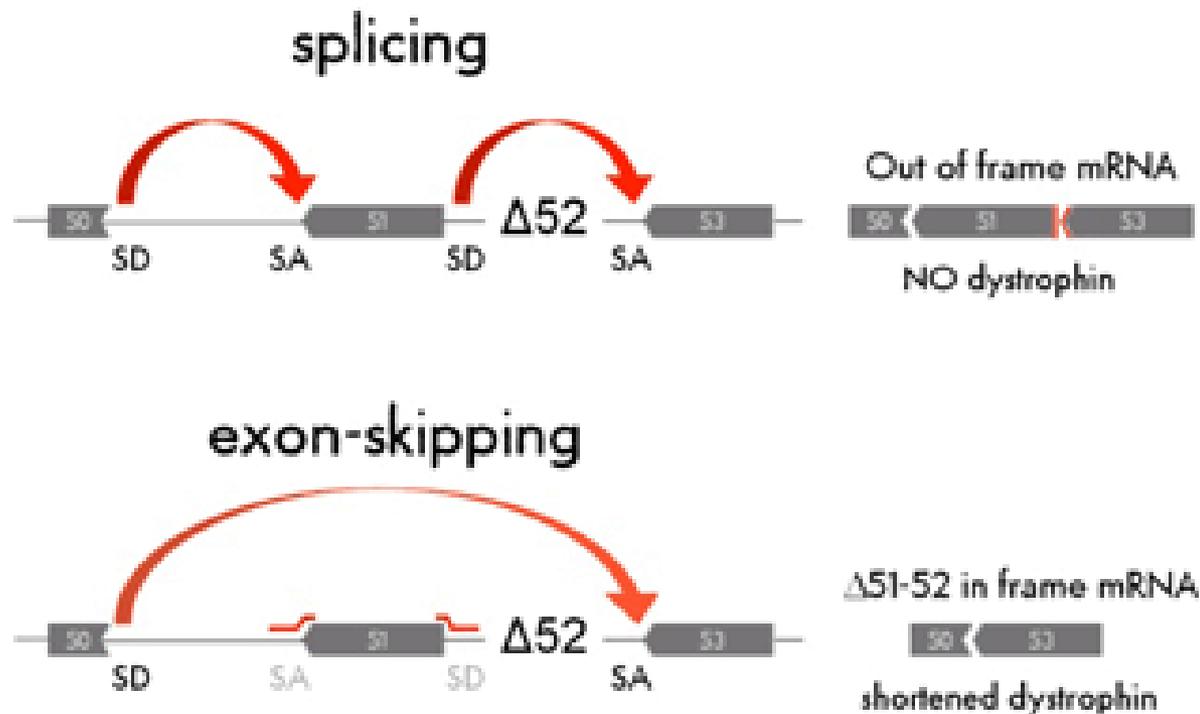


Fig. 5. Ex vivo strategy. 1) Collect patient's somatic cells (e.g., fibroblasts); 2) Convert into induced pluripotent stem (iPS) cells; 3) Correct the genetic defect using virus or gene editing approach; 4) Differentiate the iPS into progenitors; and finally, 5) Re-administer the modified cells to either 5a) the donor (autologous cell therapy) or 5b) another patient (allogeneic); or 5c) Use for drug screening, etc.

# NUOVE STRATEGIE DI TERAPIA GENICA PER DMD

**Exon-skipping** (“salto dell’esone”): mira ad eliminare il “danno molecolare” modificando direttamente l’RNA messaggero che codifica per la distrofina. Il corretto schema di lettura del gene può essere ristabilito eliminando direttamente uno o più esoni corrispondenti alla regione in cui è presente la mutazione. Questo processo di eliminazione viene effettuato usando dei corti frammenti di RNA, chiamati antisenso, che si appaiano in zone specifiche dell’ **RNA messaggero** → conversione da fenotipo Duchenne a fenotipo Becker

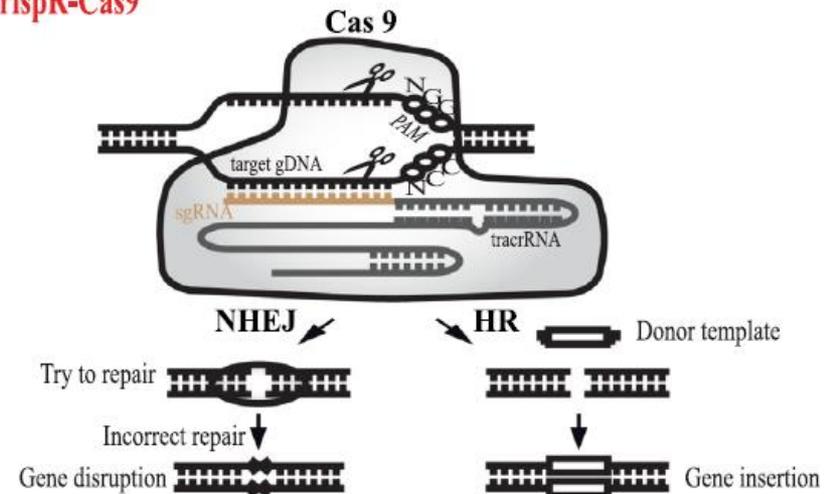


Similarmente all'*exon-skipping*, il **sistema CRISPR-Cas9** (2016), permette di eliminare una porzione specifica di nucleotide, in questo caso la porzione che determina la mutazione frame-shift. Alcuni ricercatori hanno preso dei fibroblasti dai pazienti con DMD e riprogrammati a cellule staminali pluripotenti *iPS*. Su queste *cellule iPS* viene tolta la mutazione tramite il sistema CRISPR-Cas9 e dunque ripristinato il modulo di lettura. Le cellule staminali vengono poi reintrodotte nel paziente che aveva originariamente donato i fibroblasti → così non esiste il problema del rigetto! Finora l'esperimento è stato fatto solo nel topo.

## PREMIO NOBEL PER LA CHIMICA 2020



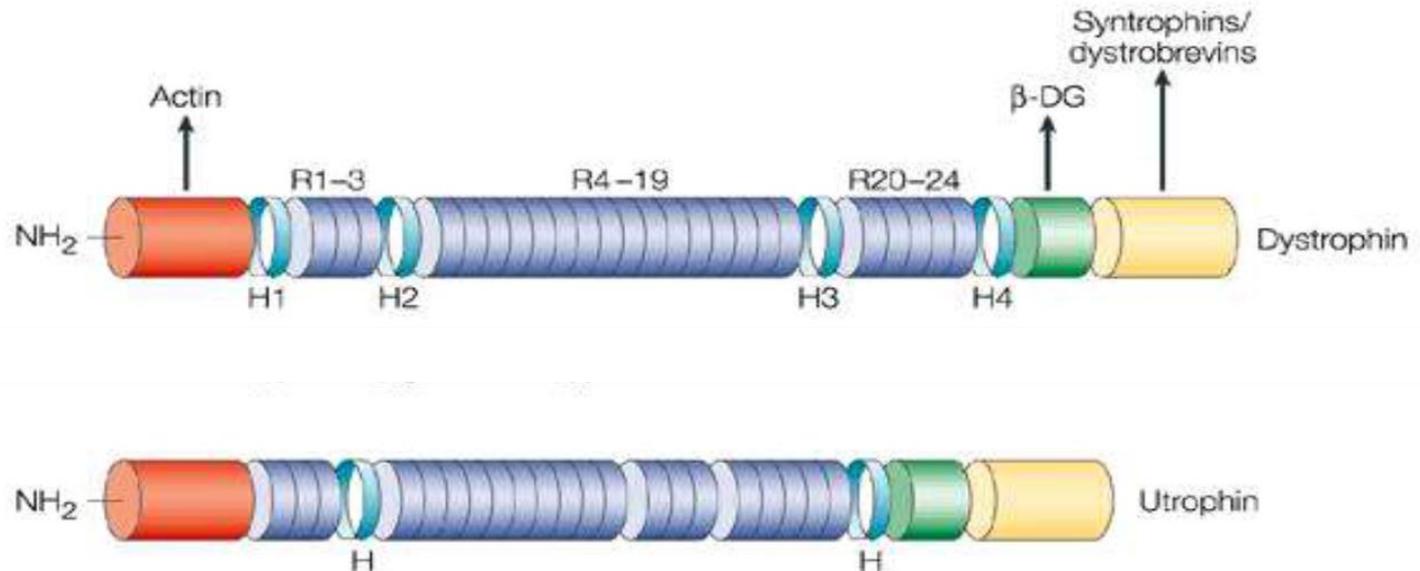
### Crispr-Cas9



## -Modulazione del gene per l' Utrofina:

Topi Mdx overesprimenti utrofina in seguito a trattamento farmacologico, hanno una reversione del fenotipo malato.

(A phase II trial is ongoing with 40 patients enrolled for a 48 week open label treatment. A significant reduction of muscle damage on muscle biopsies after 24 weeks of treatment has been reported)



From: **Advances in Muscular Dystrophies**

JAMA Neurol. 2015;72(7):741-742. doi:10.1001/jamaneurol.2014.4621

**Table. Treatment Strategies for DMD/Becker MD**

Strategy	Mechanism	Restores Dystrophin	Target Population	Status
Corticosteroids	Inhibition of muscle proteolysis	No	All patients with DMD	Off label, widespread use
Myostatin inhibition	Myostatin inhibition should augment muscle growth	No	All patients with DMD and other patients with muscle disease	Human clinical trials
Nitric oxide augmentation (Sildenafil, Tadalafil)	Phosphodiesterase inhibition reduces functional ischemia of muscle	No	All patients with DMD	Human clinical trials
Utrophin upregulation (SMT C1100)	Compensation of dystrophin deficiency by utrophin, a close homologue	No	All patients with DMD	Human clinical trials
Gene therapy (delivery of $\mu$ -dystrophin via AAV)	Viral vector-based delivery of dystrophin	Yes, truncated $\mu$ -dystrophin fits in AAV	All patients with DMD	Human clinical trials
Stem cell therapy	Cell-based delivery of dystrophin	Yes	All patients with DMD	Preclinical studies
ASO therapy (Eteplirsen, Drisapersen)	ASO-induced exon skipping restores reading frame of dystrophin	Yes, with certain exons missing	Currently approximately 13% of DMD population amenable to exon 51 skipping; other ASOs under development	Human clinical trials
Stop codon readthrough (Ataluren)	Biochemically induced readthrough of pathogenic stop codons	Yes	Approximately 13% of DMD population with nonsense mutations	Human clinical trials

Abbreviations: AAV, adeno-associated virus; ASO, antisense oligonucleotide; DMD, Duchenne muscular dystrophy; MD, muscular dystrophy.

# PrimeView

## Duchenne muscular dystrophy

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is caused by mutations in *DMD* (encoding dystrophin) that prevent production of the muscle isoform of dystrophin. *DMD* mutations that result in truncated dystrophins cause Becker muscular dystrophy (BMD). Collectively, DMD and BMD are called dystrophinopathies.

### Epidemiology

Dystrophinopathies affect 1 in 5,000 to 1 in 6,000 live male births, globally. The prevalence of DMD is <10 cases per 100,000 males and the prevalence of BMD is <8 cases per 100,000 males. As both disorders are X-linked, the prevalence of DMD in females is very low (<1 case per 1,000,000 females), and DMD typically only occurs in females with Turner syndrome or those with bi-allelic *DMD* mutations or a chromosomal translocation affecting *DMD*. Female carriers are usually asymptomatic, although some carriers develop muscle weakness and cardiac symptoms.

### Diagnosis

DMD should be suspected in boys with delayed motor milestones, muscle weakness or Gowers' sign (requiring the use of the hands to 'walk up' the legs when moving from a floor position to a standing position). Other symptoms that are suggestive of DMD include cognitive impairment, learning difficulties and behavioural problems (which collectively occur in 30% of patients) and speech impairment. Later in life, patients with DMD can develop gastrointestinal symptoms (including delayed gastric emptying and intestinal paresis), dilated cardiomyopathy, limb muscle contractures, scoliosis, and bladder and urinary tract dysfunction. Diagnosis of DMD requires the identification of causative mutations in *DMD*. Multiplex ligation-dependent probe amplification detects large deletions and duplications (which occur in 75% of patients with DMD) and Sanger sequencing detects small mutations.

• Diagnosis of DMD in a child should lead to genetic testing of their mother to assess her carrier status.

### Management

Respiratory function should be assessed annually after diagnosis and every 6 months after loss of ambulation. Respiratory support includes the use of mechanically assisted coughing and, at later stages of disease, mechanical ventilation.

Cardiac function should be evaluated annually after diagnosis. Angiotensin-converting-enzyme inhibitors and beta-blockers are used for treatment of dilated cardiomyopathy in DMD.

Mutation-specific therapies approved for DMD include ataluren (a small molecule targeting nonsense mutations) in Europe and antisense oligonucleotide therapy for out-of-frame mutations in the USA and Japan.

Glucocorticoid treatment can delay loss of ambulation and respiratory defects, the need for scoliosis surgery and cardiomyopathy onset, and should be prescribed to all patients with DMD from childhood.

Muscle contractures and scoliosis can require physiotherapy and orthoses. Surgery may be required in those with severe scoliosis.

Gastrointestinal management of DMD includes nutritional advice, osmotic laxatives and percutaneous endoscopic gastrostomy tube use. Management of urological symptoms requires pharmacological therapy.

### Mechanisms

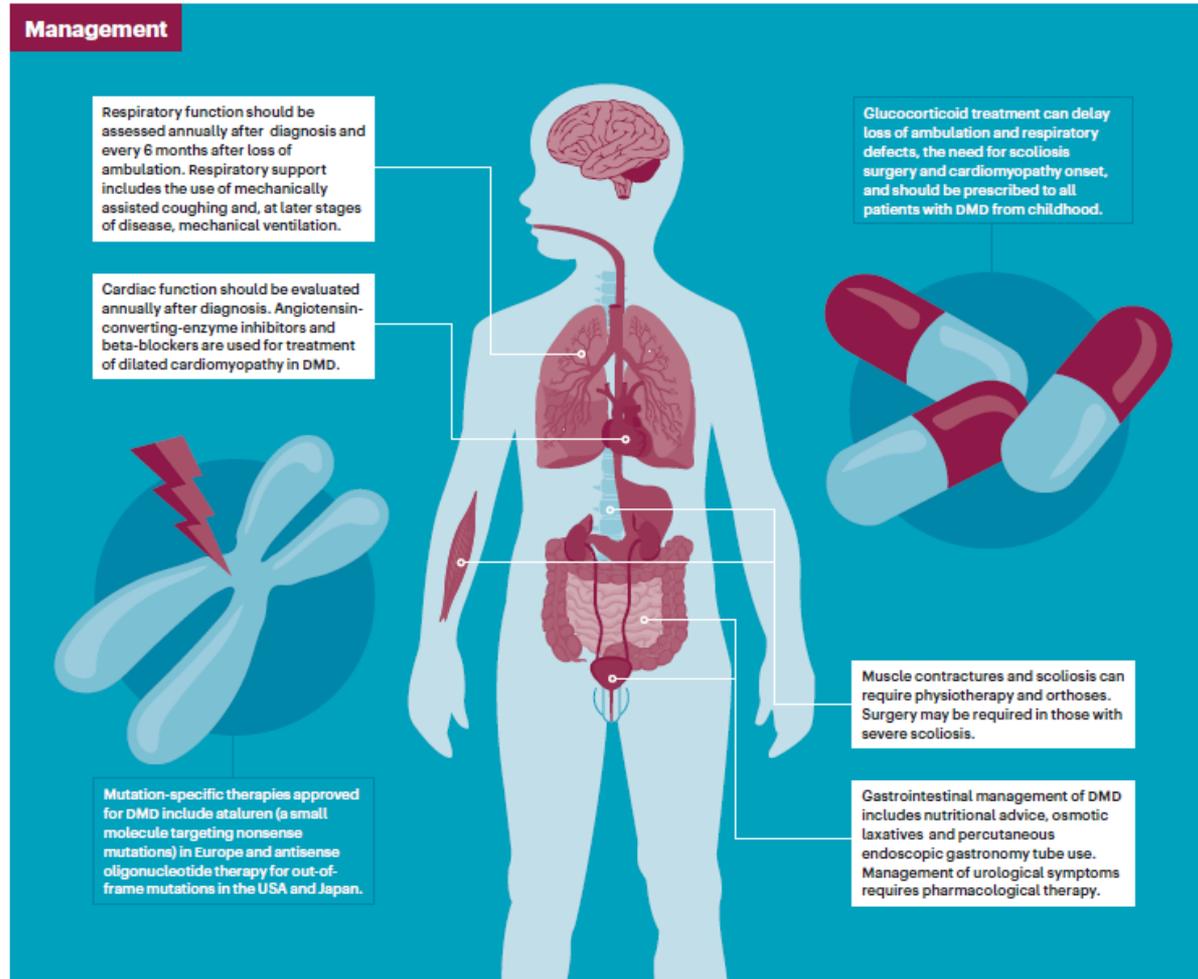
Dystrophin interacts with a wide variety of proteins and structures in skeletal muscle, including the sarcolemma, cytoskeleton, channel proteins, and signalling and scaffolding proteins, to form a complex known as the dystrophin-associated protein complex (DAPC). Loss of dystrophin leads to the disassembly of the DAPC, leading to widespread changes in muscle function and structure, including sarcolemma weakening, ischaemia, oxidative and nitrosative stress and mitochondrial dysfunction, which ultimately lead to muscle degeneration and necrosis. The loss of muscle tissue leads to the muscle weakness that is characteristic of DMD.

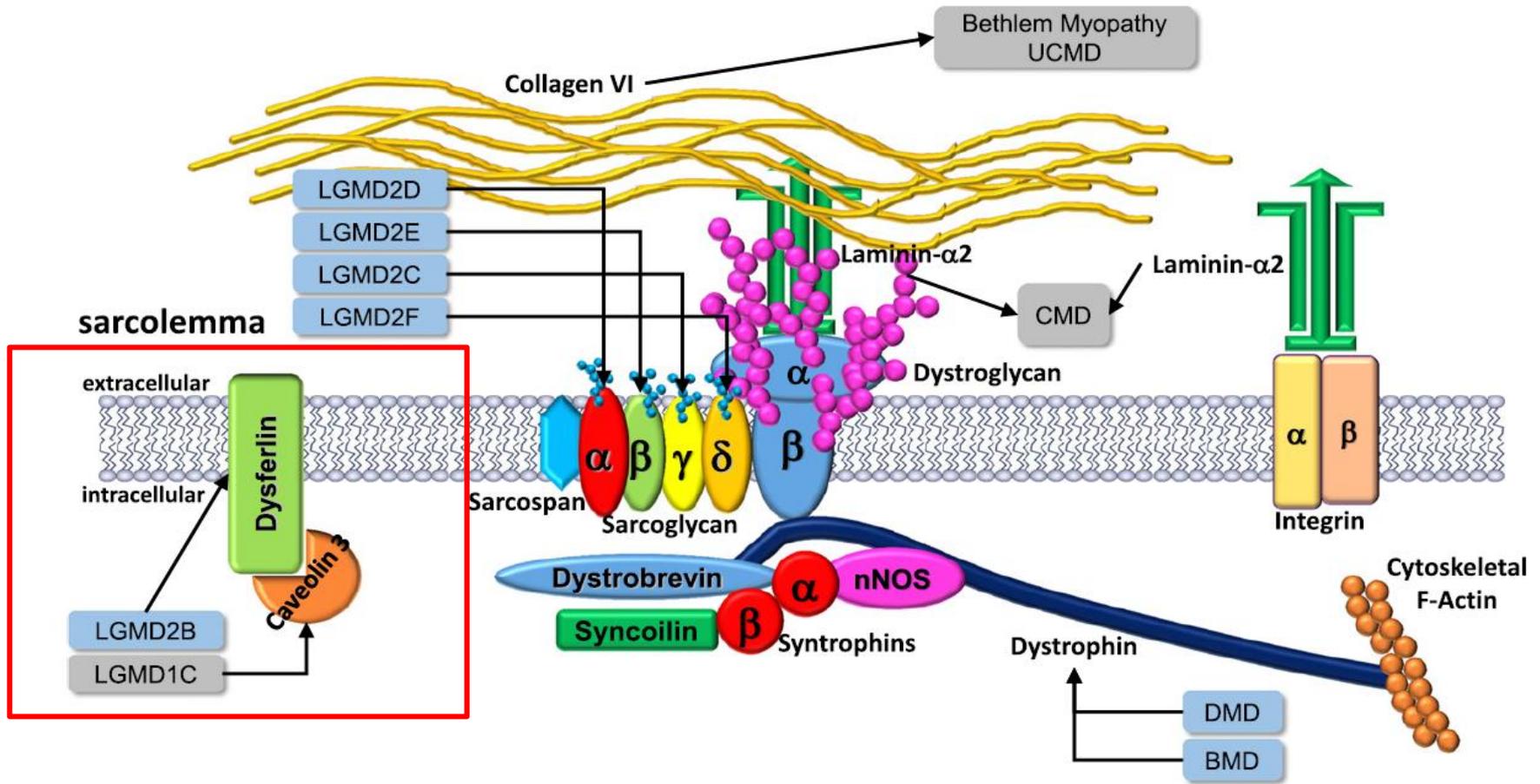
### Outlook

Several genetic therapies for DMD are in clinical trials. Typically, these therapies aim to partially restore dystrophin function. Adeno-associated viral vectors can be used to deliver a copy of micro-dystrophin cDNA to affected tissues. Antisense oligonucleotide-mediated exon skipping and genome editing aim to allow patients with DMD to produce BMD-like dystrophins, and are in development.

### Quality of life

Reduced physical ability and increased disease severity are perceived to contribute to reduced quality of life in patients with neuromuscular disorders by unaffected individuals, although some studies have found no effects on quality of life in those with neuromuscular disease. Factors that can mitigate the quality of life effects of DMD include satisfaction with care and treatment, social interaction and support, and adjusted expectations and acceptance.





-Deficienza di  $\alpha$ -sarcoglicano o  $\beta$ -sarcoglicano (autosomal recessive muscular disease)

-Deficienza di  $\gamma$ -sarcoglicano (severe childhood recessive muscular dystrophy)

-Deficienza di  $\alpha$ -distroglicano: determinano distrofie muscolari autosomiche recessive dovute a difetti nella glicosilazione dell' $\alpha$ -distroglicano

-Deficienza di  $\alpha_2$ -laminina causa CMD (congenital muscular dystrophy)

-Deficienza di Collagene VI (Distrofia di Ullrich e Miopatia di Bethlem)