

Capítulo 91

Análise Genética e Molecular das Miopatias

Mariz Vainzof

Monize Lazar

Katia Maria da Rocha

Juliana Gurgel-Giannetti

91.1. Introdução

Os conhecimentos da genética e do genoma humano estão se tornando rapidamente parte integral da saúde pública e da prática médica. A conclusão do Projeto do Genoma Humano nos forneceu um catálogo de todos os genes humanos, sua sequência e um extenso – e ainda incompleto – banco de dados da variação humana. A genética médica aborda não somente o paciente, mas a família como um todo, com destaque especial para o aconselhamento genético.

Para muitas doenças genéticas, entre elas as miopatias, o teste padrão ouro de diagnóstico é a identificação da alteração patogênica associada ao fenótipo. Os avanços da biologia molecular permitiram o desenvolvimento de ferramentas eficazes para o estudo dos genes relacionados e a identificação das alterações causadoras, em última análise, do quadro clínico dos pacientes.

Em algumas situações, a análise de proteínas musculares, realizada em biópsia de músculo, pode fornecer uma pista acurada para o diagnóstico. Além disso, o estudo histopatológico e histoquímico muscular pode ser fundamental para alguns grupos de miopatias, especialmente as miopatias congênitas estruturais, nas quais a identificação de estruturas anormais nas fibras musculares permite selar um diagnóstico e triar os genes relacionados com o padrão histopatológico identificado.

O estudo de proteínas envolve a utilização de uma gama de anticorpos para proteínas musculares diferentes e pode ajudar a localizar o defeito subjacente da proteína envolvida e, assim, direcionar a escolha dos genes apropriados para busca de alterações. O diagnóstico preciso é fundamental para permitir o aconselhamento genético, bem como para definir a conduta quanto às complicações associadas à doença e avaliação de prognóstico.

Neste capítulo serão apresentadas algumas das ferramentas disponíveis atualmente para estudar os pacientes com miopatias. Uma breve descrição dos recentes avanços da ciência na

área permitirá vislumbrar novas e valiosas perspectivas para a implementação de diagnósticos mais precisos e rápidos para esse grupo de doenças.

91.2. Classificação

As miopatias podem ser classificadas de acordo com o fenótipo dos pacientes, o padrão de herança ou o gene primariamente mutado. A classificação adotada nesta revisão segue a tabela mantida pela *World Muscle Society*, que pode ser acessada online (<http://www.musclegenetable.fr/>)

91.2.1. Classificação de acordo com o grupo de doenças:

91.2.1.1. Distrofias musculares (DM).

- Distrofias musculares de Duchenne/Becker (DMD/DMB).
- Distrofias musculares de cinturas (DMC).
- Distrofia muscular tipo Emery-Dreifuss.
- Distrofia muscular tipo fascioescapuloumeral (FSH).

91.2.1.2. Distrofias musculares congênicas.

- DM com deficiência de merosina (MDC1A).
- DM com defeito de glicosilação da alfa-distroglicana.
- DM de Fukuyama.
- DM Walker-Warburg.
- DM tipo *muscle-eye-brain*.
- Síndrome da espinha rígida.
- Síndrome de Ullrich.
- Miopatia de Bethlem.
- DM com defeito de integrina.

91.2.1.3. Miopatias congênicas.

- Miopatia nemalínica.
- Miopatia de Central Core.
- Miopatia de multiminicóres.
- Miopatia miotubular/centronuclear.
- Miopatia com desproporção congênita de tipo de fibras.

91.2.1.4. Miopatias distais.

- Miopatia de Miyoshi.
- DM tibial.
- DM de Nonaka, com vacúolos bordados.

91.2.1.5. Síndromes miotônicas.

- Distrofia miotônica tipo 1 (DM de Steinert - DM1).
- Distrofia miotônica tipo 2 (DM2).
- Miotonia de Thompsen.
- Miotonia de Becker.

91.2.2. Classificação conforme o padrão de herança:

91.2.2.1. Herança recessiva ligada ao cromossomo X.

- Distrofias musculares de Duchenne/Becker (DMD/DMB).
- Distrofia muscular tipo Emery-Dreifuss.
- Miopatia miotubular.

91.2.2.2. Herança autossômica dominante.

- Distrofias musculares de cinturas (DMC).
- Distrofia muscular tipo fascioescapuloumeral (FSH).
- Distrofia miotônica tipo 1 (DM de Steinert - DM1).
- Miopatias congênicas (+ HM).

91.2.2.3. Herança autossômica recessiva.

- Distrofias musculares de cinturas (DMC).
- Distrofias musculares congênicas.
- Miopatias congênicas.

91.3. Estudos em biópsia muscular

91.3.1. Estudo histopatológico muscular

A análise histológica, histoquímica e imuno-histoquímica do músculo esquelético pode adicionar informações fundamentais para o estabelecimento do diagnóstico de um grande número de doenças neuromusculares. Além disso, o estudo de proteínas por técnica de *western*

blot permite identificar alterações quantitativas e qualitativas da proteína em estudo (**Figura 91.1**).

O diagnóstico diferencial entre as diversas formas de distrofias e miopatias congênitas é muito importante para a conduta e aconselhamento genético. Ressalta-se, ainda, que reconhecimento do padrão histopatológico muscular, especialmente nas miopatias congênitas estruturais, é passo fundamental para triagem de genes específicos (**Figura 91.2**).

Até meados de 2010, a investigação diagnóstica das miopatias era iniciada, em diversas situações, pelo estudo de proteínas musculares. Isto porque, principalmente para as distrofias musculares de cinturas, e para muitas formas de distrofias musculares congênitas, em que diferentes genes estão envolvidos, o estudo molecular era muito amplo e demorado. Atualmente, com o advento das técnicas de sequenciamento paralelo massivo, mais conhecido como sequenciamento de nova geração (NGS), o estudo concomitante de centenas a milhares de genes facilitou o processo da análise molecular, sendo este o teste de escolha para o início de diagnóstico. Apesar disso, os dados oriundos das biópsias continuam geralmente de fundamental importância para o estabelecimento de parte dos diagnósticos (**Tabela 91.1**).

91.3.2. Estudo de proteínas por técnica de imuno-histoquímica utilizando anticorpos específicos (em cortes histológicos de congelação):

- Diagnóstico da distrofia tipo Duchenne: análise da distrofina utilizando anticorpos de duas regiões diferentes da proteína, além de um anticorpo para comprovação da integridade sarcolemal.
- Diagnóstico das distrofias musculares de cinturas: análise das proteínas sarcoglicanas (α -, β -, γ - e δ -sarcoglicanas), em reação conjunta com anticorpo para a distrofina.
- Diagnóstico da distrofia de cinturas tipo 2B: análise da proteína disferlina em reação conjunta com anticorpo para a distrofina.
- Diagnóstico da distrofia de cinturas tipo 2G: análise da proteína teletonina em reação conjunta com anticorpo para a alfa-actinina (marcador de banda Z do sarcômero).
- Diagnóstico da distrofia muscular congênita associada à deficiência de merosina: análise da proteína merosina, utilizando anticorpos N- e C-terminal da α 2-laminina e um marcador de integridade sarcolemal.
- Diagnóstico da distrofia tipo Emery-Dreifuss: análise da proteína emerina, utilizando anticorpo monoclonal específico e um marcador de núcleos.

91.3.3. Estudo quantitativo e qualitativo de proteínas por técnica de *western blot*:

- Diagnóstico diferencial entre as distrofias tipo Duchenne, Becker e DMC: ausência ou alterações na proteína distrofina na DMD/BMD e normal da DMC.
- Diagnóstico da distrofia de cinturas tipo 2A: alterações na proteína calpaína 3.
- Diagnóstico da distrofia de cinturas tipo 2B: alterações na proteína disferlina.
- Diagnóstico das distrofias musculares congênitas: alterações de glicosilação da proteína alfa-distroglicana.

91.3.4. Quanto às proteínas que podem ser avaliadas, encontramos:

Distrofina:

- Deficiência total na DMD e parcial na BMD.
- Deficiência parcial secundária em algumas formas de sarcoglicanopatias.
- Padrão em mosaico em mulheres portadoras de alteração patogênica no gene *DMD* com manifestação clínica.

Sarcoglicanas:

- Deficiência total de α -, β -, γ - e δ -SG associada à deficiência parcial ou total das outras proteínas sarcoglicanas nas DMC2C, 2D, 2E e 2F.

Calpaína 3:

- Deficiência total ou parcial na DMC2A.
- Pode ocorrer deficiência secundária a outros defeitos primários, tais como na DMC2B, ou 2I.

Disferlina:

- Deficiência sugestiva de DMC2B.

Teletonina:

- Deficiência sugestiva de DMC2G.

α 2-laminina (merosina):

- Deficiência total, compatível com MDC1A.
- Deficiência parcial pode ser primária (MDC1A) ou secundária à MDC1C (forma associada a variantes deletórias no gene *FKRP*).

α -Distroglicana:

- Alterações de glicosilação secundárias a alterações patogênicas nos genes *POMT1*, *POMT2*, *FKTN*, *FKRP*, *LARGE1*, *POMGNT1* e *ISPD*.

Colágeno VI:

- Deficiência sugestiva de distrofia muscular congênita de Ullrich.

91.4. Técnicas de diagnóstico por meio de biologia molecular: avanços no século XXI

MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

Em 2002, foi descrito um novo método para a quantificação relativa de diferentes regiões genômicas simultaneamente. A técnica, denominada MLPA, consiste, de maneira simplificada, em uma PCR multiplex com capacidade para detectar variações no número de cópias (deleções ou duplicações) em até 50 diferentes sequências de DNA genômico. Este método baseia-se na hibridação de sondas específicas em regiões pré-definidas, seguida de uma etapa de ligação e posterior amplificação das sondas ligadas. Na ausência da região-alvo não ocorrerá hibridação das sondas específicas e conseqüentemente não haverá amplificação.

Esta é uma metodologia bastante robusta e está indicada em casos como a DMD/DMB, nos quais a maioria das alterações patogênicas são deleções ou duplicações de um ou mais exons do gene *DMD*.

Sequenciamento de nova geração:

Em 2011 foi aprovado pelo FDA (U. S. Food and Drug Administration) o uso do sequenciamento paralelo massivo (ou sequenciamento de nova geração - NGS) no diagnóstico clínico. Esta tecnologia, que começou a ser utilizada no início do século 21, permite o sequenciamento simultâneo de milhões de moléculas de DNA. Enquanto no sequenciamento de DNA pelo método Sanger, uma única região-alvo de DNA de um único indivíduo é amplificada por PCR (reação em cadeia da polimerase) e posteriormente sequenciada, no NGS é possível sequenciar diferentes indivíduos e diferentes regiões de DNA ao mesmo tempo.

Há diversas plataformas comercialmente disponíveis que fazem uso desta metodologia, cada qual com suas vantagens e desvantagens. Essencialmente, os processos utilizados pelas diversas plataformas são os mesmos: 1) fragmentação do DNA genômico (mecânica ou enzimaticamente); 2) ligação destes fragmentos a sequências sintéticas específicas de DNA (adaptadores), gerando uma biblioteca; 3) amplificação por PCR dos fragmentos da biblioteca para gerar múltiplas cópias, garantindo sinal suficiente para detecção durante a reação de sequenciamento; 4) sequenciamento propriamente dito. Seguem-se as etapas de processamento dos dados com *pipelines* específicos de bioinformática e posterior análise biológica e interpretação dos resultados.

O diagnóstico molecular de doenças clínica e geneticamente heterogêneas, como as miopatias, foi significativamente ampliado com o advento do NGS. A possibilidade de se investigar simultaneamente múltiplos exons ou múltiplos genes permitiu não apenas a redução

do número de testes realizados por paciente, como também o tempo gasto até a identificação da causa genética da doença, o que, conseqüentemente, diminui o custo final do diagnóstico.

Na prática clínica, é possível realizar, por NGS, a investigação de um único gene, de um painel com múltiplos genes, do exoma completo (WES, do inglês, Whole Exome Sequencing), do genoma completo (WGS, do inglês, Whole Genome Sequencing) e, de forma ainda incipiente, do RNA.

A escolha da estratégia a ser utilizada deve levar em consideração fatores como o padrão de herança da doença em questão, o número de indivíduos afetados na família, informações da literatura acerca dos genes já associados àquele fenótipo e a existência, em laboratórios comerciais, de painéis que contemplem os genes de interesse.

Apesar de o WES possibilitar o sequenciamento dos cerca de 20000 genes identificados até o momento, esta abordagem ainda apresenta alto custo e pode acarretar importantes implicações éticas no que concerne a achados incidentais, isto é, não associados à hipótese diagnóstica inicial. Ademais, considerando-se que somente uma fração dos genes humanos já foi associada a fenótipo, segundo o OMIM (5476 genes em fevereiro de 2019), esta estratégia resulta em elevado número de variantes com significado clínico muitas vezes, desconhecido.

Os painéis multigenes ainda são amplamente utilizados por permitirem uma análise mais direcionada a um preço, em geral, mais acessível. Atualmente, há diferentes painéis para grupos específicos de doenças e outros mais abrangentes, que compreendem quase a totalidade de genes reconhecidamente associados a diferentes quadros clínicos. Para doenças caracterizadas por ampla heterogeneidade clínica e com bases genéticas bastante conhecidas, como, por exemplo, as DMCs, o início da investigação molecular a partir de um painel multigenes oferece bom custo-benefício.

É necessário observar que o NGS é indicado para o diagnóstico de doenças cujo mecanismo associado envolva pequenas alterações de sequência. Embora grandes deleções, duplicações ou rearranjos cromossômicos complexos não sejam usualmente detectados pela técnica de NGS, novas ferramentas de bioinformática vêm sendo desenvolvidas e aplicadas na detecção de CNVs e, em muitas situações, já estão incorporadas ao diagnóstico molecular.

Doenças como a FSH, associada à contração da repetição D4Z4 na região 4q35 ou outras, associadas à expansão de repetições de nucleotídeos, como a DM1 (repetição CTG - gene DMPK), a DM2 (repetição CCTG - gene CNBP/ZNF9) e a distrofia muscular oculofaríngea (repetição GCG - gene PABPN1) atualmente devem ser investigadas por outras metodologias (tabela 91.1). Entretanto, com o desenvolvimento de novas plataformas que permitem a análise de moléculas únicas e de longos fragmentos (entre 10 e 15 kb), há

perspectiva de que até mesmo condições associadas a variação em regiões repetitivas passem a ser investigadas pela metodologia de sequenciamento.

91.4.1. Bancos de dados.

Diferentes consórcios nacionais e internacionais foram constituídos com o objetivo de estudar as variações genéticas humanas. Dados gerados a partir do sequenciamento de centenas de milhares de indivíduos têm sido disponibilizados para a comunidade científica. São importantes exemplos: *1000 Genomes Project*, *NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP)*, *Genome Aggregation Database (gnomAD)*, *Arquivo Brasileiro Online de Mutações (ABraOM)* e *Brazilian Initiative on Precision Medicine (BIPMed)*.

Amplamente utilizadas nos *pipelines* de bioinformática, as informações de frequência populacional podem auxiliar na análise e interpretação dos resultados obtidos por NGS. Apesar de serem uma poderosa ferramenta, as informações destes repositórios devem ser utilizadas com cautela, uma vez que muitos deles contemplam coortes de estudo de doenças específicas e podem incluir afetados por doenças complexas ou por condições de início tardio.

Além dos bancos populacionais, bases de dados de doenças específicas estão disponíveis para consulta. Em muitas delas, as variantes depositadas já foram revisadas por um grupo de especialistas, o que torna mais acuradas a avaliação e interpretação da patogenicidade das variantes identificadas em um paciente. Alguns exemplos são: *The Human Gene Mutation Database (HGMD)*, *ClinVar* e *Leiden Open Variation Database (LOVD)*.

91.5. Aconselhamento genético

O aconselhamento genético (AG) tem por objetivo fornecer informações detalhadas sobre determinada condição de etiologia genética. O AG é direcionado principalmente para indivíduos afetados por doenças genéticas e seus familiares.

As etapas do aconselhamento genético são:

- Levantamento de histórico pessoal e familiar, avaliação dos exames clínicos e genéticos já realizados e indicação de outros exames, se necessário.

- Análise dos dados, visando a diagnosticar, a confirmar ou a excluir uma condição genética conhecida.

- Fornecimento de informações acerca da natureza da doença genética identificada e de suas implicações para a saúde física ou mental do indivíduo.

- Esclarecimento sobre o mecanismo de herança e cálculo de risco de ocorrência ou recorrência em irmãos ou filhos de um indivíduo.

- Identificação de familiares que não apresentam sintomas, mas que são portadores de alteração genética e determinação dos riscos desses familiares desenvolverem a doença ou transmiti-la para seus filhos.

Uma vez que a definição precisa do tipo de miopatia é alcançada, o aconselhamento genético segue os princípios básicos, baseando-se na atribuição de risco de recorrência de acordo com o padrão de herança:

Nas doenças de herança autossômica recessiva, cada um dos pais é tipicamente portador heterozigoto de uma das alterações patogênicas detectadas no afetado. Quando há consanguinidade, ambos os pais geralmente são portadores da mesma variante deletéria, herdada de um ancestral comum. Portanto, para os pais de uma criança com comprovada miopatia autossômica recessiva, há um risco de recorrência de 25% de futura criança do casal ser afetada pela mesma doença. Irmãos e irmãs normais da pessoa afetada têm chance de 2/3 de serem portadores da variante em questão, assim como outros membros da família.

No entanto, como geralmente estas alterações são muito raras, a probabilidade de um portador ter um filho afetado, nascido de união com cônjuge não consanguíneo, é baixa, sendo o risco de recorrência considerado muito pequeno. Os riscos de ter outra criança afetada aumentam dentro das populações com mutações fundadoras e onde há consanguinidade. Nesses casos, é necessário um aconselhamento genético cuidadoso, para explicação dos riscos de recorrência e ocorrência.

Nas doenças de herança autossômica dominante pode ser mais difícil de se determinar o diagnóstico definitivo, quando este é baseado no estudo da proteína muscular envolvida. Isso porque, pelas metodologias atuais, geralmente não é possível detectar alterações quantitativas

discretas da proteína em estudo. Por outro lado, quando a família avaliada apresenta vários pacientes afetados, com uma transmissão autossômica dominante óbvia, o aconselhamento genético é mais claro. A definição da mutação causal irá permitir a realização de testes preditivos, e um pai afetado, por exemplo, tem risco de 50% de transmitir a variante deletéria para a sua prole.

Mas nem sempre o aconselhamento genético é simples. Condições com padrão de herança dominante e penetrância incompleta ou doenças de início tardio podem complicar a identificação dos indivíduos portadores de mutação patogênica na família. Além disso, em diversas doenças dominantes detectam-se alterações na sequência de DNA, muitas vezes exclusivas da família, de modo que a determinação de sua patogenicidade pode ser complexa. Orientações sobre prognóstico também podem ser imprecisas nesses casos, devido à grande variabilidade clínica observada nas diferentes formas de miopatias dominantes.

A realização de exame molecular para diagnóstico pré-clínico de pacientes com doenças dominantes também deve ser avaliado com muito cuidado. O diagnóstico pré-clínico geralmente é recomendado quando é possível oferecer recursos de prevenção clínica para as complicações decorrentes da doença ou se essa informação é importante para decisões reprodutivas. Nesses casos, o paciente deve ser apoiado psicologicamente e clinicamente. A identificação da mutação causal em uma dada família permite também oferecer diagnóstico pré-natal, bem como discutir opções para o diagnóstico pré-implantacional, conforme a disponibilidade local.

Nas doenças com padrão de herança ligada ao cromossomo X, como a DMD/DMB, a alteração patogênica responsável pode ser herdada de mães portadoras, majoritariamente assintomáticas. A mulher portadora tem, em cada gestação, risco de 25% de ter um filho do sexo masculino afetado e 25% de ter uma filha portadora da mesma alteração. Além da mãe e irmãs do paciente, outras mulheres da família podem ser portadoras assintomáticas e podem realizar o exame molecular, se assim desejarem. O diagnóstico pré-natal permite confirmar, em casos de fetos masculinos, se eles herdaram a alteração.

Sites de interesse:

<http://www.musclegenetable.fr/>

Tabela de Classificação das doenças neuromusculares

<http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/>

Detalhes completos de cada gene

<http://www.dmd.nl/>

Leiden Muscular Dystrophy pages - Center for Human and Clinical Genetics – Banco atualizado de mutações de doenças neuromusculares

<http://neuromuscular.wustl.edu/>

NEUROMUSCULAR DISEASE CENTER, Washington University, St. Louis, MO USA.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>

OMIM - Online Mendelian inheritance in man – Banco de dados de doenças genéticas

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/GeneTests/?db=GeneTests>

Testes genéticos - revisões

<http://www.enmc.org/>

European Neuromuscular Center

<http://laboratorio.genoma.ib.usp.br/>

Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco – testes realizados em São Paulo

<http://www.internationalgenome.org/>

<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>

<https://gnomad.broadinstitute.org/>

<http://abraom.ib.usp.br/>

<https://bipmed.org/>

<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>

<http://www.lovd.nl/3.0/home>

Referências Bibliográficas

- Anderson, L.V., Davison, K., Moss, J.A., Young, C., Cullen, M.J., Walsh, J., Johnson, M.A., Bashir, R., Britton, S., Keers, S., Argov, Z., Mahjneh, I., Fougerousse, F., Beckmann, J.S., Bushby, K.M. (1999). Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Hum.Mol. Genet.* 8: 855-861.
- Anderson, L.V.B. (2001). Multiplex western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. In: Bushby KMD & Anderson LVB (Editors), *Muscular Dystrophy: Methods and Protocols*. Chapter 22, (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series). Humana Press, Totowa, New Jersey, 369-386.
- Bakker, E. and Van Ommen, G.B. (1998). Duchenne and Becker muscular dystrophy (DMD and BMD). In: Emery AEH (Editor), *Neuromuscular Disorders: Clinical and Molecular Genetics*. John Wiley & Sons, New York, 59-85.
- Barresi R., Michele D.E., Kanagawa M., Harper H.A., Dovico S.A., Satz J.S., Moore S.A., Zhang W., Schachter H., Dumanski J.P., Cohn R.D., Nishino I., Campbell K.P. (2004). LARGE can functionally bypass alpha- dystroglycan glycosylation defects in distinct congenital muscular dystrophies. *Nat. Med.* 10, 696-703.
- Bashir, R., Britton, S., Strachan, T., Keers, S., Vafiadaki, E., Lako, M., Richard, I., Marchand, S., Bourg, N., Argov, Z., Sadeh, M., Mahjneh, I., Marconi, G., Passos-Bueno, M.R., Moreira, E.S., Zatz, M., Beckmann, J.S., Bushby, K. (1998). A gene related to the *C. elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2B (LGMD2B). *Nat. Genet.* 20: 37-42.
- Bione, S., Maestrini, E., Rivella, S., Manzini, M., Regis, S., Romeo, G., Toniolo, D. (1994). Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 8: 323-327.
- Bitoun, M, Maugenre, S, Jeannet, PY, et al. Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nat Genet.* 2005; 37:1207-1209.
- Bonne, G., Di Barletta, M.R., Varnous, S., Becane, H.M., Hammouda, E.H., Merlini, L., Muntoni, F., Greenberg, C.R., Gary, F., Urtizbera, J.A., Duboc, D., Fardeau, M.,

- Toniolo, D., Schwartz, K. (1999). Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 21: 285-288.
- Bönnemann, C.G. (1999). Limb-girdle muscular dystrophies: an overview. *J. Child. Neurol.* 14: 31-33.
- Brandom B. W. (2006), Genetics of Malignant Hyperthermia. *Scient. World J.* 6, 1722-1730.
- Brockington, M., Blake, D.J., Prandini, P., Brown, S.C., Torelli, S., Benson, M.A., Ponting, C.P., Estournet, B., Romero, N.B., Mercuri, E., Voit, T., Sewry, C.A., Guicheney, P., Muntoni, F. (2001a). Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) cause a form of congenital muscular dystrophy with secondary laminin alpha2 deficiency and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Am. J. Hum. Genet.* 69: 1198-1209.
- Brockington, M., Yuva, Y., Prandini, P., Brown, S.C., Torelli, S., Benson, M.A., Herrmann, R., Anderson, L.V., Bashir, R., Burgunder, J.M., Fallet, S., Romero, N., Fardeau, M., Straub, V., Storey, G., Pollitt, C., Richard, I., Sewry, C.A., Bushby, K., Voit, T., Blake, D.J., Muntoni, F. (2001b). Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Hum. Mol. Genet.* 10: 2851-2859.
- Bushby KM, Beckmann JS. The limb-girdle muscular dystrophies--proposal for a new nomenclature. *Neuromuscul Disord* 1995;5:337-43. Laing, NG and Wallgren-Pettersson, C. 161st ENMC International Workshop on nemaline myopathy and related disorders, Newcastle upon Tyne, 2008. *Neuromuscul Disord.* 2009; 19:300-305.
- Bushby, K. and Beckmann, J. (2002). The 105th ENMC workshop - pathogenesis in the non-sarcoglycan limb-girdle muscular dystrophies. *Neurom. Disord.* 43(1):80-90
- Bushby, K.M.D. (1999). The limb-girdle muscular dystrophies - multiple genes, multiple mechanisms. *Hum. Mol. Genet.* 8: 1875-1882.
- Campbell, K.P. and Kahl, S.D. (1989). Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature*, 338: 259-262.

- Claeys, KG, Maisonobe, T, Bohm, J, et al. Phenotype of a patient with recessive centronuclear myopathy and a novel BIN1 mutation. *Neurology*. 2010; 74:519-521.
- Clarke, NF, Kolski, H, Dye, DE, et al. Mutations in TPM3 are a common cause of congenital fiber type disproportion. *Ann Neurol*. 2008; 63:329-337.
- Clarke, NF. Skeletal muscle disease due to mutations in tropomyosin, troponin and cofilin. *Adv Exp Med Biol*. 2008; 642:40-54.
- Cohn, R.D. and Campbell, K.P. (2000). Molecular basis of muscular dystrophies. *Mus. Nerv.* 23: 1456-1471.
- Dubowitz, V and Sewry, CA. *Muscle Biopsy: A Practical Approach*. 3rd ed.: Elsevier, 2007.
- Durbeej M. and Campbell K.P. (2002). Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 349-361.
- Efthymiou, S., Manole, A., Houlden, H. (2016). Next-generation sequencing in neuromuscular diseases. *Curr Opin Neurol*. 29:527-536.
- Ervasti E. and Campbell K.P. (1993), A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J. Cell Biol.* 122, 809-823.
- Ervasti, J.M., Ohlendieck, K., Kahl, S.D., Gaver, M.G., Campbell, K.P. (1990). Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature*, 345: 315-319.
- 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 Disord* 1996;6(6):447-53.
- Ferreiro, A, Quijano-Roy, S, Pichereau, C, et al. Mutations of the Selenoprotein N Gene, Which Is Implicated in Rigid Spine Muscular Dystrophy, Cause the Classical Phenotype of Multimimicore Disease: Reassessing the Nosology of Early-Onset Myopathies. *Am J Hum Genet*. 2002; 71.

- Fujii J., Otsu K., Zorzato F., Leon S. de, Khanna V.K., Weiler J.E., O'Brien P.J., and MacLennan D.H. (1991). Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*, 253, 448-451.
- Gouveia, T.L.F., Paim, J.F.O., Zatz, M., Vainzof, M. (2003). Multiplex analysis for mutations in sarcoglycan genes. *Neurom. Disord.* 13(7-8) 648.
- Gurgel-Giannetti, J., Bang, M.L., Reed, U., Marie, S., Zatz, M., Labeit, S., Vainzof M. (2002). Lack of the C-terminal domain of nebulin in a patient with nemaline myopathy. *Musc. Nerv.* 25(5):747-52.
- Gurgel-Giannetti, J., Reed, U., Bang, M.L., Pelin, K., Donner, K., Marie, S., Carvalho, M., Fireman, M.A., Zanoteli, E., Oliveira, A.S., Zatz, M., Wallgren-Pettersson, C., Labeit, S., Vainzof, M. (2001). Nebulin expression in Nemaline myopathy. *Neurom. Disord.* 11: 154-162.
- Hack, A.A., Groh, M.E., McNally, E.M. (2000). Sarcoglycans in muscular dystrophy. *Microsc. Res. Tech.* 48: 167-180.
- Haravuori, H., Vihola, A., Straub, V., Auranen, M., Richard, I., Marchand, S., Voit, T., Labeit, S., Somer, H., Peltonen, L., Beckmann, J.S., Udd, B. (2001). Secondary calpain3 deficiency in 2q-linked muscular dystrophy: titin is the candidate gene. *Neurology*, 56: 869-877.
- Hoffman E.P., Brown R.H. Jr, Kunkel L.M. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51,919-928.
- Hoffman, E.P., Brown, R.H., Kunkel, L.M. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, 51: 919-928.
- Jungbluth, H, Zhou, H, Sewry, CA, et al. Centronuclear myopathy due to a de novo dominant mutation in the skeletal muscle ryanodine receptor (RYR1) gene. *Neuromuscul Disord.* 2007; 17:338-345.

- Koenig, M., Monaco, A.P., Kunkel, L.M. (1988). The complete sequence of dystrophin predicts rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*, 53: 219-228.
- Liu, J., Aoki, M., Illa, I., Wu, C., Fardeau, M., Angelini, C., Serrano, C., Urtizberea, J.A., Hentati, F., Hamida, M.B., Bohlega, S., Culper, E.J., Amato, A.A., Bossie, K., Oeltjen, J., Bejaoui, K., McKenna-Yasek, D., Hosler, B.A., Schurr, E., Arahata, K., de Jong, P.J., Brown, R.H. Jr. (1998). Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 20: 31-36.
- Mardis E. R. (2011) A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature.*;470:198-203
- Matsuda C, Aoki M, Hayashi Y, Arahata K, Brown RH. Dysferlin is a surface membrane-associated protein that is absent in Miyoshi myopathy. *Neurology* 1999;53:1119-22.
- McNally, E.M., Moreira, E.S., Duggan, D.J., Bonnemann, C.G., Lisanti, M.P., Lidov, H.G., Vainzof, M., Passos-Bueno, M.R., Hoffman, E.P., Zatz, M., Kunkel, L.M. (1998). Caveolin-3 in muscular dystrophy. *Hum. Molec. Genet.* 7: 871-878.
- Minetti, C., Sotgia, F., Bruno, C., Scartezzini, P., Broda, P., Bado, M., Masetti, E., Mazzocco, M., Egeo, A., Donati, M.A., Volonte, D., Galbiati, F., Cordone, G., Bricarelli, F.D., Lisanti, M.P., Zara, F. (1998). Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat. Genet.*18: 365-368.
- Moreira, E.S., Vainzof, M., Suzuki, O.T., Pavanello, R.C.M., Zatz, M., Passos-Bueno, M.R. (2002). Genotype/phenotype correlations in 35 Brazilian families with sarcoglycanopathies, including the description of three novel mutations. *J. Med. Genet.* 40(2):E12.
- Moreira, E.S., Wiltshire, T.J., Faulkner, G., Nilforoushan, A., Vainzof, M., Suzuki, O.T., Valle, G., Reeves, R., Zatz, M., Passos-Bueno, M.R., Jenne, D.E. (2000). Limb-girdle muscular dystrophy type 2G (LGMD2G) is caused by mutations in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin. *Nat. Genet.* 24: 163-166.
- Muntoni F., Brockington M., Torelli S., Brown S.C. (2004). Defective glycosylation in congenital muscular dystrophies. *Curr. Opin. Neurol.* 17, 205-209.

- Muntoni, F., Brockington, M., Blake, D.J., Torelli, S., Brow, S.C. (2002). Defective glycosylation in muscular dystrophy. *Lancet*. 360(9343):419-421.
- Muntoni, F., Sewry, C., Wilson, L., Angelini, C., Trevisan, C.P., Brambati, B., Dubowitz, V. (1995). Prenatal diagnosis in congenital muscular dystrophy. *Lancet*. 345:591.
- Passos-Bueno MR, Vainzof M, Moreira ES, Zatz M. The seven autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy (LGMD): from LGMD2A to LGMD2G. *Am J Med Genet* 1999;82:392-8.
- Paula F, Vainzof M, Moreira ES, et al. Novel dysferlin mutations in Brazilian LGMD2B patients. *Am J Hum Genet* 2001;69(4):639.
- Paula, F., Vainzof, M., Passos-Bueno, M.R., Pavanello, R.C.M., Matioli, S.R., Anderson, L.V.B., Nigro, V., Zatz, M. (2002). Clinical variability in calpainopathy: What makes the difference? *Eur. J. Hum. Genet.* 10(2):825-32.
- Paula, F., Vieira, N., Starling, A., Yamamoto, L.U., Lima, B., Pavanello, R.C.M., Vainzof, M., Nigro, V., Zatz, M. (2003). Asymptomatic carriers for homozygous novel mutations in the FKRP gene: the other end of the spectrum. *Eur. J. Hum. Genet.*, 11 (12): 923-930.
- Piluso G, Manuela Dionisi, Francesca Del Vecchio Blanco, Annalaura Torella, Stefania Aurino, Marco Savarese, Teresa Giugliano, Enrico Bertini, Alessandra Terracciano, Mariz Vainzof, Chiara Criscuolo, Alessandro Filla, Giuseppe De Michele, Luisa Politano, Carlo Casali, Filippo Maria Santorelli and Vincenzo Nigro. Motor Chip: a comparative genomic hybridization microarray for copy-number mutations in 245 neuromuscular disorders. *Clin Chem*. 2011 Nov;57(11):1584-96. Epub 2011 Sep 6.
- Richards I, Roudaut C, Saenz A, et al. Calpainopathy – a survey of mutations and polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1999; 64:1524-1540.
- Schouten J.P. et al. (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*;30:e57
- Selcen, D., Engel, A.G. (2004). Mutations in myotilin cause myofibrillar myopathy. *Neurology*, 62:1248-9.

Sewry, CA. Pathological defects in congenital myopathies. *J Muscle Res Cell Motil.* 2008; 29:231-238.

Starling, A., Kok, R., Passos-Bueno, M.R., Vainzof, M., Zatz, M. (2004), The 7th form of autosomal dominant muscular dystrophy (LGMD1G) maps to chromosome 4 p21. *Eur. J. Hum. Genet.* In press

Straub V., Campbell K.P. (1997). Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Curr. Opin. Neurol.* 10,168-175.

Tome F.M., Evangelista T., Leclerc A., Sunada Y., Manole E., Estournet B., Barois A., Campbell K.P., Fardeau M. (1994). Congenital muscular dystrophy with merosin deficiency. *C. R. Acad. Sci. III.* 317,351-357.

Vainzof M. Estudos Moleculares e Protéicos nas miopatias congênitas e Distrofias Musculares Progressivas – São Paulo, 2006. Tese (Livre-Docência) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Centro de Estudos do Genoma Humano. 2608.

Vainzof M. and Zatz M. (2007). Muscular Dystrophies and Protein Mutations, in: Uversky VN and Fink AL. Protein Misfolding, Aggregation, and Conformational Diseases. Part B: Molecular Mechanisms of Conformational Diseases. Serie Protein Reviews, Ed. Zouhair Atassi, Volume 6, Springer Sciences and Business Media LLC, USA. Pp 391-403, 2007

Vainzof, M. (2001). Congenital myopathies. In: Carakushansky G (Editor), *Doenças Genéticas em Pediatria.* Guanabara Koogan S/A, Rio de Janeiro, Brazil.

Vainzof, M., Anderson, L.V.B., Moreira, E.S., Paula, F., Pavanello, R.C.M., Passos-Bueno, M.R., Zatz, M. (2000). Calpain 3: Characterization of the primary defect in LGMD2A and analysis of its secondary effect in other LGMDs. *Neurology*, 54: 436.

Vainzof, M., Moreira, E.S., Canovas, M., Suzuki, O.T., Pavanello, R.C.M., Costa, C.S., Passos-Bueno, M.R., Zatz, M. (2000). Partial α -sarcoglycan deficiency associated with the retention of the SG complex in a LGMD2D family. *Mus, Nerv.* 23: 984-988.

- Vainzof, M., Moreira, E.S., Suzuki, O.T., Faulkner, G., Valle, G., Beggs, A.H., Carpen, O., Ribeiro, A.F., Zanoteli, E., Gurgel-Gianneti, J., Tsanaclis, A.M., Silva, H.C., Passos-Bueno, M.R., Zatz, M. (2002). Telethonin protein expression in neuromuscular disorders. ***BBA**. Genetic Basis of Diseases*, 1588: 33-40.
- Vainzof, M., Passos-Bueno, M.R., Moreira, E.S., Pavanello, R.C.M., Marie, S.K., Andreson, L.V.B., Bonnemann, C.G., McNally, E.M., Nigro, V., Kunkel, L.M., Zatz, M. (1996). The sarcoglycan complex in the six autosomal recessive limb-girdle (AR-LGMD) muscular dystrophies. *Hum. Mol. Genet.* 5: 1963-1969.
- Vainzof, M., Passos-Bueno, M.R., Pavanello, R.C.M., Marie, S.K., Zatz, M. (1999). Sarcoglycanopathy is responsible for 68% of severe autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy. *J. Neurol. Sci.* 164: 44-49.
- Vainzof, M., Passos-Bueno, M.R., Pavanello, R.C.M., Zatz, M. (1995). Is dystrophin always altered in Becker muscular dystrophy patients? *J. Neurol. Sci.* 131: 99-104.
- Vainzof, M., Passos-Bueno, M.R., Rapaport, D., Pavanello, R.C.M., Bulman, D.E., Zatz, M. (1992). Additional dystrophin fragment in Becker muscular dystrophy patients: Correlation with the pattern of DNA deletions. *Am. J. Med. Genet.* 44: 382-384
- Vainzof, M., Passos-Bueno, M.R., Zatz, M. (2003). Immunological methods for the analysis of protein expression in neuromuscular diseases. In: Potter, NT: *Methods in Molecular Medicine-Neurogenetics: Methods and Protocols*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp 355-378,2003.
- Vainzof, M., Paula, F., Tsanaclis, A.M., Zatz, M. (2003). The effect of calpain 3 deficiency in the pattern of muscle degeneration in the earliest stages of LGMD2A. *J. Clinical. Patho.*, 56:624-626 .
- Vainzof, M., Pavanello, R.C.M., Anderson, L.V.B., Moreira, E.S., Passos-Bueno, M.R., Zatz, M. (2001). Dysferlin analysis in autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies (AR-LGMD). *J. Mol. Neurosc.* 17: 71-80.

- Vainzof, M., Pavanello, R.C.M., Pavanello, I., Passos-Bueno, M.R., Rapaport, D., Zatz, M. (1990). Dystrophin immunostaining in muscles from patients with different types of muscular dystrophy: A Brazilian study. *J. Neurol. Sci.* 98: 221-233.
- Vainzof, M., Reed, U.C., Schwartzman, J.S., Pavanello, R.C.M., Passos-Bueno, M.R., Zatz, M. (1995). Deficiency of merosin (Laminin M or $\alpha 2$) in congenital muscular dystrophy associated with cerebral white matter alterations. *Neuropediatrics*, 26: 293-297.
- Vainzof, M., Zatz, M. (2003). Protein defects in Neuromuscular disorders. *Br. J. Med. Biol. Res.* 36(5):543-555.
- Vainzof, M., Zubrzycka-Gaarn, E.E., Rapaport, D., Passos-Bueno, M.R., Pavanello, I., Zatz, M. (1991). Immunofluorescence dystrophin study in Duchenne dystrophy through the concomitant use of two antibodies directed against the carboxy-terminal and the amino-terminal region of the protein. *J. Neurol. Sci.* 101: 141-147.
- Volk, A.E., Kubisch, C. (2017). The rapid evolution of molecular genetic diagnostics in neuromuscular diseases. *Curr Opin Neurol.* 30:523-528.
- Yamamoto, L.u., Canovas, M., Pavanello, R.C.M., Lima, B.L., Paula, F., Vieira, N.F., Zatz, M., Vainzof, M. (2003). Muscle protein alterations in patients with mutations in the Fukutin Related Protein gene. *Am. J. Hum Gen.*, 73(5): 556.
- Yamamoto, L.U., Gollop, T.R., Naccache, N.F., Pavanello, R.C.M., Zanotelli, E., Zatz, M., Vainzof, M. (2004). Protein and DNA analysis for the pre natal diagnosis of α -2-laminin deficient congenital muscular dystrophy. *Diag. Molec. Pathol.* 13(3): 167-171.
- Yoshida M. and Ozawa E. (1990) . Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma. *J. Biochem.* 108, 748-752.
- Zatz, M., Starling, A.S., Paula, F., Vainzof, M. (2003). The ten autosomal recessive Limb-Girdle Muscular Dystrophies. *Neurom. Disord.* 13 (7-8):532-44.
- Zatz, M., Vainzof, M., and Passos-Bueno, M.R. (2000). Limb-girdle muscular dystrophy: one gene with different phenotypes, one phenotyep with different genes. *Curr. Opp. Neurol.* 13: 511-517.

Tabela 91.1. Resumo da aplicação das técnicas moleculares para diagnóstico

Doença	Gene (n° exons)	Teste em DNA genômico	Estudo em biópsia muscular
Distrofia Muscular de Duchenne/Becker	<i>DMD</i> (79 exons)	NGS e MLPA	Ausência/deficiência de distrofina por imunohistoquímica e western blot, utilizando anticorpos para pelo menos duas regiões da proteína
Distrofia Muscular Emery-Dreifuss	<i>EMD</i> (6 exons)	NGS	Ausência/deficiência de emerina na membrana nuclear, por imunohistoquímica
Distrofias musculares das cinturas (DMC)			
DMC2A	<i>CAPN3</i> (24 exons)	NGS	Deficiência de calpaína 3 por estudo de <i>western blot</i>
DMC2B	<i>DYSF</i> (55 exons)	NGS	Deficiência de disferlina por estudo de <i>western blot</i>
Sarcoglicanopatias		NGS	Deficiência das proteínas sarcoglicanas na biópsia muscular
DMC2C	<i>SGCG</i> (8 exons)		
DMC2D	<i>SGCA</i> (10 exons)		
DMC2E	<i>SGCB</i> (6 exons)		
DMC2F	<i>SGCD</i> (9 exons)		
DMC2G	<i>TCAP</i> (2 exons)	NGS	Deficiência da proteína teletonina por estudo imunohistoquímico e western blot

DMC2I	<i>FKRP</i> (1 exon)	NGS	Deficiência parcial de merosina por estudo imuno-histoquímico
Distrofia de Emery-Dreifuss e de Cinturas 1B	<i>LMNA</i> (12 exons)	NGS	
Distrofia Muscular congênita 1A	<i>LAMA2</i> (64 exons)	NGS e MLPA	Deficiência de merosina por imuno-histoquímica
Distrofia de Steinert	<i>DMPK</i>	Análise de repetições CTG (TP-PCR)	
DM Tipo 1 facioescapuloumera		Análise de repetições D4Z4 na região 4q35 por <i>southern blot</i>	

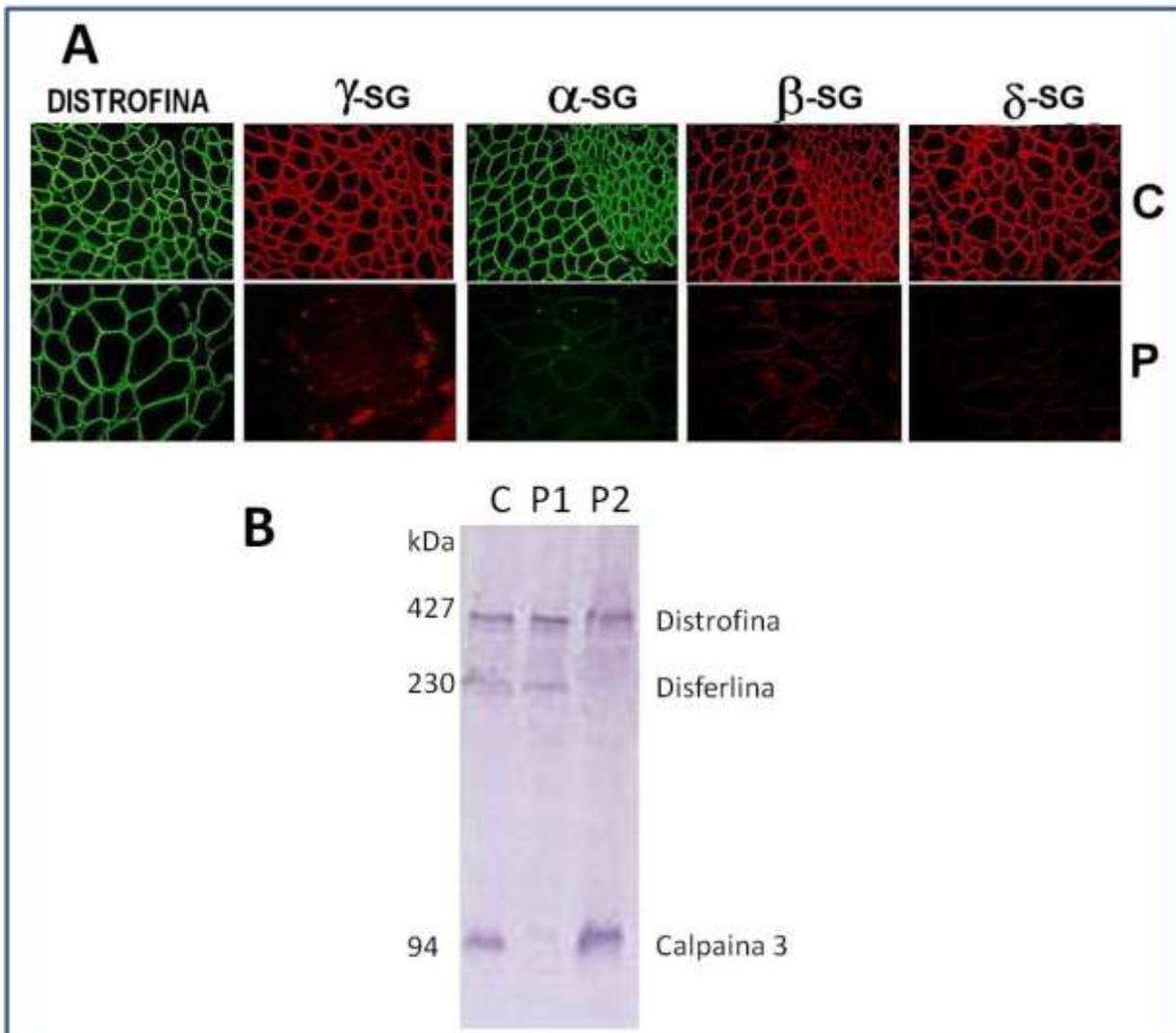


Figura 91.1. Análise de proteínas por imuno-histoquímica (A) e *western blot* (B). Em A: deficiência das quatro proteínas sarcoglicanas em pacientes com suspeita de sarcoglicanopatia. A classificação quanto ao tipo de sarcoglicanopatia pode ser feita por teste molecular nos quatro genes. Em B: teste multiplex para as proteínas distrofina (427 kDa), disferlina (230 kDa) e banda superior da calpaína 3 (94 kDa) em dois pacientes com suspeita de distrofia de cinturas. C = controle normal, P1, paciente apresentando deficiência de calpaína 3, compatível com DMC2A, e P2, com deficiência de disferlina, compatível com o diagnóstico de DMC2B.

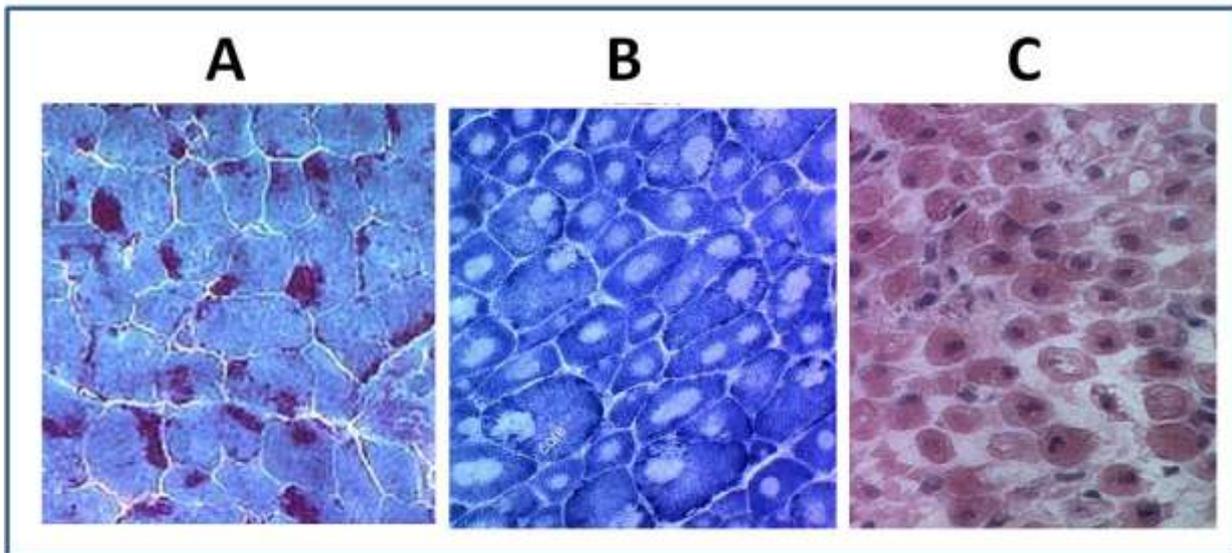


Figura 91.2. Miopatias congênitas estruturais: alterações morfológicas observadas nas fibras musculares: A- Corpos nemalínicos, visualizados na coloração de Gomori modificado, característicos de miopatia nemalínica; B- Presença de “cores” na reação de NADH, característicos da miopatia de central core; C- Presença de núcleos grandes e centrais, característicos de miopatia miotubular.