

Diagnóstico molecular da distrofia muscular Duchenne

Molecular diagnosis of Duchenne muscular dystrophy

Laís Gomes Sarlo¹, Antonio Francisco Alves da Silva^{1,2} Enrique Medina-Acosta¹

¹ Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

² Hospital Escola Álvaro Alvim.

Resumo

A distrofia muscular Duchenne (DMD) é a doença genética com padrão de herança recessiva ligada ao sexo mais frequente em humanos, afetando 1 a cada 3500 meninos nascidos vivos. É causada por mutações no gene DMD, localizado na região cromossômica Xp21.2-Xp21.1, que codifica a distrofina, uma proteína do citoesqueleto encontrada na superfície interna das fibras musculares. As mutações patogênicas são de natureza heterogênea e um grande número tem sido descrito. Aproximadamente 2/3 dos casos são hereditários e 1/3 esporâdicos causados por mutações de novo. O diagnóstico molecular direto da etiologia da doença envolve o sequenciamento dos 79 exons do gene DMD para determinação de mutações em homens afetados. Este método é laborioso e dispendioso, o que limita a sua ampla aplicação, em particular no rastreio de mulheres portadoras. A identificação de portadoras pode ser feita de maneira indireta mediante análise de ligação de microssatélites pelo teste de DNA. Atualmente são conhecidos só microssatélites do tipo dinucleotídeo em 29 ítrons; 15 desses são utilizados e exibem taxas de heterozigose variando de 40 a 84% em diversas populações. O principal problema da genotipagem de microssatélites dinucleotídeos é a ocorrência de produtos stutter, que diferem em tamanho por múltiplos da unidade de

Abstract

Duchenne muscular dystrophy is the most frequent recessive X-linked genetic disease in humans, affecting 1 in 3500 born males. It is caused by mutations in the DMD gene, localized in the Xp21.2-Xp21.1 chromosomal region, which codes for dystrophin, a cytoskeleton protein found in the inner surface of muscle fibers. Pathogenic mutations are heterogeneous in nature and a considerably large number has been described. Approximately 2/3 of index cases are hereditary and the remaining 1/3 is due to de novo mutations. Direct molecular diagnosis of the etiology of the disease involves sequencing of the 79 exons for determination of mutations in affected males. This method is laborious and expensive, limiting its broad application, particularly in tracking mutation in women carriers. The identification of mutation carriers can be done indirectly by linkage analysis of microsatellites. Currently only dinucleotide microsatellites are known in 29 introns; 15 of which are used and they exhibit heterozygosity rates varying from 40 to 84% in various populations. The main drawback of genotyping dinucleotide microsatellites is the occurrence of stutter products, which differ in size by multiples of the repeat unit from the true allele. There is a need to invest in development of tetranucleotide and pentanucleotide microsatellites that result in significant reduction of stutter products and

Autor para correspondência: Enrique Medina-Acosta, Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular (NUDIM), sede Hospital Escola Álvaro Alvim, Rua Barão da Lagoa Dourada 409, Prédio novo, 1º andar, Pelinca, Campos dos Goytacazes CEP 28035-010, Tel/Fax: (022) 2726 6758; E-mail: quique@uenf.br

repetição do alelo verdadeiro. Há necessidade de investir no desenvolvimento de microssatélites tetranucleotídeo e pentanucleotídeo que resultam em significativa redução da amplificação de produtos stutter e que possibilitam uma melhor designação alélica, diminuindo as possibilidades de erro de diagnóstico.

Palavras-chave: análise de ligação; diagnóstico molecular indireto; distrofia muscular Duchenne; microssatélites; marcadores polimórficos; sequenciamento.

Introdução

A distrofia muscular Duchenne (DMD, [OMIM 310200]) é a forma mais severa de distrofia muscular e ocorre em 1 a cada 3500 nascidos vivos do sexo masculino^{1,2}. DMD é uma desordem recessiva, fatal, ligada ao cromossomo X. Ela é causada por mutações patogênicas no gene DMD, o maior gene descrito no genoma humano (2,4 Mb) localizado na região Xp21.2-Xp21.1, que codifica a distrofina. O gene DMD é complexo; contém 79 exons, pelo menos sete diferentes promotores tecido-específicos e dois sítios de poliadenilação. Todavia, o RNA distrofina é processado diferencialmente produzindo uma variedade de transcritos, que codifica um conjunto de isoformas da proteína. A distrofina traduzida do transcrito maior é uma proteína do citoesqueleto, em forma de bastonete, encontrada na superfície interna das fibras musculares. Ela constitui aproximadamente 0,002% do total de proteínas presentes no músculo estriado e forma parte do complexo glicoproteína-distrofina que constitui a ponte entre o citoesqueleto interno (actina F) e a matriz extracelular³.

A distrofia muscular de Becker (DMB), alélica a DMD, é cerca de 10 vezes mais rara; porém, é fenotipicamente mais branda⁴. Em termos gerais, nos pacientes com DMB a distrofina é de tamanho reduzido como resultado de deleção no mesmo padrão de leitura ou seu nível de expressão é

que enables accurate allele designation, diminishing the possibilities of error of diagnosis.

Keywords: Duchenne muscular dystrophy; indirect molecular diagnosis; linkage analysis; microsatellites; polymorphic markers; sequencing

reduzido, enquanto os pacientes com DMD são portadores de mutações que causam terminação prematura da tradução (mutações sem sentido ou mutações de alteração do padrão de leitura). A principal diferença entre DMD e DMB reside na idade de início e na velocidade de progressão da doença. A idade média de diagnóstico confirmado de DMD é de 4,6 anos, quando a criança começa a apresentar um modo característico de se levantar; com 10 anos muitos já usam cadeira de rodas; disfunção no músculo liso no trato digestivo ou urinário ocorre em 21% e 6% dos pacientes respectivamente, com aproximadamente 15 anos⁵. Com esse cenário, a morte se dá por insuficiência respiratória, broncopneumonia ou, como o miocárdio também é afetado por insuficiência cardíaca.

O comprometimento muscular dos acometidos é simétrico e inicia-se pelos membros inferiores e quadris, e, posteriormente, atinge os membros superiores. Ocorre uma acentuação da lordose lombar e marcha anserina. Contraturas e retracções dos tendões levam alguns pacientes a andar na ponta dos pés⁵. A regeneração de fibras se torna menos frequente com a progressão da doença e são eventualmente substituídas por tecido adiposo e conectivo, colaborando para um músculo pseudo-hipertrófico, pois há uma dilatação anormal da panturrilha aos três anos, em média. Aproximadamente 30-50% dos pacientes com DMD apresentam

algum tipo de retardo mental⁶. Já na DMB, os sintomas iniciam-se em geral na segunda década, os afetados andam ainda após os 16 anos. A velocidade de progressão é extremamente variável⁷.

A confirmação do diagnóstico da DMD é mediante testes moleculares para a ausência de distrofina na biopsia muscular ou a presença de mutações (principalmente deleções) no gene DMD⁷. Pacientes com DMD e DMB têm um aumento significativo (até 2000 vezes os valores normais) de creatina quinase no soro sanguíneo que é liberada do músculo distrófico, antes mesmo do aparecimento dos sintomas⁸. Quando os músculos estão funcionando corretamente, o nível de creatina quinase no sangue é relativamente baixo, mas quando há algum problema com os músculos, as células musculares se abrem, causando o derramamento de creatina quinase na corrente sanguínea, aumentando sua taxa no sangue, o que causa ainda maiores danos ao músculo⁹. O período que decorre desde o aparecimento dos primeiros sintomas até o diagnóstico definitivo muitas vezes é extenso, o que prejudica o tratamento para amenizar os sintomas diminuindo o sofrimento.

Diagnóstico molecular direto e indireto da DMD: Aproximadamente 67% dos pacientes apresentam longas deleções de um ou mais exons no gene DMD ou duplicações¹⁰ de exons que ocorrem principalmente nas regiões 5' e central do gene DMD¹¹ sendo estes casos hereditários (Tabela 1). Não há correlação entre a extensão da deleção e a severidade da doença. Por outro lado, apenas 33% dos casos são esporádicos devido a mutações de novo (pontuais, pequenas deleções ou inserções)¹². Mutações pontuais são de difícil detecção pelo extraordinário tamanho do gene DMD, com 2.220.382bp e do transcrito, com 13.993bp (sequência referência NM_004006)¹².

As mutações patogênicas são de natureza heterogênea e um grande número tem sido descrito (Tabela 2 e Tabela 3). O diagnóstico genético envolve duas abordagens: a identificação direta da mutação patogênica no gene DMD e a análise de ligação de

marcadores polimórficos de DNA localizados dentro ou adjacente ao gene afetado em famílias de acometidos pela doença. O sequenciamento dos 79 exons é o método padrão-ouro de detecção e identificação de mutações patogênicas. Devido à complexidade do gene DMD e à natureza heterogênea das mutações causadoras da doença, o sequenciamento é um método laborioso e dispendioso para implantação na rotina do diagnóstico, particularmente em países em desenvolvimento¹³.

A análise indireta consiste na verificação de co-segregação, dentro de uma família, de marcadores polimórficos, fisicamente e geneticamente ligados com a mutação no acometido. Este tem sido o principal método para mapear doenças mendelianas e também tem exercido um papel importante nas tentativas de mapear doenças complexas. A análise indireta requer a elaboração de pedigree ou heredograma, contendo informações quanto às linhagens paternas e maternas dos acometidos de maneira ascendente e descendente^{14, 15}.

A análise genética de ligação para marcadores polimórficos intragênicos e/ou extragênicos localizados próximos aos genes de interesse, tais como a repetição de número variável em tandem, VNTR ("Variable Number Tandem Repeat") e a repetição curta em tandem, STR ("short tandem repeat", ou microssatélite), pode ser utilizada na identificação de rotina de portadores de mutações no gene DMD. Estes lócos são extremamente polimórficos e podem ser tipados pela técnica de PCR e análise dos produtos por eletroforese. Esta abordagem é bem mais rápida e pode ser realizada com pequenas quantidades de DNA¹⁶. Atualmente são conhecidos só 29 microssatélites do tipo dinucleotídeo, todos intrônicos, no gene DMD¹⁷. No diagnóstico indireto são frequentemente utilizados 15 destes marcadores (Tabela 4)¹⁸. A distância genética entre os marcadores localizados as extremidades da região de análise é estimada em 10,4 cM¹⁹. A heterozigose destes microssatélites varia de 40 a 84% (Tabela 5). O principal problema da genotipagem de microssatélites dinucleotídeos é a ocorrência de

Tabela 1. Alterações genéticas relacionadas à distrofia muscular de Duchenne ou Becker

Alteração genética	Frequência (%)	Fenótipo
Em homens afetados:		
Deleção gênica (de 1 éxon a todo gene)	60	DMD ou DMB
Mutações pontuais	34	DMD ou DMB
Duplicação parcial do gene	6	DMD ou DMB
Deleção de genes contíguos	Rara (<1%)	MD mais outros fenótipos, dependendo de outros genes deletados.
Em mulheres afetadas:		
Inativação não aleatória do X	Rara	DMD
Síndrome de Turner (45,X)	Rara	DMD
Translocação X; autossomo	Rara	DMD

Tabela 2. Deleções ou duplicações causadoras de distrofia muscular de Duchenne ^{17, 25}

Deleções e duplicações no gene DMD	Número Total ^a
Variante única no DNA	1173
Indivíduos com variante(s)	6153
Variantes descritas	12302

^a Data de acesso da última atualização: 11 de agosto de 2009. *MDM Lieden Open Variation Database* (http://www.dmd.nl/nmdb/home.php?select_db=DMD)

Tabela 3. Mutações pontuais (inserções, deleções e conversões)¹⁷

Mutações no gene DMD	Número total ^a
Variantes únicas no DNA	1992
Indivíduos com variante(s)	5348
Variantes descritas	8529

^a Data de acesso da última atualização: 11 de agosto de 2009. *MDM Lieden Open Variation Database* (http://www.dmd.nl/nmdb/home.php?select_db=DMD)

Tabela 4. Sequências dos iniciadores para amplificação de microssatélites do tipo dinucleotídeo frequentemente utilizados no diagnóstico indireto da distrofia muscular de Duchenne.

Marcador	Iniciador sentido (5'-3')	Iniciador anti-sentido (5'-3')
DXS1242 (5'Dp 427 cp)	tcttgatataaggattttgtgtttatac	attatgaaactataaggaataactcatttagc
DXS997 (intron 48)	tggcttatttaagaggac	gttttcagttcctgggt
DXS1214 (intron 63)	tagaacccaaatgacaacca	aagatagcaggcaacaataaga
DXS992 (> 200 kb 3' exon 79)	aagaatgggactccattca	gcttatccactggacagaa
DXS1238 (intron 44)	tccaacattggaaatcacattcaa	tcatcacaaatagatgttcacag
DXS1235 (intron 50)	aagggtccctccagtaacagattgg	tatgctacatagtatgtcctcagac
DXS1237 (intron 45)	gaggctataatttttaacttggc	ctctttcccttttattcatgttac
DXS1236 (intron 49)	cgttaccagctaaaatctcaac	catatgatacgattcgttttgc

Tabela 5. Heterozigose e número de alelos para 15 microssatélites localizados no gene DMD ¹⁷

Microssatélite	Heterozigose	Número de alelos identificados
DXS1242 (5' Dp427cp)	0,79	15
DXS1243 (intron 1m)	0,43	07
5'-5n3 (intron 2)	0,80	13
5'-5n4 (intron 4)	0,81	13
STR07A (intron 7)	0,62	08
5'-7n4 (intron 25)	0,54	05
DXS1238 (intron 44)	0,84	15
IVS44SK21 (intron 44)	0,80	12
DXS1237 (intron 45)	0,84	15
DXS997 (intron 48)	0,75	07
DXS1236 (intron 49)	0,83	19
DXS1235 (intron 50)	0,70	14
DXS1241 (intron 59)	0,40	06
DXS1214 (intron 63)	0,83	10
DXS992 (>200Kb 3'exon79)	0,71	09

^a Data de acesso da última atualização: 11 de agosto de 2009. *MDM Lieden Open Variation Database* (http://www.dmd.nl/nmdb/home.php?select_db=DMD)

produtos stutter, que diferem em tamanho por múltiplos da unidade de repetição do alelo verdadeiro, o que dificulta a designação acurada dos alelos. Há necessidade de investimentos para o desenvolvimento de microssatélites do tipo tetranucleotídeo e pentanucleotídeo, cuja tipagem resulta em significativa redução da amplificação de produtos stutter, o que possibilita uma melhor designação alélica, diminuindo, portanto, as possibilidades de erro de diagnóstico.

A análise de ligação de marcadores polimórficos apresenta importantes limitações, pois ela só pode ser realizada em famílias com histórico prévio da doença, não sendo utilizada em casos esporádicos (mutações de novo) ¹¹. É um método útil para aconselhamento genético de famílias com acometidos ²⁰.

Aconselhamento genético: Devido à constituição alossômica XX da mulher, a maioria

(> 90%) das mulheres portadoras de mutação no gene DMD é assintomática ²⁰. Embora de ocorrência rara, a mulher portadora de mutação pode ser acometida pela DMD como consequência de alteração no padrão de inativação do cromossomo X ²¹. O conhecimento sobre a condição de portadora de mutação patogênica é de grande valia para o aconselhamento genético, considerando que a metade dos filhos de portadoras deverá ser acometida pela doença e metade das filhas poderá ser portadora da mutação patogênica.

Outro aspecto importante é o mosaicismo gonadal. Aproximadamente 10% das mães de casos isolados de DMD, nas quais não foi detectada mutação pelo exame de DNA em amostra de sangue periférico, podem ser portadoras da mutação na linhagem germinativa; essas mulheres possuem um risco aumentado de ter filhos afetados pela DMD. Sabe-se que 2/3 dos casos de DMD são herdados da mãe portadora assintomática do gene e que no restante dos casos ocorre uma mutação espontânea, sem que

o gene tenha sido herdado. Nesses casos, o risco de recorrência é desprezível.

O exame de DNA, em sangue periférico ou em células do epitélio bucal, é um subsídio importante para o diagnóstico definitivo, evitando na maioria dos casos, a realização de biopsia muscular ou eletromiografia, procedimentos que além de dolorosos, não auxiliam no diagnóstico diferencial entre as várias formas de distrofia muscular.

Para identificação de portadoras de mutações no gene DMD e para o cálculo de risco genético individual, a abordagem diagnóstica deve considerar as seguintes possibilidades:

A. O afetado é caso isolado e tem deleção no gene da distrofina.
B. Se a mãe (e/ou irmã do afetado) for portadora da deleção confirma-se que é heterozigota. Neste caso, há risco de 50% de ter filhos afetados e filhas portadoras. O diagnóstico pré-natal é possível por meio de análise de DNA extraído de biopsia de vilo coriônico ou líquido amniótico, ao redor de 10 semanas de gestação.

C. Se a mãe não tiver deleção detectada em sangue periférico, existe ainda um risco de mosaicismo gonadal que varia de acordo com o local da deleção^{22, 23}. Se for no início do gene, o risco para um feto masculino é de aproximadamente 15%; se for na região central do gene, o risco para um feto masculino é cerca de 2%.

D. Se a irmã do afetado não tiver a deleção detectada em sangue periférico, o risco de ser portadora é desprezível.

E. O afetado é caso isolado e não tem deleção no gene DMD. Nestes casos compara-se o cromossomo X por meio de análise de ligação comparativa de microssatélites ao longo do gene DMD do afetado com outros indivíduos da genealogia. As pessoas a serem analisadas e a estimativa de risco genético dependem da estrutura genealógica.

F. Existe história familiar compatível com herança ligada ao cromossomo X. Nesta situação as mães de afetados são provavelmente portadoras de mutação (risco de 50% para descendentes de sexo masculino) e as irmãs do acometido têm risco de 50% de serem portadoras²⁴.

Referências Bibliográficas

1. Zatz M, Lange K, Spence MA. Frequency of Duchenne muscular dystrophy carriers. *Lancet* 1977; 1: 759.
2. Worton RG, Thompson MW. Genetics of Duchenne muscular dystrophy. *Annu Rev Genet* 1988; 22: 601-629.
3. Hoffman EP, Brown RH, Jr., Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987; 51: 919-928.
4. Kunkel LM, Beggs AH, Hoffman EP. Molecular genetics of Duchenne and Becker muscular dystrophy: emphasis on improved diagnosis. *Clin Chem* 1989; 35: B21-24.
5. Boland BJ, Silbert PL, Groover RV, Wollan PC, Silverstein MD. Skeletal, cardiac, and smooth muscle failure in Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Neurol* 1996; 14: 7-12.
6. Rapaport D, Passos-Bueno MR, Brandao L, Love D, Vainzof M, Zatz M. Apparent association of mental retardation and specific patterns of deletions screened with probes cf56a and cf23a in Duchenne muscular dystrophy. *Am J Med Genet* 1991; 39: 437-441.
7. van Essen AJ, Kneppers AL, van der Hout AH, Scheffer H, Ginjaar IB, ten Kate LP et al. The clinical and molecular genetic approach to Duchenne and Becker muscular dystrophy: an updated protocol. *J Med Genet* 1997; 34: 805-812.
8. Zatz M, Frota-Pessoa O, Levy JA, Peres CA. Creatine-phosphokinase (CPK) activity in relatives of patients with X-linked muscular dystrophies: a Brazilian study. *J Genet Hum* 1976; 24: 153-168.
9. Ashton EJ, Yau SC, Deans ZC, Abbs SJ. Simultaneous mutation scanning for gross

- deletions, duplications and point mutations in the DMD gene. *Eur J Hum Genet* 2008; 16: 53-61.
10. Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol* 2003; 2: 731-740.
11. Kim UK, Chae JJ, Lee SH, Lee CC, Namkoong Y. Molecular diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy by polymerase chain reaction and microsatellite analysis. *Mol Cells* 2002; 13: 385-388.
12. Chaturvedi LS, Mukherjee M, Srivastava S, Mittal RD, Mittal B. Point mutation and polymorphism in Duchenne/Becker muscular dystrophy (D/BMD) patients. *Exp Mol Med* 2001; 33: 251-256.
13. Zatz M, Rabbi-Bortolini E. Genetic heterogeneity in Duchenne muscular dystrophy. *Am J Med Genet* 1987; 26: 237.
14. Davies KE, Pearson PL, Harper PS, Murray JM, O'Brien T, Sarfarazi M et al. Linkage analysis of two cloned DNA sequences flanking the Duchenne muscular dystrophy locus on the short arm of the human X chromosome. *Nucleic Acids Res* 1983; 11: 2303-2312.
15. Schwartz LS, Tarleton J, Popovich B, Seltzer WK, Hoffman EP. Fluorescent multiplex linkage analysis and carrier detection for Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 721-729.
16. Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 1996; 380: 152-154.
17. Aartsma-Rus A, Van Deutekom JC, Fokkema IF, Van Ommen GJ, Den Dunnen JT. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve* 2006; 34: 135-144.
18. Carsana A, Frisso G, Tremolaterra MR, Ricci E, De Rasmo D, Salvatore F. A larger spectrum of intragenic short tandem repeats improves linkage analysis and localization of intragenic recombination detection in the dystrophin gene: an analysis of 93 families from southern Italy. *J Mol Diagn* 2007; 9: 64-69.
19. Matise TC, Chen F, Chen W, De La Vega FM, Hansen M, He C et al. A second-generation combined linkage physical map of the human genome. *Genome Res* 2007; 17: 1783-1786.
20. Giliberto F, Ferreiro V, Dalamon V, Surace E, Cotignola J, Esperante S et al. Direct deletion analysis in two Duchenne muscular dystrophy symptomatic females using polymorphic dinucleotide (CA)n loci within the dystrophin gene. *J Biochem Mol Biol* 2003; 36: 179-184.
21. Pegoraro E, Schimke RN, Arahata K, Hayashi Y, Stern H, Marks H et al. Detection of new paternal dystrophin gene mutations in isolated cases of dystrophinopathy in females. *Am J Hum Genet* 1994; 54: 989-1003.
22. Passos-Bueno MR, Bakker E, Kneppers AL, Takata RI, Rapaport D, den Dunnen JT et al. Different mosaicism frequencies for proximal and distal Duchenne muscular dystrophy (DMD) mutations indicate difference in etiology and recurrence risk. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 1150-1155.
23. Helderman-van den Enden AT, de Jong R, den Dunnen JT, Houwing-Duistermaat JJ, Kneppers AL, Ginjaar HB et al. Recurrence risk due to germ line mosaicism: Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Clin Genet* 2009; 75: 465-472.
24. Zatz M, Passos-Bueno MR, Rapaport D. Estimate of the proportion of Duchenne muscular dystrophy with autosomal recessive inheritance. *Am J Med Genet* 1989; 32: 407-410.
25. White SJ, den Dunnen JT. Copy number variation in the genome; the human DMD gene as an example. *Cytogenet Genome Res* 2006; 115: 240-246.