

233rd ENMC International Workshop: Stato dell'arte dei trial clinici per le calpainopatie- Settembre 15-17 , 2017 Naarden, The Netherlands

William Lostal¹, J. Andoni Urtizberea², Isabelle Richard¹ and the calpain 3 study group (vedi 10)

¹ INTEGRARE, Genethon, Inserm, Univ Evry, Université Paris-Saclay, 91002 Evry, France

² APHP-Filnemus, 64700 Hendaye, France

Questo lavoro è dedicato alla memoria del collega ed amico, Dr. Hiroyuki Sorimachi, che è recentemente scomparso. Egli scoprì la calpaina 3 e fece ricerche illuminanti nel campo della calpaina. Mancherà a tutti noi

Corresponding author:

Isabelle Richard

orcid.org/0000-0002-6505-446X

Généthon

1 rue de l'Internationale, 91000 Evry, France

Tel: 33-1 69 47 29 38

Fax: 33-1 60 77 86 98

richard@genethon.fr

Parole chiave: ENMC report; Limb-girdle muscular dystrophy 2A; calpainopathy; calpain-3; clinical readiness; gene therapy

In evidenza: grazie allo scambio di informazioni durante il workshop, è stato possibile

- **Ottenere un quadro accurato della distribuzione dei pazienti nel mondo**
- **Ottenere un quadro accurato delle presentazioni cliniche dei pazienti**
- **Proporre una serie di azioni volte alla preparazione dei trial clinici**

1. Introduzione

Diciotto ricercatori e clinici e due rappresentanti delle associazioni dei pazienti (Associazione Italiana Calpaina 3, Italy e Coalition to Cure Calpain3, USA), da 9 nazioni (Francia, Germania, Italia, Danimarca, Spagna, Regno Unito, Giappone, Brasile e Stati Uniti d'America), si sono incontrati a Naarden, Olanda, dal 15 al 17 settembre, per discutere dello stato dell'arte della preparazione dei trial clinici per la distrofia muscolare dei cingoli tipo 2A (LGMD2A; OMIM 253600) identificata anche come calpainopatia.

LGMD2A è dovuta a mutazione nel gene CAPN3, che codifica per una proteasi calcio-dipendente denominata calpaina 3 (1). Questa malattia è caratterizzata da una debolezza muscolare lentamente progressiva che colpisce selettivamente la muscolatura di entrambi i cingoli. Ad ora

non esiste una terapia per questa malattia. L'emergere di nuovi approcci terapeutici nell'ambito muscolare come la terapia genica, ha portato a molte discussioni tra i clinici ed i ricercatori circa lo stato di avanzamento degli studi sui trial clinici delle calpainopatie.

2. una prospettiva storica delle distrofie dei cingoli

Michel Fardeau ha redatto il racconto affascinante che ha portato all'identificazione del gene della calpaina 3, dalla primissima osservazione clinica e descrizione patologica fatta a Erb in Germania alla identificazione dell'origine genetica della malattia nel 1995.

Il termine stesso di distrofia muscolare dei cingoli (LGMD) coniato durante la seconda guerra mondiale e reso popolare da Walton & Natrass nel 1954, rimane altamente dibattuto ancora ai nostri giorni. Nei tardi anni 70, Michel Fardeau ebbe l'opportunità di rivedere i concetti di Erb sulla distrofia muscolare ad esordio giovanile grazie ad una popolazione geneticamente isolata chiamata '*Petits Blancs des Hauts*' dell'isola di Reunion, territorio francese nell'oceano indiano. Con la raccolta di dati clinici e con l'analisi del loro DNA si arrivò alla prima mappazione sul cromosoma 15.

Ulteriori campioni raccolti tra le comunità Amish degli Stati Uniti d'America ed altre nazioni (Brasile) resero possibile l'identificazione del gene della CAPN3 mentre chiaramente si evidenziava l'eterogeneità genetica delle LGMD. Ai nostri giorni le calpainopatie restano le più frequenti forme di MD nella maggior parte delle nazioni con una riportata prevalenza tra 10 e 70 per milioni di abitanti (2-4)

Andoni Urtizbera ha fatto una revisione di quanto è al momento conosciuto circa le calpainopatie, in particolar modo dal punto di vista clinico. Grazie al contributo di Lopez de Munain (san Sebastian, Spagna) ed in base alle sue personali esperienze, ha revisionato le presentazioni cliniche classiche e non-classiche delle calpainopatie.

La calpainopatia è qualche volta capace di mimare molti altri disturbi neuromuscolari come ad esempio le miopatie infiammatorie (miosite eosinofila) o miopatie metaboliche.

Sono stati recentemente riportati numeri casi di forme benigne. La recente scoperta di una forma di calpainopatia autosomica dominante ha ulteriormente ampliato lo spettro clinico delle calpainopatie.

L'esistenza di numerose mutazioni fondatrice è stata a sua volta evidenziata così come l'eterogeneità clinica anche all'interno delle stesse famiglie appartenenti a nuclei geneticamente isolati ipoteticamente omogenei. E' stato anche sottolineato il fatto che attualmente la tecnica NGS (Next Generation Sequencing) sta cambiando l'algoritmo diagnostico.

Una migliore conoscenza di queste varianti cliniche ha rilevanza nei futuri trial clinici.

3. La famiglia della Calpaina 3 ed il ruolo

Yasuko Ono (Giappone) ha presentato una revisione delle conoscenze attuali sulla famiglia della calpaina 3 e sulla relazione e funzione della stessa (Figura 1) .

La calpaina 3 è membro della famiglia delle calpaine, proteasi non lisosomiali attivate dal calcio. Sebbene alcune isoforme siano state identificate nel cristallino e nel cervello, la forma classica a catena completa della CAPN3 è primariamente espressa nel muscolo scheletrico (5). Da sottolineare che nel cuore l'espressione della calpaina 3 è 100 volte inferiore a quella nel muscolo scheletrico con livelli che variano da specie a specie (6-7).

Nel muscolo, l'enzima è presente come un enzima dormiente, che interagisce con uno dei suoi partner, la proteina titina (8,9) . E' stato dimostrato che la calpaina 3 si autoattiva con l'autolisi attraverso la rimozione di un peptide interno che libera il sito catalitico all'accessibilità di un substrato (10,11). Sebbene l'autolisi possa essere coinvolta nel processo di attivazione della calpaina 3, non tutte le proteine mutanti della LGMD2A perdono la loro attività autolitica. Una delle recenti dimostrazioni delle funzioni della calpaina 3, la complementazione intermolecolare per rigenerare l'attività proteasica dopo l'autolisi, fornisce un nuovo aspetto dell'effetto di mutazioni patogeniche (12).

Il preciso ruolo (i) della calpaina 3 ed il meccanismo tramite il quale causa la LGMD2A non sono completamente chiari sebbene molte evidenze sottolineino il ruolo del rimodellamento del citoscheletro (13-15). Un esempio di ricerca in merito al ruolo della calpaina 3 nel muscolo è stato dato da **Amets Saenz** (Spagna) che ha presentato uno studio sul turn-over delle proteine muscolari nei miotubi di soggetti affetti da LGMD2A con l'obiettivo di studiare i meccanismi patofisiologici delle LGMD2A ed identificare target terapeutici che possano bloccare l'evoluzione della malattia (16). I mioblasti maturi ottenuti da pazienti con LGMD2A mostrano un difetto nella transizione dell'isoforma integrina B1A transmembrana all'isoforma b1D che è invece visto nella fusione di mioblasti e nella maturazione delle fibre muscolari normali. E' stato osservato che Frizzled (FRZB), una proteina del circuito Wnt, regola l'espressione di integrina b1D e che il suo silenziamento può salvare la normale espressione della proteina coinvolta nei processi di fusione nella LGMD2A. Questo potrebbe suggerire che il circuito Wnt possa rappresentare un'opzione terapeutica nella LGMD2A, in aggiunta ad altri circuiti già proposti come potenziali target (14, 17-20).

4. Presentazione clinica e storia naturale di malattia

Bruno Eymard (Paris) ha presentato l'esperienza francese sulle calpainopatie. Nell'insieme 231 casi di calpainopatia sono registrati nel database del centro di riferimento francese con età media di esordio della sintomatologia attorno ai 13 anni. Nei due laboratori francesi nei quali si esegue analisi molecolare per le calpainopatie , rispettivamente a Parigi (Dr F Leturcq, Cochin hospital) e a Marsiglia (Dr M Krahn, La Timone hospital), 96 casi indice con due mutazioni sul gene della calpaina sono stati identificati tra il 2012 ed il 2016.

Le calpainopatie rappresentano circa il 20% di tutte le LGMD testate geneticamente. Sebbene la malattia inizi a manifestarsi nella più parte dei pazienti attorno all'adolescenza, l'età di esordio varia tra la prima infanzia e la mezza età adulta.

Questi dati sono simili a quelli raccolti da serie più piccole di pazienti riportate tra il 1996 ed il 2016(21,22) Il decorso della malattia è sempre progressivo, con peggioramento della stenia muscolare a livello di entrambi i cingoli, che condiziona una riduzione delle funzioni.

In una casistica di 20 pazienti francesi recentemente pubblicata, di età compresa tra i 19 ed i 65 anni (mediana 42 anni) , seguiti presso l'Istituto di Miologia di Parigi, per un'osservazione di storia naturale, il 52% dei pazienti non camminava, il 14% aveva bisogno di una stampella di un deambulatore. (22).

Nel medesimo report, sono stati descritti 30 pazienti dell'isola di Reunion e 35 pazienti di origini basche.

L'età di esordio e la gravità della malattia erano simili nei tre gruppi. In questo studio, così come nella nostra precedente esperienza (21) , il pattern clinico era omogeneo.

o con coinvolgimento di entrambi i cingoli maggior coinvolgimento del m serrato anteriore con scapole alate, il giteo massimo ed i medi, compartimento posteriore della coscia e degli adduttori (22).

Oltre alla presentazione classica, è stata possibile osservare alcune variazioni nei fenotipi.

Per esempio: un paziente seguito presso l'Istituto di Miologia di Parigi, classificato come Calanopatia con retrazioni, in cui queste ultime erano preminenti e coinvolgevano sia i gomiti che le caviglie. Non è stato evidenziato alcun coinvolgimento cardiaco e quello respiratorio era di grado moderato. In 9 pazienti, seguiti all'Istituto di Miologia, con mutazioni sul gene della calpaina, l'espressione della proteina calpaina 3 al western Blot era normale o solo minimamente ridotta. E' interessante sottolineare che tutti i pazienti, tranne uno, erano di sesso femminile , con età di esordio più tardiva dai 18 ai 47 anni, media 32.1. Solo due di 9 non erano deambulanti, dopo una durata di malattia rispettivamente di 24 e 32 anni.

Andoni Urtizberea ha presentato in dettaglio uno studio osservazionale sulle manifestazioni cliniche e la progressione di malattia di 85 pazienti con diagnosi certa di LGMD2A, di età tra i 14 ed i 65 anni, reclutati in 3 centri: Istituto di Miologia di Parigi, San Sebastian, Spagna, e Isola di Reunion,Saint-Pierre.

Sono stati seguiti ogni 6 mesi per 2 anni ed un sottogruppo era stato seguito annualmente per altri due anni.

I dati raccolti da tutti i pazienti, includeva la storia clinica, i parametri ematochimici, i valori di forza muscolare manuale (MMT) ed una misura muscolare quantitativa, punteggi funzionali, funzionalità cardiaca e respiratoria. Inoltre, una Tomografia computerizzata agli arti inferiori stata eseguita in un sottogruppo(**Figure 2**).

Questo studio conferma la descrizione clinica di un disturbo lentamente progressivo con esordio nella prima o nella seconda decade di vita con un certo grado di variabilità legato al sesso ed al tipo di mutazione.

Le mutazioni nulle causano un fenotipo più severo mentre le eterozigosi composte sono quelle con il minor coinvolgimento. La debolezza muscolare è simmetrica e predomina nella muscolatura assiale del tronco e della muscolatura prossimale del cingolo inferiore.

E' presente un'alata correlazione tra la debolezza muscolare individuale testata tramite MMT e la perdita di densità muscolare alla TC.

Tutti i dati generati aiuteranno nello stabilire gli endpoints di futuri studi clinici.

Alicia Alonso e Jordi Diaz-Manera (Spagna)

Hanno revisionato e presentato i dati sui pazienti calpainopatici in Spagna. I pazienti spagnoli sono seguiti in diversi centri; sebbene al momento ci siano 5 unità neuromuscolari riconosciute come centri di riferimento da Ministero della Salute spagnolo (3 centri a Barcellona, 1 a Valencia e uno a Siviglia) , gli studi sul gene *CAPN3* sono effettuati in solo centro pubblico a San Sebastian - Donostia.

Il registro dei Disturbi Neuromuscolari Spagnolo (NMD-ES) contiene al momento i dati clinici e genetici di 83 pazienti calpainopatici; 36 (43%) di questi pazienti sono donne; l'età media di esordio dei sintomi in questa coorte sono 12,4 anni. All'ultima valutazione clinica, il 97% dei pazienti mostrava debolezza muscolare agli arti inferiori più marcata che agli arti superiori. Le scapole alate erano ritrovate nel 64% dei casi. Più del 70% dei pazienti non era deambulante mentre solo il 10% era capace di camminare in completa autonomia.

La mutazione più frequente era p.Arg788Ser-fs14* (59% dei casi), nota come la "mutazione basca". Altre mutazioni frequenti erano la p.Gly222Arg (10% della coorte) e la p.Arg748Gln (6% della coorte).

Michela Guglieri (UK) ha descritto la coorte di 56 pazienti del Regno Unito con LGMD2A, seguiti presso il Centro di Ricerca sulle Distrofia Muscolari John Walton (JWMDRC) di Newcastle, UK. La LGMD2A rappresenta il 21% della popolazione attuale di LGMD seguita presso il JWMDRC, dato che è in linea con quelli precedentemente riportati. I pazienti sono equamente distribuiti tra maschi e femmine (29 vs 27); l'età media era 38 anni (range 14-83). Circa il 50% dei casi riportava un esordio tra i 10 ed i 20 anni , con comunque un range molto ampio di (4 -60). L'età media di perdita del cammino era 12 anni dopo l'esordio dei sintomi (SD: 11 anni). L'esordio precoce sembrava legato ad un decorso più severo, con più precoce perdita del cammino; al contrario nessuno dei pazienti con esordio tardivo (> 40 anni) era confinato in carrozzina. Il coinvolgimento respiratorio era presente e correlato con la severità del coinvolgimento della muscolatura scheletrica; si trattava sempre di un coinvolgimento moderato con FVC (capacità vitale forzata) attorno a 40-80% del predetto) Nessuno presentava disturbi cardiaci. Mutazioni in omozigosi o in

eterozigosi composta erano confermate in tutti , ad eccezione di due soggetti in cui una singola mutazione era stata identificata (in corso una Multiplex ligation-dependent probe amplification)

Maggie Walter ha discusso la coorte di 35 soggetti tedeschi calpainopatici ed ha riportato le'tà di esordio, la durata di malattia , lo stato del cammino, i livelli di Creatin Chinasi (CK), i dati di risonanza magnetica, il tipo di mutazione, assieme ai dati di eterogeneità clinica e genetica. L'età media di esordio era solitamente attorno all'adolescenza, variando tra i 2 ed i 50 anni; la perdita del cammino autonomo si verificava dopo 15-25 anni dall'esordio. Era verificata una progressione più rapida nei pazienti con esordi giovanile, in maniera simile alla coorte del Regno Unito. Le mutazioni più frequenti erano la c.550delA e la c.1468C>T (p.Arg49Trp).

L'età media di esordio per i pazienti con 2 alleli "null" (che si associano alla Perdita del frammento di lettura della CAPN3 e pertanto l'assenza della proteina calpaina 3) era minore di quelli con uno o con nessun allele null.

I dati di risonanza magnetica muscolare evidenziano che mentre le mutazioni dei geni delle proteine del gruppo Dystrophin Associated Complex (distrofina, sarcoglicani) coinvolgono prevalentemente la muscolatura anteriore della coscia, mentre quelle delle proteine con funzione enzimatica (calpaina-3,FKRP) colpiscono prevalentemente la porzione posteriore.

Peraltro, nel corso della malattia anche la porzione anteriore della coscia viene colpita nella calpainopatie.

Da sottolineare inoltre che nonostante l'imaging con importanti alterazioni, molti pazienti con deficit di calpaina 3 riescono a camminare fino ai 40 anni.

Claudio Semplicini ha sottolineato che la LGMD2A rappresenta la più comune forma di LGMD in Italia (23,24) con una prevalenza stimata attorno a 1: 105.000 nella popolazione del Nord Est della nazione (3). Ha fatto la revisione dei dati di 49 pazienti con LGMD2A(di età tra gli 8 ed i 68 anni) provenienti da 3 centri (Padova, Milano e Bosisio Parini) inclusi in un protocollo di valutazione cross-sectional. Erano stati raccolti dati di storia naturale e diverse prove di funzionalità motorie (tra cui 6-minutes walking test (6MWT), Performance of Upper Limb (PUL), North-Star Ambulatory Assessment (NSAA), grip strength, test temporizzati] così come di funzionalità cardiaca e respiratoria. Erano inclusi anche i questionari Psychometric Tests of Individual Neuromuscular Quality of Life (INQoL) ed impact of fatigue (Fatigue Severity Scale).La funzionalità motoria era correlata all'età (i giovani meglio dei vecchi) , al sesso (le donne meglio degli uomini), proteina residua al Western Blot (presenza meglio che assenza) ed al numero di alleli (0 meglio di 1 e 2)

Mutazioni specifiche sono associate a fenotipi peculiari, come da esempio la mutazione nell'esone 11, ricorrente nell'area di Venezia, associati con esordio relativamente tardivo e perdita della deambulazione, marcata debolezza del bicipite brachiale e normale espressione di CAPN3 al WB (difetto autocatalitico) (25). Sembra che la scala NSAA, i test temporizzati e gli item prossimali

della scala PUL nella coorte italiana, possano essere i test clinicamente più significativi per futuri trial clinici. Una raccolta di dati longitudinali potrà essere di sicuro aiuto per definire meglio questa eterogeneità.

Mariz Vainzof (Brasile) ha esaltato il fatto che tra le famiglie brasiliane includeva famiglie studiate dal 1990, quando loro stessi avevano contribuito all'identificazione del gene della CAPN3.

Da allora i pazienti sono stati analizzati tramite analisi proteiche e /o del DNA, prima tramite screening del singolo gene ed attualmente utilizzando la tecnica dell'NGS, al centro Human Genome e stem cell Research, un centro di riferimento delle malattie neuromuscolari in Brasile.

La LGMD2A è la più comune LGMD in Brasile e copre circa il 32% dei casi. Erano presenti i dati genetici osservati in 63 pazienti, da 57 famiglie con imparentate. Sono state identificate un totale di 31 differenti mutazioni, con 6 nuove mutazioni descritte che includono 5 mutazioni non-senso.

La consanguineità in queste famiglie era molto alta (72%) , con due famiglie che presentavano una presentazione con trasmissione di tipo autosomico-dominante.

Alcune delle mutazioni più comuni in Europa ed in USA erano anche tra le più frequenti in Brasile, come la p.Arg788Serfs*14 (la mutazione basca) e la mutazione p.Arg110*.

Esisteva una correlazione positiva tra tipo di mutazione e proteina, con mutazioni non-senso che mostravano completa assenza di proteina mentre altre mutazioni erano compatibili con la presenza della calpaina 3 nel muscolo. In maniera interessante , alcune mutazioni specifiche, come la mutazione p.Lys254del e la p.Arg490Trp che mostravano la presenza di livelli quasi normali di calpaina 3 nel muscolo.

In fin, utilizzando la banca brasiliana 80 plus dei controlli (26), è stato stimato che la frequenza di mutazioni patogene LGMD2A descritte in ClinVar, un database pubblico delle relazioni tra variazioni umane e fenotipo (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), rappresenta una popolazione di 1/90 eterozigoti, e 1/32000 affetti da LGMD2A nella popolazione brasiliana.

Vincent Carson

Ha riportato i casi della comunità Amish dove era riportato un effetto fondatore per la calpainopatie. Ha presentato la storia dell'arrivo di questa comunità negli Stati Uniti, dando luogo ai due principali insediamenti in Pensilvania ed in Indiana tramite le migrazioni dalla Germania e dalla Svizzera.

La mutazione in omozigosi della popolazione Amish è presente nella popolazione dell'Indiana del Nord e curiosamente anche nella popolazione europea.

John Vissing

Ha presentato le forme di calpainopatia autosomiche dominanti di calpainopatie, che sono state riportate nel 2016 (27). Il meccanismo di manifestazione della malattia è simile alle forme recessive, dal momento che l'espressione di calpaina 3 è molto severamente down-regolato nelle forme dominanti, fatto che potrebbe essere dovuto all'effetto negativo dominante della proteina mutata sulla proteina wild-type dell'allele sano. Questo potrebbe stare ad indicare che non tutte le singole varianti di CAPN3 possono causare una forma dominante di LGMD; solo quelle che determinano una produzione di una proteina aberrante che polimerizza e che altrimenti disturba la proteina wild-type. A differenza di alcuni casi di LGMD2A, dove la calpaina 3 è completamente persa, una parte della proteina wild-type è sempre presente nelle forme dominanti, nonostante i livelli severamente ridotti. Potrebbe essere per questa ragione che il fenotipo delle forme dominanti di calpainopatia è più lieve di quelle recessive (27).

Il pattern di coinvolgimento muscolare ricorda in maniera importante quello delle forme recessive, ma nelle forme dominanti l'esordio della malattia è più tardivo (34 anni a confronto dei 16 nelle LGMD2A) e la debolezza muscolare è ridotta.

Inoltre, i livelli plasmatici di CK non sono sempre elevati, mentre lo sono quasi sempre nelle LGMD2A.

Sono necessarie ulteriori ricerche cliniche volte ad identificare le nuove forme dominanti, che in alcuni casi possono passare inosservate a causa della più modesta manifestazione della malattia.

Vissing ha inoltre presentato una nuova condizione clinica legata ad una mutazione missenso c.1715G>C nel gene CAPN3.

Come con le 10 famiglie con trasmissione dominante e la stessa mutazione c.643_663del21 nella CAPN3, la malattia nelle 3 generazioni della famiglia con mutazione c.1715G>C mostrava perdita della calpaina 3 a livello muscolare, ed il sequenziamento dell'esoma non era riuscito a mostrare altra causa di malattia.

Nella ricerca di forme autosomico dominanti di calpainopatia, il clinico dovrebbe ricercare: 1) segregazione di nuove varianti di CAPN3 con la malattia, 2) Perdita della calpaina 3 al WB, 3) fenotipo simile alle forme classiche di LGMD2A ma più lieve, 4) escludere altre cause di malattia, ad esempio tramite sequenziamento dell'esoma.

5. Aspetti diagnostici

La diagnosi genetica delle calpainopatie è disponibile utilizzando di routine il sequenziamento Sanger da tempi poco successivi alla scoperta del gene CAPN3 nella LGMD2A nel 1995 (1).

E' ora disponibile usando la tecnica del Next Generation Sequencing (NGS), ma sono possibili anche altre strategie (analisi di pannelli genici che includono tutti i geni noti di LGMD, o tutti i geni della miopatie, o il sequenziamento dell'intero esoma).

Come per molti altri geni che causano le distrofie muscolari, la CAPN3 ha un ampio spettro mutazionale, con più di 400 varianti patologiche riportate, incluse le mutazioni "founder" ben caratterizzate (Leiden Muscular Dystrophy Pages www.dmd.nl) (28, 29).

La diagnosi molecolare di calpainopatia è complicata dal fatto che, in un certo numero di casi, i livelli di proteina sono normali al WB o quando è osservata una riduzione, può essere causata da un deficit secondario.

Nel corso del workshop ENMC sono state discusse e possibili sfide nella diagnosi genetica. Le più salienti sono riportate nella Tabella 1.

Bruno Eymard ha dichiarato che la riduzione secondaria dell'espressione della calpaina in assenza di mutazione genica non sono rare in altre forme di distrofie muscolari dei cingoli. Nel laboratorio di genetica molecolare dell'ospedale Cochin (Dr F Leturcq), il 62% del LGMD con deficit di calpaina testati tra il 2012 ed il 2014, erano calpainopatie secondarie. Nella coorte di pazienti dell'Istituto di Miologia, nove pazienti con una calpainopatia secondaria sono stati identificati. In altri 6 casi, il deficit genetico primario identificato era legato ai geni *FKRP*, *ANO5*, *TTN*. Il fenotipo clinico era comunque sempre diverso da quello delle calpainopatie primarie.

Nei 3 pazienti di questo gruppo, che mostravano mutazioni recessive nel gene della Titina, mostravano due caratteristiche cliniche francamente differenti da quelle delle forme classiche di calpainopatia: retrazioni muscolari diffuse e pattern bioptico con corpi inclusi (30).

Una possibile correlazione tra l'espressione della proteina, il tipo di mutazione e la gravità delle manifestazioni cliniche è stata riportata ma sono necessari studi collaborativi per la completa comprensione del meccanismo sottostante. In questo contesto, gli esperti hanno evidenziato il valore delle biopsie muscolari nella diagnosi ed hanno proposto nuovi studi. Nonostante l'introduzione del Next Generation Sequencing nell'algoritmo diagnostico delle calpainopatie primarie, l'analisi della biopsia muscolare può essere di estremo aiuto per una migliore comprensione della correlazione tra espressione proteica e decorso clinico e pertanto poter fornire ai pazienti informazioni prognostiche.

6. Misure di risultato/biomarcatori/endpoint clinici/disegno di sperimentazioni cliniche

6.1. Misure di risultato: Esperienza dell'Istituto di Miologia

Jean-Yves Hogrel ha presentato i dati di storia naturale retrospettivi e prospettivi nelle LGMD2A. Ha prima mostrato i dati circa le valutazioni muscolari manuali (manual muscle testing: MMT) in 25 pazienti seguiti a Parigi e a Saint-Pierre de la Réunion. Solo 1 punto di cambiamento nella valutazione MMT era osservato ogni 17 anni in media.

Questo dimostra che l'MMT non può rappresentare a buona misura di risultato per le LGMD2A, alla luce della durata limitata delle sperimentazioni cliniche.

Ad ogni modo, una mappatura del coinvolgimento muscolare ed una mappatura della progressione della debolezza muscolare potrebbe essere utilizzata per identificare alcuni distretti muscolari più predisposti a cambiamento dopo un periodo definito di malattia. Uno studio prospettico di storia naturale ha confermato questa lentissima progressione utilizzando metodi di quantificazione della forza (dinamometria fissa e dinamometria isocinetica) durante il follow up di 85 pazienti in 4 anni (22)

Anche la scala di valutazione della funzione motoria (Motor Function Measure :MFM) e l'imaging della tomografia computerizzata hanno confermato il quadro di lenta evoluzione.

La storia naturale ha mostrato che le eterozigosi composte (un allele nullo ed uno missenso) avevano un fenotipo meno severo rispetto alle mutazioni in omozigosi.

Le donne presentavano in genere un fenotipo meno severo degli uomini.

Focalizzandoci sulla forza muscolare, I risultati confermano la non linearità e lo scarso potere discriminativo della MMT. Cosa ancora più strabiliante era la variazione di correlazione tra i due metodi, che si ipotizza misurino la stessa cosa.

Inoltre questa variazione dipende del muscolo testato.

La correlazione tra i metodi era pressochè perfetta per l'estensione del ginocchio mentre era scarsa per la flessione del ginocchio. Questo implica che anche metodi quantificati non possono essere interscambiabili in relazione alla funzione muscolare testata.

Infine, la più parte delle variabili funzionali correla con la durata di malattia.

Nell'insieme , i risultati di questo studio sottolineano la lenta ma ineluttabile evoluzione della malattia. La scelta di misure neuromuscolari per i futuri trial clinici è pertanto molto stimolante.

6.2. Valutazione respiratoria

Il coinvolgimento respiratorio è stato riportato fin dalla prima descrizione della malattia da **Hélène Prigent**(4). In relazione alle differenti coorti descritte, la prevalenza è stata osservata nel 21% fino al 60% dei pazienti (2, 4, 22, 24, 31).

La disfunzione respiratoria segue ad un pattern restrittivo con una riduzione dei volumi polmonari (4, 32).

Il coinvolgimento respiratorio è in genere di grado moderato anche se in una piccola frazione di pazienti è stata descritta una severa insufficienza respiratoria (22, 31).

Nella popolazione studiata da Richard e coll, l'11% dei pazienti presentava una capacità vitale <50% del predetto(22).

Solo una minoranza dei pazienti necessita di supporto ventilatorio con la ventilazione meccanica (22,31) e l'insufficienza respiratoria come causa di morte è stata riportata solo in pochi casi (4, 31, 33).

Poche informazioni sono disponibili circa la progressione della disfunzione respiratoria nella LGMD2A; comunque , l'insufficienza respiratoria sembra correlare maggiormente con la durata di malattia e con a disfunzione motoria più che con l'età del paziente (31). Sebbene la storia del coinvolgimento muscolare nella LGMD2A necessiti di essere ulteriormente studiata, si può

comunque desumere che il coinvolgimento respiratorio può essere anche severo e dare luogo ad insufficienza respiratoria.

Pertanto il monitoraggio della funzionalità respiratoria deve essere assolutamente incluso nel monitoraggio clinico delle calpainopatie, in particolar modo nei pazienti non deambulanti.

6.3. Imaging

Robert-Yves Carlier sta coordinando un lavoro collaborativo di imaging sui pazienti con LGMD2A nel framework del progetto MYO-MRI project (<http://myo-mri.eu/>).

Questo progetto coinvolge diversi centri neuromuscolari in Europa e negli USA, ed ha l'obiettivo di raccogliere scansioni MRI di pazienti con distrofia muscolare per descriverne il pattern e lo spettro di coinvolgimento muscolare in questi disordini e per identificare alcune specificità atte a distinguerne e varie forme.

L'imaging muscolare tramite la risonanza magnetica è stato estensivamente utilizzato come metodo per studiare diverse malattie muscolari genetiche ed acquisite, e per ottenere informazioni utili per disegnare sperimentazioni cliniche (34). Fino ad ora, scansioni di tutto il corpo sono state raccolte ed analizzate in più di 50 casi di LGMD2A geneticamente confermate, con diverse mutazioni.

Nelle scansioni delle sezioni coronali ed assiali, la muscolatura prossimale che includeva la muscolatura paraspinale, era la più severamente colpita. Curiosamente, pare ci sia una dicotomia di presentazione che distingue gruppi a moderato e gruppi a severo coinvolgimento con correlazione al tipo di mutazione.

In alcuni pazienti è presente una minor asimmetria. Nell'insieme, è presente un coinvolgimento muscolare specifico per la LGMD2A, ma non c'è un segno specifico nel tessuto muscolare a confronto delle altre distrofie muscolari.

7. Registri e database, **fondazioni** di pazienti

7.1 L'esperienza TREAT-NMD nei registri di pazienti

Michela Guglieri ha presentato l'esperienza TREAT-NMD con i registri di pazienti.

Questi registri sono un mezzo utile per valutare la fattibilità dei trial, per il reclutamento nei trial clinici, per stabilire un legame con la comunità scientifica, per dare maggiore eguaglianza di accesso ai trial e per aiutare nello sviluppo di standard di cura. Sono stati presentati gli esempi dei due registri TREAT-NMD, distrofia di Duchenne ed Amiotrofia Spinale. Durante il meeting sono stati discussi vantaggi e svantaggi dei registri nazionali ed internazionali e dei differenti tipi di registri.

I registri nazionali sono generalmente organizzati in quelle situazioni nelle quali ci sono abbastanza pazienti nella nazione da n un registro nazionale, come per DMD e SMA. Al contrario per le malattie ultra-rare sembrano essere più appropriati i registri internazionali.

I registri completati dai pazienti hanno il limite della soggettività dei dati, ma hanno la più alta frequenza di registrazione ed sono mantenuti aggiornati.

Il personale sanitario riporta che i registri possono essere utili per la raccolta dei dati di storia naturale ma richiedono tempo ed impegno dei clinici.

Il registro internazionale completo di pazienti con GMD2A creato da "Coalition to Cure Calpain 3 (C3)" raccoglie al momento più di 800 pazienti registrati; la conferma genetica non è al momento necessaria e la sottoscrizione pare al momento limitata agli USA.

I registri nazionali per la LGMD2A esistono in Spagna ed in Francia, e sono registri gestiti da sanitari.

7.2 Coalition to Cure Calpain3

Jennifer Levy ha condiviso la missione ed il programma di "Coalition to Cure Calpain 3 (C3)", una fondazione di pazienti dei quali lei è Direttore Scientifico.

C3 si impegna nel trattamento e nella cura delle calpainopatie. La missione di C3 è quella di finanziare ricerche ad alto potenziale e trial clinici educando anche comunità alla malattia

I programmi di ricerca supportano molti progetti correlati a capire i meccanismi alla base della calpainopatia e a testare terapie potenziali in modelli animali.

C3 ha anche iniziative volte a supportare i test genetici in soggetti con distrofie dei cingoli non ancora definite e a generare nuovi sistemi di ricerca. La fondazione organizza meeting centrati sulle calpainopatie e si impegna a migliorare la consapevolezza sociale circa la malattia tramite campagne su social media, LGMD-Info.org (sistema educativo e di raccolta risorse per la comunità LGMD) e la giornata di consapevolezza dei LGMD (che si tiene ogni anno il 30 settembre)

C3 amministra il registro internazionale dei pazienti calpainopatici. Il registro, a cui si può accedere al sito www.lgmd2a.org, consente ai pazienti di riportare le proprie notizie, l'anno della diagnosi ed i risultati genetici, il proprio referente neurologo e le informazioni cliniche, i sintomi della malattia, i membri della famiglia affetti, i farmaci ed i sistemi di assistenza usati.

Le domande sono poste in lingua inglese, semplice, senza che ci sia necessità di conoscenze mediche, ed il tempo necessario per la compilazione della scheda è di 5 minuti.

A momento del workshop ECNM il registro contava 890 sottoscrizioni.

Al momento C3 sta valutando possibili miglioramenti al registro quali la traduzione in altre lingue e la conferma della diagnosi di chi è già registrato.

7.3 Associazione Italiana Calpaina 3, Italia

Bruno Kullmann ha presentato l'Associazione Italiana Calpaina 3 (AICa3) che è la prima e l'unica associazione italiana specifica per la LGMD2A.

Gli scopi dell'associazione possono essere riassunti in 3 punti:

- 1) Rappresentanza: dare voce ai pazienti ed alle famiglie
- 2) Ricerca: stimolare e guidare progetti di ricerca, in particolare trial clinici
- 3) Informazione: diffondere le conoscenze circa la malattia, circa i progetti di ricerca in corso, circa i centri con esperti del campo.

Mentre ci si preparava al workshop ENMC, è stata condotta un'indagine tra i pazienti italiani con calpainopatia.

Tutti i pazienti chiedevano una velocizzazione della diagnosi, lo sviluppo di terapia, la ricerca e la formazione di esperti. Oltre agli studi a lungo termine di terapia genica e cellulo-mediata, c'è una grande richiesta di studi a breve termine con l'obiettivo di rallentare la progressione della malattia e di migliorare la qualità della vita attraverso nuovi trattamenti o device capaci di ridurre le limitazioni legate alla malattia. I pazienti stanno chiedendo di essere coinvolti nella progettazione e nello sviluppo di progetti di ricerca, e questo potrebbe portare a una più efficiente traslazione della ricerca nella pratica clinica.

Una più stretta collaborazione tra pazienti e ricercatori potrebbe assicurare che gli studi ed i progetti di ricerca siano tagliati a misura dei fabbisogni dei pazienti e garantirebbero l'impegno dei pazienti stessi. AICa3 è desiderosa di supportare studi centrati sul paziente, promossi da nuovi centri di eccellenza nel trattamento delle malattie neuromuscolari.

8. Terapie per la Calpaina 3

8.1 Cellule staminali e C3

Mariz Vainzof

Ha presentato lo studio condotto da Dr. Eder Zuconi and Mayana Zatz, dal HGRC, che includeva la valutazione della capacità delle cellule adipose umane staminali mesenchimali (MSC) e delle cellule staminali di origine cordonale umane (SC) di attecchire nel muscolo, di esprimere la calpaina 3 e di migliorare la capacità funzionale nei modelli murini C3KO.

In 6 mesi, sono state iniettate per 4 volte alla settimana e 5 volte al mese, 106 cellule nella vena della coda del topo, ed è stata eseguita una valutazione funzionale. Non è stata ritrovata la proteina calpaina 3, tramite WB nel muscolo di ognuno degli animali studiati.

Comunque, analisi funzionali erano presenti nei gruppi studiati, con alcuni test che suggerivano la possibilità di trarre beneficio dall'iniezione cellulare. Una discussione più recente circa questi dati negativi dà informazioni circa la possibilità di effetto paracrino delle cellule MSC sui processi rigenerativi intrinseci del muscolo.

Diversi gruppi di questo centro stanno al momento studiando l'effetto del secretoma di queste cellule, e più specificamente, il potenziale rigenerativo di vescicole extracellulari, estratte da diverse fonti con buon potenziale miogenico.

8.2. AAV gene transfer

William Lostal ha presentato la valutazione del transfer della C3 mediato da AAV in modelli di tipo knock out di LGMD2A.

Nel tentativo di sviluppare una strategia terapeutica basata sul transfer genico per LGMD2A, una serie di esperimenti che usano vettori con DNA ricombinante Adeno-associato virale mezzo standard per la terapia (rAAV), l'attuale mezzo standard per la terapia genica, sono stati effettuati.

Dopo l'iniezione locale di vettore rAAV che esprimeva la calpaina 3 nel muscolo scheletrico di modelli murine deficitaria per la calpaina, è stata osservata una efficiente espressione di CAPN3 transgenica nel muscolo scheletro con una corretta localizzazione nei sarcomeri (35)

Questa espressione era associata con il recupero dell'attività proteolitica della calpaina 3 ed il recupero del deficit di forza contrattile. Comunque, quando si andava a valutare la somministrazione sistemica di questi vettori, era ritrovata una certa tossicità cardiaca e questa era correlata all'espressione ectopica e sregolata dell'attività della calpaina 3 nel cuore (36).

Una seconda generazione di vettori è stata pertanto disegnata, utilizzando nuovi promotori ed introducendo una sequenza target di un microRNA (miR208a) cuore specifico n estremità 3'UTR.

Questa modifica ha eliminato la tossicità cardiaca conservando l'effetto terapeutico a livello muscolare (36). Sebbene a tossicità cardiaca sia stata circoscritta prevenendo l'espressione nel tessuto cardiaco utilizzando un vettore miR-regolato, è stato anche importante studiare la sicurezza del vettore in un modello il più vicino possibile a quello umano.

Uno studio preclinico nel macaco fascicolare sano è stato condotto per valutare la sicurezza della biodistribuzione del vettore AAV9-calpain 3 con un'attenta analisi a livello cardiaco.

Dopo la distribuzione di 3×10^{13} vg/kg e dopo un mese, una singola iniezione endovena mostrava una corretta distribuzione del vettore nel cuore ma non determinava effetti avversi osservabili o tossicità detettabile.

Marie- Laurence Gourlay

Ha indicato i requisiti regolari e metodologici per lo sviluppo clinici di nuove terapie per le malattie rare in Europa (EU). I requisiti regolatori per il trial clinici in vista di autorizzazioni di mercato per le malattie rare sono simili a quelli applicabili alle malattie più comuni dal momento che i pazienti con malattie rare richiedono prodotti che siano sicuri efficaci e della medesima qualità di ogni altro prodotto medicinale.

La specificità associata allo sviluppo clinico nelle malattie rare si riferisce alla rarità dei pazienti, degli esperti, dei centri di riferimento per il trattamento, alla grande eterogeneità nei sintomi dei pazienti, l'età, la gravità e la mancanza di misure di risultato sensibili e specifiche .

In aggiunta, dal momento che la disponibilità del trattamento nelle malattie rare ha riguardato i casi in cui esiste un bisogno medico, il pronto accesso al trattamento attraverso l'uso compassionevole e l'approvazione condizionale dovrebbero essere previste.

In EU, lo sviluppo clinico nelle malattie rare dovrebbe associarsi alle linee guida della Good Clinical Practices e della European Medicines Agency (EMA). Alcuni si applicano specificamente alle malattie rare come nel caso delle linee guida della Commissione per i prodotti medici per uso umano (Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) sulla condotta dei trial clinici su piccole popolazioni e delle linee guida sempre CHMP per lo studio di prodotti medici nella popolazione pediatrica.

Alcune sono specificamente dedicate alla condotta dei trial clinici nelle malattie rare come le linee guida EMA per gli studi clinici e di prodotti medici nel trattamento della distrofia muscolare di Duchenne e di Becker.

Inoltre, alcuni hanno sottolineato il problema specificamente legato allo sviluppo di prodotti medici avanzati come per le linee guida CHMP nel follow up di pazienti trattati con terapia genica.

Ogni deviazione da queste norme condivise può essere accettata se adeguatamente motivata.

La pronta interazione con le associazioni dei pazienti per la fattibilità dei protocolli e per le valutazioni delle misure di risultato riportate dai pazienti ed EMA per consigli scientifici o per assistenza ai protocolli sono fattori determinanti per la condotta di studi così complessi.

10. Conclusioni

Il gruppo era d'accordo nel considerare i registri dei pazienti e la raccolta di dati di storia naturale uno elemento essenziale per la preparazione dei trial clinici nella LGMD2A.

Idealmente, dovrebbe essere creato un registro globale per la LGMD2A, che raccolga i dati dai registri nazionali; l'estensione del registro C3 alle nazioni al di fuori degli US potrebbe essere difficile a causa dei requisiti regolatori specifici di ogni nazione.

Un gruppo di lavoro dovrebbe incontrarsi per stabilire i punti salienti un generale accordo circa la necessità di conferma genetica della diagnosi.

La discussione ha evidenziato che per ora nessuna misura di risultato specifica per la LGMD2A è stata chiaramente definita fino ad ora, facendo emergere il bisogno di dati aggiuntivi sulla storia naturale della LGMD2A nella preparazione di futuri trial clinici. E' stato presentato come esempio lo studio di storia naturale nelle disferlinopatie, altra malattia rara.

Gli studi sulle misure di risultato nelle disferlinopatie, supportata dalla Jain Foundation, rappresenta un esempio di studio di storia naturale internazionale, multicentrico in una forma di LGMD rara e ha permesso l'identificazione di possibili misure di risultato che potrebbero essere usate per il

calcolo della potenza statistica nel disegno di sperimentazioni cliniche e nella misura dell'efficacia dei farmaci.

Comunque, il costo di studi internazionali ampi è stato discusso ed identificato il carico di lavoro necessario per uno studio di storia naturale nella LGMD2A in questo momento.

Nell'ultima sessione, e tra le varie opzioni terapeutiche, è stato presentato un approccio di relativo successo di transfer mediato da AAV. Risulta peraltro chiaro che studi pre-clinici sono ancora necessari per capire prima di tutto il funzionamento della calpaina 3 nel muscolo scheletrico.

Risultati chiave raggiunti:

- 1) Costituzione di un network integrato per la preparazione dei trial clinici nelle LGMD2A, comprendere tutti i partecipanti al meeting ed esteso ad altri ricercatori dall'isola di Reunion, le regioni dell'Est e le comunità Amish in relazione alla rilevanza dei pazienti in queste aree.
- 2) Creazione di un gruppo di lavoro sulla storia naturale e sui registri. Questi gruppi di lavoro definiranno quale tipo di misura di risultato potrà essere definita per la valutazione dei trial clinici e per come procedere nell'organizzazione di registri adeguati
- 3) Costituzione di un gruppo di lavoro su misura di risultato biochimiche, inclusi biomarcatori ematici ed urinari.

10. Partecipanti – ENMC C3 Workshop Study Group

Alicia Alonso-Jiménez (Barcelona, Spain); Robert-Yves Carlier (Garches, France); Vincent Carson (Lancaster, PA, USA); Bruno Eymard (Paris, France); Michel Fardeau (Paris, France); Marie-Laurence Gourlay (Evry, France) ; Michela Guglieri (Newcastle, UK); Jean-Yves Hogrel (Paris, France) ; Bruno Kullmann (Milan, Italy) ; Jennifer Levy (USA) ; William Lostal (Evry, France) ; Yasuko Ono (Tokyo, Japan) ; Helene Prigent (Garches, France) ; Isabelle Richard (Evry, France) ; Amets Saenz (San Sebastian, Spain); Claudio Semplicini (Padova, Italy); J. Andoni Urtizberea (Hendaye, France); Mariz Vainzof (Sao Paulo, Brazil); John Vissing (Copenhagen, Denmark); Maggie Walter (Munich, Germany)

RINGRAZIAMENTI

Questo 233th ENMC workshop è stato possibile grazie al supporto finanziario di : European Neuromuscular (ENMC) and ENMC main sponsors: Association Française contre les Myopathies (France), Deutsche Gesellschaft für Muskelkranke (Germany), Muscular Dystrophy UK, Muskelsvindfonden (Denmark), Prinses Beatrix Spierfonds (The Netherlands), Schweizerische Stiftung für die Erforschung der Muskelkrankheiten (Switzerland), Telethon Foundation (Italy), Spierziekten Nederland (The Netherlands) and Associated members: Finnish Neuromuscular Association (Finland). Siamo grati ad INSERM-U951 per il generoso support in questo workshop.

BIBLIOGRAFIA

1. Richard I, Broux O, Allamand V, Fougerousse F, Chiannikulchai N, Bourg N, et al. Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell*. 1995;81(1):27-40.
2. Urtasun M, Saenz A, Roudaut C, Poza JJ, Urtizberea JA, Cobo AM, et al. Limb-girdle muscular dystrophy in Guipuzcoa (Basque Country, Spain). *Brain*. 1998;121 (Pt 9):1735-47. Epub 1998/10/08.
3. Fanin M, Nascimbeni AC, Fulizio L, Angelini C. The frequency of limb girdle muscular dystrophy 2A in northeastern Italy. *Neuromuscul Disor* 2005;15(3):218-24. Epub 2005/02/24.
4. Fardeau M, Hillaire D, Mignard C, Feingold N, Feingold J, Mignard D, et al. Juvenile limb-girdle muscular dystrophy. Clinical, histopathological and genetic data from a small community living in the Reunion Island. *Brain*. 1996;119 (Pt 1):295-308. Epub 1996/02/01.
5. Sorimachi H, Imajoh-Ohmi S, Emori Y, Kawasaki H, Ohno S, Minami Y, et al. Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and mu-types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1989;264(33):20106-11. Epub 1989/11/25.
6. Herasse M, Ono Y, Fougerousse F, Kimura E, Stockholm D, Beley C, et al. Expression and functional characteristics of calpain 3 isoforms generated through tissue-specific transcriptional and posttranscriptional events. *Mol Cell Biol*. 1999;19(6):4047-55. Epub 1999/05/18.
7. Fougerousse F, Anderson LV, Delezoide AL, Suel L, Durand M, Beckmann JS. Calpain3 expression during human cardiogenesis. *Neuromuscul Disor*. 2000;10(4-5):251-6. Epub 2000/06/06.
8. Sorimachi H, Kinbara K, Kimura S, Takahashi M, Ishiura S, Sasagawa N, et al. Muscle-specific calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connectin through IS2, a p94-specific sequence. *J Biol Chem*. 1995;270(52):31158-62. Epub 1995/12/29
9. Kinbara K, Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. Muscle-specific calpain, p94, interacts with the extreme C-terminal region of connectin, a unique region flanked by two immunoglobulin C2 motifs. *Arch Biochem Biophys* 1997;342(1):99-107. Epub 1997/06/01.
10. Taveau M, Bourg N, Sillon G, Roudaut C, Bartoli M, Richard I. Calpain 3 is activated through autolysis within the active site and lyses sarcomeric and sarcolemmal components. *Mol Cell Biol*. 2003;23(24):9127-35. Epub 2003/12/04.
11. Garcia Diaz BE, Gauthier S, Davies PL. Ca²⁺ dependency of calpain 3 (p94) activation. *Biochemistry*. 2006;45(11):3714-22. Epub 2006/03/15.
12. Ono Y, Shindo M, Doi N, Kitamura F, Gregorio CC, Sorimachi H. The N- and C-terminal autolytic fragments of CAPN3/p94/calpain-3 restore proteolytic activity by intermolecular complementation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(51):E5527-36. Epub 2014/12/17.
13. Duguez S, Bartoli M, Richard I. Calpain 3: a key regulator of the sarcomere? *FEBS J*. 2006;273(15):3427-36.
14. Kramerova I, Kudryashova E, Venkatraman G, Spencer MJ. Calpain 3 participates in sarcomere remodeling by acting upstream of the ubiquitin-proteasome pathway. *Hum Mol Genet*. 2007;16(8):1006. Epub 2007/05/02.
15. Ojima K, Kawabata Y, Nakao H, Nakao K, Doi N, Kitamura F, et al. Dynamic distribution of musclespecific calpain in mice has a key role in physical-stress adaptation and is impaired in muscular dystrophy. *J Clin Invest*. 2010;120(8):2672-83. Epub 2010/07/02.
16. Saenz A, Azpitarte M, Armananzas R, Leturcq F, Alzualde A, Inza I, et al. Gene expression profiling in limb-girdle muscular dystrophy 2A. *PLoS One* 2008;3(11):e3750. Epub 2008/11/19.
17. Baghdiguian S, Martin M, Richard I, Pons F, Astier C, Bourg N, et al. Calpain 3 deficiency is associated with myonuclear apoptosis and profound perturbation of the IkappaB alpha/NF-kappaB pathway in limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Nat Med*. 1999;5(5):503-11. Epub 1999/05/06.
18. Laure L, Daniele N, Suel L, Marchand S, Aubert S, Bourg N, et al. A new pathway encompassing calpain 3 and its newly identified substrate cardiac ankyrin repeat protein is involved in the regulation of the nuclear factor-kappaB pathway in skeletal muscle. *FEBS J*. 2010;277(20):4322-37. Epub 2010/09/24.
19. Kramerova I, Kudryashova E, Ermolova N, Saenz A, Jaka O, Lopez de Munain A, et al. Impaired calcium calmodulin kinase signaling and muscle adaptation response in the absence of calpain 3. *Hum Mol Genet* 2012;21(14):3193-204. Epub 2012/04/17.
20. Yalvac ME, Amornvit J, Braganza C, Chen L, Hussain SA, Shontz KM, et al. Impaired regeneration in calpain-3 null muscle is associated with perturbations in mTORC1 signaling and defective mitochondrial biogenesis. *Skelet Muscle*. 2017;7(1):27. Epub 2017/12/16.
21. Fardeau M, Eymard B, Mignard C, Tome FM, Richard I, Beckmann JS. Chromosome 15-linked limb-girdle muscular dystrophy: clinical phenotypes in Reunion Island and French metropolitan communities. *Neuromuscul Disor*. 1996;6(6):447-53. Epub 1996/12/01.
22. Richard I, Hogrel JY, Stockholm D, Payan CA, Fougerousse F, Eymard B, et al. Natural history of

- LGMD2A for delineating outcome measures in clinical trials. *Ann Clin Transl Neurol.* 2016;3(4):248-65. Epub 2016/04/16.
23. Fanin M, Nascimbeni AC, Aurino S, Tasca E, Pegoraro E, Nigro V, et al. Frequency of LGMD gene mutations in Italian patients with distinct clinical phenotypes. *Neurology.* 2009;72(16):1432-5. Epub 2009/04/22.
24. Magri F, Nigro V, Angelini C, Mongini T, Mora M, Moroni I, et al. The Italian limb girdle muscular dystrophy registry: Relative frequency, clinical features, and differential diagnosis. *Muscle Nerve.* 2017;55(1):55-68. Epub 2016/10/30.
25. Fanin M, Nascimbeni AC, Fulizio L, Trevisan CP, Meznaric-Petrusa M, Angelini C. Loss of calpain-3 autocatalytic activity in LGMD2A patients with normal protein expression. *Am J Pathol.* 2003;163(5):1929-36. Epub 2003/10/28.
26. Naslavsky MS, Yamamoto GL, de Almeida TF, Ezquina SAM, Sunaga DY, Pho N, et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Hum Mutat* 2017;38(7):751-63. Epub 2017/03/24.
27. Vissing J, Barresi R, Witting N, Van Ghelue M, Gammelgaard L, Bindoff LA, et al. A heterozygous 21-bp deletion in CAPN3 causes dominantly inherited limb girdle muscular dystrophy. *Brain.* 2016;139(Pt 8):2154-63. Epub 2016/06/05.
28. Fokkema IF, Taschner PE, Schaafsma GC, Celli J, Laros JF, den Dunnen JT. LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. *Hum Mutat* 2011;32(5):557-63. Epub 2011/04/27.
29. Angelini C, Fanin M. Calpainopathy. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Mefford HC, et al., editors. *GeneReviews*(R). Seattle (WA)1993.
30. De Cid R, Ben Yaou R, Roudaut C, Charton K, Baulande S, Leturcq F, et al. A new titinopathy: Childhood-juvenile onset Emery-Dreifuss-like phenotype without cardiomyopathy. *Neurology.* 2015;85(24):2126-35. Epub 2015/11/20.
31. Mori-Yoshimura M, Segawa K, Minami N, Oya Y, Komaki H, Nonaka I, et al. Cardiopulmonary dysfunction in patients with limb-girdle muscular dystrophy 2A. *Muscle Nerve.* 2017;55(4):465-9. Epub 2016/08/09.
32. D'Angelo MG, Romei M, Lo Mauro A, Marchi E, Gandossini S, Bonato S, et al. Respiratory pattern in an adult population of dystrophic patients. *J Neurol Sci.* 2011;306(1-2):54-61. Epub 2011/05/03.
33. Hashiguchi S, Adachi K, Inui T, Arii Y, Kashiwagi S, Saito M, et al. [A clinicopathological investigation of two autopsy cases of calpainopathy (LGMD2A)]. *Brain Nerve.* 2014;66(9):1097-102. Epub 2014/09/10.
34. Tasca G, Monforte M, Ottaviani P, Pelliccioni M, Frusciante R, Laschena F, et al. Magnetic Resonance Imaging in a large cohort of facioscapulohumeral muscular dystrophy patients: pattern refinement and implications for clinical trials. *Ann Neurol.* 2016. Epub 2016/03/20.
35. Bartoli M, Roudaut C, Martin S, Fougereousse F, Suel L, Poupiot J, et al. Safety and efficacy of AAV mediated calpain 3 gene transfer in a mouse model of limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Mol Ther.* 2006;13(2):250-9. Epub 2005/11/18.
36. Roudaut C, Le Roy F, Suel L, Poupiot J, Charton K, Bartoli M, et al. Restriction of calpain3 expression to the skeletal muscle prevents cardiac toxicity and corrects pathology in a murine model of limb-girdle muscular dystrophy. *Circulation.* 2013;128(10):1094-104. Epub 2013/08/03.

Legende

Figura 1: Calpaina 3 **A/** Struttura della proteina calpaina 3. **B/** Localizzazione della calpaina 3 a livello del sarcomere. Modificata da Ojima K, Kawabata Y, *et al.*, 2010, JCI. **C/** Calpaina 3 e sua interazione con i differenti compartimenti subcellulari.

Figure 2: Scan tomografico di un paziente con LGMD2A **A/** **coscia alta:** 1: *rectus femoris*. 2: *vastus lateralis*. 3: *vastus medialis*. 4: *vastus intermedius*. 5: *sartorius*. 6: *adductor longus*. 7: *adductor magnus*. 8: *gracilis*. 9: *semi membranosus*. 10: *semi tendinosus*. 11: *biceps femoris*
B/coscia bassa. 1: *rectus femoris*. 2: *vastus lateralis*. 3: *vastus medialis*. 4: *vastus intermedius*. 5: *sartorius*. 6: *gracilis*. 7: *semi membranosus*. 8: *semi tendinosus*. 9 and 10: *biceps femoris*. **C/**polpaccio alto. 1: *tibialis anterior*. 2: *extensor digitorum longus*. 3: *peroneus longus*. 4: *tibialis posterior*. 5: *soleus*. 6: *gastrocnemius lateralis*. 7: *gastrocnemius medialis*.

D/polpaccio basso. 1: *tibialis anterior*. 2: *extensor digitorum longus*. 3: *peroneus longus*. 4: *tibialis posterior*. 5: *flexor digitorum longus*. 6: *flexor hallucis longus*. 7: *soleus*.