

# ***O estudo do genoma humano contribuindo para a compreensão, o diagnóstico e a prevenção de doenças genéticas: o exemplo das doenças neuromusculares***

## ***The study of human genome collaborating for comprehension, diagnosis and prevention of genetic diseases; the example of neuromuscular diseases***

*Mayana Zatz\**

---

**RESUMO:** O anúncio da finalização do Genoma Humano passará a trazer muitas respostas relacionadas ao aspecto molecular de diversas patologias mas também trará muitas perguntas como: Qual o benefício para a Medicina ao se estudar os genes? Quais os aspectos éticos envolvidos? Quais as perspectivas reais diante dessa descoberta?

Estudar doenças genéticas auxilia o estudo dos genes até mesmo em seu aspecto ético, mesmo tendo em vista que o Genoma Humano pouco tenha trazido de novidades para as principais doenças genéticas, já que seus genes já eram conhecidos. Aqui será mostrado o exemplo das Doenças Neuromusculares, mais exatamente as Distrofias Musculares, desde seus aspectos genéticos e moleculares até suas diferentes apresentações, seu diagnóstico, os fatores de risco e as questões envolvidas no aconselhamento genético.

**DESCRITORES:** Distrofias Musculares/diagnóstico; Distrofias Musculares/classificação; Distrofias Musculares/genética; Diagnóstico Diferencial; Aconselhamento Genético.

---

### ***INTRODUÇÃO***

---

O grande acontecimento do ano 2000 foi sem dúvida o anúncio do sequenciamento do **GENOMA HUMANO**. A mídia não se cansou de repetir que os conhecimentos gerados irão revolucionar a medicina. Entretanto, fala-se muito pouco a respeito das

aplicações imediatas deste grande feito científico. Como o projeto **GENOMA HUMANO** vai influenciar nossas vidas? Como a medicina tem se beneficiado do estudo dos genes? O que existe de prático e o que espera-se para o futuro? Quais são as implicações éticas?

Na realidade, o anúncio do sequenciamento do genoma humano ainda não trou-

---

\* Professora Titular de Genética Humana e Médica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (IBUSP).  
Coordenadora do Centro de Estudos do Genoma Humano, IBUSP.  
Membro da Academia Brasileira de Ciências.

**Endereço para correspondência:** Depto. de Biologia - IBUSP - Rua do Matão, 277 - Sala 211 - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo, SP

xe ainda respostas para questões fundamentais como: Quantos genes temos? Quantas proteínas são codificadas por estes genes? Como os genes interagem entre si e com o ambiente? Quanto os nossos genes determinam a nossa personalidade e o nosso comportamento?

Em relação as doenças genéticas, o anúncio do sequenciamento do **genoma humano** não trouxe nenhuma grande surpresa porque a maioria dos genes que causam as patologias mais comuns já haviam sido mapeados. Entretanto, do ponto de vista prático, o estudo de genes humanos tem permitido o diagnóstico molecular para um número crescente de patologias. Esta possibilidade tem sido fantástica para evitar outros exames invasivos, identificar casais em risco e prevenir o nascimento de novos afetados (a partir do diagnóstico pré-natal e do Aconselhamento Genético). Além disso, a partir do estudo de doenças genéticas estamos começando a entender como nossos genes funcionam. Cada questão respondida, abre um leque de novas questões, inclusive do ponto de vista ético, como veremos a seguir com o exemplo das doenças neuromusculares. Ainda estamos na ponta do iceberg mas a aventura promete ser fascinante.

## AS DISTROFIAS MUSCULARES PROGRESSIVAS

As distrofias musculares progressivas constituem um grupo de doenças, caracterizadas por uma degeneração progressiva e irreversível da musculatura esquelética, e que têm sido objeto de muitas pesquisas. Já foram mapeados genes responsáveis por mais de 30 formas de distrofia, cuja herança pode ser autossômica dominante, autossômica recessiva e ligada ao X. Além disso, sabe-se que existem formas ainda não identificadas. Os avanços da biologia molecular na última década revolucionaram nossos conhecimentos e perguntas fundamentais tais como: *Qual é o defeito básico? O que leva os músculos a degenerar? Como explicar a heterogeneidade genética, isto é, como mutações em genes diferentes podem resultar em um mesmo fenótipo? Ou, ao contrário, como mutações em um mesmo gene podem levar a quadros clínicos diferentes?* começam a ser respondi-

das. Por outro lado, a análise molecular levantou outras questões intrigantes. Por exemplo, tem-se observado em um número crescente de doenças que pacientes com a mesma mutação podem ter quadros totalmente diferentes<sup>50,59</sup> ou que alguns genes autossômicos afetam mais um sexo do que o outro<sup>38,39,93,94</sup>.

A explicação para estas observações, além de fascinante, será extremamente importante para futuros tratamentos. Isto tem sido possível graças a identificação dos genes responsáveis por estas doenças, do seu produto e de estudos de correlações genótipo: fenótipo (isto é, como cada mutação gênica interfere no produto gênico primário e no quadro clínico). Além dos grandes avanços na compreensão dos mecanismos patológicos, as pesquisas nesta área tem sido fundamentais para um diagnóstico correto e para prevenção de novos casos, através da identificação de casais em risco, Aconselhamento Genético e diagnóstico pré-natal, o que é fundamental principalmente para as doenças graves para as quais ainda não há tratamentos, como as doenças neuromusculares discutidas a seguir.

## AS DISTROFIAS DE DUCHENNE E BECKER

Dentre as diferentes miopatias, a distrofia de Duchenne (DMD), de herança recessiva ligada ao cromossomo X é a mais comum, com uma incidência de 1 em cada 3000 nascimentos de sexo masculino<sup>27</sup>. Já a distrofia tipo Becker (DMB), alélica à DMD, é cerca de 10 vezes mais rara. A diferença entre essas duas formas está na idade de início e velocidade de progressão. Na DMD, os sinais clínicos iniciam-se entre 3-5 anos de idade (com quedas frequentes, dificuldades para subir escadas, correr e levantar do chão), o confinamento à cadeira de rodas se dá até os 12 anos de idade e os afetados raramente sobrevivem após a terceira década. Já na DMB, os sintomas iniciam-se em geral na segunda década, os afetados sempre andam após os 16 anos e a velocidade de progressão é extremamente variável. Cerca de 30-50% dos pacientes com DMD tem retardo mental cujas causas ainda estão sendo investigadas<sup>68,69</sup>.

Pacientes com DMD e DMB têm um aumento significativo (até 2000 vezes os valores normais) da enzima sérica creatino-quinase (CK) que é liberada do músculo distrofico, mesmo antes do aparecimento dos sinais clínicos<sup>87,96</sup>.

Após a localização do gene da DMD/DMB no braço curto do cromossomo X, em 1981<sup>89</sup>, que levou à sua clonagem em 1987<sup>41,42</sup>, descobriu-se que o produto do gene DMD/DMB é uma proteína do citoesqueleto da membrana, denominada distrofina<sup>36,37</sup>, e cuja função aparentemente seria o de manter a estabilidade da membrana da célula muscular.

Hoje sabe-se que as mutações que causam DMD ou DMB são deleções em cerca de 60% dos casos, duplicações em 5-6% dos casos e mutações de ponto nos casos restantes<sup>42,45</sup>. A diferença entre a DMD e a DMB depende da manutenção ou não do quadro de leitura do RNA mensageiro ou RNAm. Isto é, na DMB, **a deleção é em fase**, o quadro de leitura do RNAm é mantido e tem-se como resultado uma proteína quantitativamente reduzida ou deletada internamente, mas parcialmente funcional. Já na DMD, a deleção é **fora de fase**, o quadro de leitura do RNAm não é mantido, tem-se uma proteína severamente truncada e que é rapidamente destruída pela célula<sup>51</sup>.

O estudo de mais de 1000 pacientes com DMD/DMB em nosso laboratório<sup>74</sup>, mostrou que cerca de 60% dentre eles (tanto os casos de DMD como de DMB) têm deleções no gene da distrofina. Além da manutenção do quadro de leitura do RNAm, o sítio da deleção é muito importante na determinação da severidade do quadro clínico. Por exemplo, deleções nas regiões de ligação da distrofina a outras proteínas (regiões C terminal e N-terminal) resultam na maioria dos casos em quadro mais grave<sup>76-78</sup>. A região C terminal, em particular, é fundamental porque constitui o ponto de ligação da distrofina com glicoproteínas associadas à membrana e portanto deleções nessa região levam quase sempre à um quadro grave de DMD. Por outro lado, deleções de até 50% do gene podem estar associados a um quadro benigno<sup>61</sup> desde que estejam restritas a região central do gene. O quadro leve explica-se porque se a deleção está restrita ao domínio em bastão da distrofina, mesmo que se tenha um encurtamento dessa proteína, os sítios de ligação não ficam alterados, permitindo uma função parcial.

## ASPECTOS GENÉTICOS

Cerca de 1/3 dos casos de DMD são causados por mutações novas<sup>88</sup> e os restantes 2/3 são herdados de mães portadoras. A maioria (mais de 90%) das mulheres portadoras de mutações no gene da distrofina são assintomáticas<sup>27</sup>. Entretanto têm um risco de 50% de passar o gene defeituoso para a sua descendência, isto é, metade dos filhos poderão ser afetados e metade das filhas portadoras, porém clinicamente normais. Outro aspecto importante é o mosaicismismo gonadal, isto é, aproximadamente 10% das mães de casos isolados de DMD, nas quais não foi detectada mutação no sangue periférico podem ser portadoras da mutação na linhagem germinativa<sup>59,60</sup>. Estas mulheres têm um risco aumentado de vir a ter filhos afetados pela DMD.

## DIAGNÓSTICO E ACONSELHAMENTO GENÉTICO

### Diagnóstico

O exame de DNA em sangue periférico (ou em raspado de mucosa bucal) tem sido muito importante para o diagnóstico evitando em muitos casos a realização de exames invasivos como a biopsia muscular ou a eletromiografia (que além de ser um exame doloroso não auxilia no diagnóstico diferencial entre as várias formas de distrofias). Do ponto de vista prático, em casos suspeitos os passos a serem seguidos para o diagnóstico são os seguintes:

1. Dosagem de CK no soro: se aumentado sugere o diagnóstico de distrofia muscular<sup>87,96</sup>
2. Análise de DNA: pesquisa de deleção no gene da distrofina; se for encontrada deleção confirma-se o diagnóstico de DMD/DMB
3. Biopsia muscular: é indicada se não for encontrada deleção no gene da distrofina, se não houver história familiar de herança recessiva ligada ao cromossomo X ou em crianças que são casos isolados, nas fases iniciais, para um diagnóstico diferencial entre DMD e DMB. A primeira proteína a

ser pesquisada é a distrofina, através de técnica de imunofluorescência e western blot<sup>76,77</sup>. Os possíveis resultados são:

- a) distrofina ausente: confirma-se o diagnóstico de distrofia de Duchenne.
- b) distrofina quantitativamente diminuída ou com peso molecular diminuído (através de análise por western blot): o diagnóstico de distrofia tipo Becker é o mais provável
- c) Distrofina normal: pode tratar-se de distrofia tipo cinturas ou outra forma de distrofia muscular. O passo seguinte é analisar as diferentes proteínas associadas as formas autossômicas recessivas tais como as sarcoglicanas, a calpaina-3, a disferlina, a teletonina em biopsia muscular<sup>3,4,54,73,79</sup>.

### Estimativas de riscos genéticos

Para identificação de portadoras e estimativas de riscos genéticos os passos a serem seguidos são:

- 1) O paciente é caso isolado e tem deleção no gene da distrofina:
  - a) se a mãe (e/ou irmã do afetado) for portadora da deleção confirma-se que é(são) heterozigota(s). Neste caso têm um risco de 50% de vir a ter filhos afetados e filhas portadoras. É possível realizar diagnóstico pré-natal de certeza através da análise de DNA extraído de vilosidades coriônicas, ao redor de 10 semanas de gestação.
  - b) Se a mãe não tiver deleção em sangue periférico existe ainda um risco de mosaïcismo gonadal que varia de acordo com o sitio da deleção<sup>60</sup>. Se for no início do gene, o risco para um feto de sexo masculino é de cerca de 15%; se for na região central do gene, o risco para um feto de sexo masculino é de cerca de 2%.
  - c) Se uma irmã de afetado não tiver deleção em sangue periférico, o risco de que seja portadora é desprezível.
- 2) O paciente é caso isolado e não tem deleção no gene da distrofina  
Nestes casos compara-se o cromossomo X (através de marcadores polimórficos ao longo do gene da distrofina) do afetado com outros indivíduos da genealogia. As pessoas a serem analisadas e a estimativa de risco genético vai depender da estrutura da família

- 3) Existe história familiar compatível com herança ligada ao X

Nesta situação todas as mães de afetados são portadoras certas do gene (risco de 50% para descendentes de sexo masculino) e todas as irmãs têm risco de 50% de serem portadoras<sup>86</sup>. O exame de DNA a ser realizado vai depender da presença ou não de deleção no afetado.

### DISTROFIAS TIPO CINTURAS

As distrofias tipo cinturas (limb-girdle muscular dystrophies) constituem um grupo heterogêneo de doenças caracterizadas por uma fraqueza proximal das cinturas dos membros (cintura pélvica e escapular) e do tronco, sem comprometimento dos músculos faciais ou da inteligência. Já foram identificados 15 genes responsáveis por este quadro clínico, 6 com herança autossômica dominante e 9 com herança autossômica recessiva<sup>22, 52,56,83</sup>. É um exemplo de **heterogeneidade genética não alélica**, isto é, genes diferentes resultando em um fenótipo semelhante. As formas dominantes são relativamente raras e constituem menos de 10% dos casos<sup>22,66,95</sup>.

Dentre as formas recessivas, distingue-se um subgrupo, as sarcoglicanopatias, geralmente associadas a um quadro clínico geralmente mais severo, semelhante á forma Duchenne. Por este motivo, estas formas também são classificadas como "Duchenne-like"<sup>12, 66,95</sup>. Existem quatro formas de sarcoglicanopatias, causadas por mutações nos genes que codificam quatro glicoproteínas associadas a distrofina formando o complexo distrofina-glicoproteínas associadas. São elas: a LGMD2C que codifica a g-sarcoglicana, a LGMD2D, que codifica a a-sarcoglicana, a LGMD2E que codifica a b-sarcoglicana e a LGMD2F que codifica a d-sarcoglicana<sup>12, 16, 17,18, 44, 50,57,63,64,65,72</sup>. Estas 4 proteínas estão interligadas<sup>28, 79,81,80</sup> e porisso uma mutação que cause ausência de qualquer uma das sarcoglicanas causa uma desestruturação de todo o complexo resultando geralmente em um quadro severo de distrofia. Esta observação explica como mutações em genes diferentes podem causar um mesmo quadro clínico.

Com exceção da forma LGMD2D, cujo quadro clínico é muito variável as ou-

tras 3 sarcoglicanopatias geralmente mostram uma evolução rápida e os pacientes dificilmente conseguem andar após os 16 anos de idade<sup>53, 63,64,95</sup>. Entretanto, existem exceções e já foram identificados pacientes com um quadro mais benigno pertencentes a qualquer uma das sarcoglicanopatias. A enzima CK também apresenta-se muito elevada no soro, principalmente nas fases iniciais. A maioria dos pacientes têm hipertrofia de panturrilhas quando na fase ambulatoria. Quando o paciente é do sexo masculino e não existe história familiar o diagnóstico clínico é indistinguível da forma Duchenne ligada ao cromossomo X. Por outro lado, em meninas afetadas, que são casos isolados, deve excluir-se uma distrofinopatia. Em todos estes casos, a confirmação do diagnóstico depende da análise das proteínas distrofina e sarcoglicanas em biópsia muscular e da análise de DNA.

Nas distrofias tipo cinturas não sarcoglicanas, o quadro clínico geralmente é mais leve e a maioria dos afetados consegue deambular após os 16 anos<sup>63,95</sup> embora o quadro também seja muito variável. As formas já mapeadas são:

a) LGMD2A, em 15q<sup>3,15</sup>, que codifica a enzima calpaina 3, também denominada **calpainopatia** (CAPN3). As calpains são proteases e a forma específica do músculo, a calpaina-3, é uma protease ativada pelo cálcio<sup>13,70,73</sup>. Dentre as distrofias de cinturas de herança AR, a LGMD2A é a única forma descrita até o momento cujo produto gênico é uma proteína com propriedades enzimáticas e não uma proteína estrutural. A função da calpaina-3 ainda não está completamente esclarecida mas trabalhos recentes sugerem que ela poderia estar associada a uma cadeia de eventos levando a apoptose. O gene da calpaina tem 24 exons e até o presente já foram descritas cerca de 100 mutações patogênicas que causam a LGMD2A.<sup>71</sup> A maioria delas (70%) são únicas em cada família o que torna extremamente difícil o diagnóstico desta forma de distrofia a partir do estudo molecular, em casos isolados. Entretanto, a análise molecular de pacientes brasileiros tem mostrado que existem 2 mutações recorrentes que correspondem a 40% dos casos. A possibilidade recente de estudar-se a expressão da calpaina-3 em biópsia muscular tem sido valiosa para confirmação clínica e estudos de correlações genótipo: fenótipo.

Estudos realizados em pacientes brasileiros mostraram que a calpaina encontra-se totalmente deficiente em cerca de 70% dos pacientes com LGMD2A e parcialmente deficiente nos outros 30%.

A enzima sérica CK apresenta um aumento médio de 19 vezes (entre 2 e 93)<sup>96</sup>. A maioria deles tem hipertrofia de panturrilhas e consegue andar nas pontas dos pés mas não nos calcanhares nas fases iniciais do processo.

b) LGMD2B, em 2p, codifica a proteína disferlina, é também classificada como disferlinopatia (DYSF)<sup>4,14,46</sup>. A sua função na patologia da distrofia tipo 2B permanece desconhecida. No músculo esquelético humano a disferlina localiza-se na membrana da fibra muscular e mostrou-se deficiente em pacientes afetados por esta forma de distrofia. O gene da disferlina é muito grande (tem cerca de 55 exons) o que torna, do mesmo modo que na LGMD2A, o diagnóstico molecular extremamente difícil, através da análise de DNA, em pacientes isolados. Portanto, hoje o diagnóstico diferencial desta forma de distrofia baseia-se no estudo da proteína disferlina em biópsias musculares. Clinicamente, esta forma de distrofia é em geral mais benigna mas também apresenta grande variabilidade inter e intrafamiliar. A hipertrofia de panturrilhas é rara nesta forma de distrofia e observa-se comumente uma atrofia distal.

Uma observação interessante é que frequentemente os pacientes perdem a capacidade para andar nas pontas dos pés antes de perder a capacidade para andar nos calcanhares. Os níveis séricos da enzima CK podem estar muito elevados (em média 36 vezes acima do normal, variando entre 3 e 211 vezes) principalmente nos estágios iniciais<sup>95,96</sup>.

c) LGMD2G, mapeada em 17q<sup>52</sup>. Esta forma de distrofia foi mapeada em uma família brasileira e recentemente o produto gênico foi identificado, a proteína sarcomérica telotonina<sup>54</sup>. O gene da telotonina é pequeno (tem só dois exons) e portanto é viável em casos suspeitos fazer uma triagem de mutações para confirmação de diagnóstico.

O quadro clínico é bastante variável, com a idade de início variando de 9 a 15 anos, e aumento da enzima sérica CK de 10 a

30 vezes acima do normal. Os afetados apresentam uma fraqueza importante na musculatura proximal e podem ou não ter atrofia distal. Isto é, clinicamente o fenótipo pode ser semelhante a forma LGMD2A ou LGMD2B<sup>95</sup>.

## **DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE DISTROFIAS TIPO CINTURAS E ATROFIA ESPINHAL PROGRESSIVA (AEP)**

As atrofia espinhais progressivas (AEP), de herança autossômica recessiva, constituem a forma mais comum de doença do neurônio motor em crianças e jovens adultos. Sua incidência é de cerca de 1/10.000 e a frequência de heterozigotos de cerca de 1/50. As AEPs são classificadas em três grupos: tipo I ou Werdnig-Hoffmann (WH), que é a mais severa; tipo II ou forma intermediária; tipo III ou Kugelberg-Welander (KW) que é a menos grave. As três formas são condicionadas por um mesmo gene, SMN1 (survival motor neuron). O gene SMN1 e uma cópia quase idêntica (SMN2) estão localizados em 5p13 e codificam proteínas idênticas. Entretanto a cópia SMN2 sofre um processamento alternativo do exon 7 levando a produção de uma proteína truncada. A maioria dos pacientes têm deleções (nos exons 7 e ou 7/8) do gene SMN1 e aparentemente a severidade do fenótipo é modulada pelo número de cópias de SMN2.

O estudo molecular do gene SMN1 em 281 pacientes brasileiros com diagnóstico de AEP mostrou a seguinte frequência de deleções: 34 em 43 (~80%) no grupo I, 51 em 101 (~50%) no grupo II e 23 em 54 (42.6%) no grupo III. Além disso, a análise de DNA extraído de vilosidades coriônicas em 16 casos encaminhados para diagnóstico prénatal, mostrou que 4 fetos eram portadores de deleção no gene SMN.

Pacientes afetados por DMC e AEP podem ter um quadro clínico muito semelhante, principalmente nas formas adultas. Além disso, a atividade da enzima sérica CK pode apresentar-se aumentada nas AEPs, com valores semelhantes aos encontrados nas DMC. Na prática, a análise molecular do gene SMN tem se mostrado extremamen-

te importante para confirmação do diagnóstico clínico e diagnóstico diferencial sem necessidade de exames mais invasivos.

## **DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL NAS DMPS E ACONSELHAMENTO GENÉTICO.**

Em pacientes isolados, nos quais o estudo de DNA exclui uma distrofinopatia, o estudo de proteínas musculares é fundamental para diferenciar este grupo de distrofias, das formas de herança ligada ao X, para o Aconselhamento Genético, como exemplificado abaixo:

- Nas formas AR, pais de crianças afetadas tem um risco de 25% de vir a ter outro descendente afetado, independentemente do sexo, enquanto nas distrofinopatias ligadas ao X só existe risco para descendentes de sexo masculino.
- O risco para a descendência de irmãs normais de afetados nas formas AR é desprezível (desde que não se casem com consanguíneo) e pode ser de até 50% na DMD/DMB, independentemente de casamento (se a irmã for portadora da mutação presente no seu irmão).
- No caso de herança AR, só existe risco para aquele casal, enquanto na DMD/DMB, se a mãe do afetado for portadora, o risco para a sua futura prole independe do casamento.

## **DISTROFIA FÁCIO-ESCÁPULO-HUMERAL (DFSH)**

Essa forma de distrofia, de herança autossômica dominante, caracteriza-se por um envolvimento predominante da musculatura facial e da cintura escapular, com uma grande variabilidade inter e intrafamiliar<sup>82</sup>.

Alguns pacientes têm uma forma extremamente leve que pode se limitar a uma fraqueza na face ou na cintura escapular durante a vida toda enquanto outros podem ter início na infância e uma progressão rápida com perda precoce da ambulação. Em mé-

dia, entretanto, a progressão é muito lenta e a maioria dos pacientes tem uma sobrevida normal.

O gene da DFSH foi localizado no cromossomo 4 mas o mecanismo molecular ainda não é conhecido. Nos pacientes afetados ocorre uma deleção de sequências repetidas de 3.3 kb. Existe uma correlação entre o tamanho da deleção e a severidade do quadro clínico embora numa mesma família todos os afetados têm a mesma deleção<sup>47,84,85</sup>.

Pesquisas em famílias brasileiras com FSHD mostraram que: a) cerca de 1/3 dos casos são resultantes de mutações novas; b) a análise de famílias com duas ou mais gerações sugere que a antecipação (agravamento do quadro clínico em gerações subsequentes) pode ocorrer nesta forma de distrofia; c) Os casos mais graves são geralmente resultantes de mutações novas ou de herança materna<sup>90,94</sup>.

Outro achado intrigante é que, apesar de tratar-se de um gene autossômico dominante (e que portanto deveria afetar igualmente os dois sexos), observamos que o sexo masculino é mais frequentemente e em média mais severamente afetado do que o sexo feminino<sup>94</sup>. O estudo molecular de pacientes brasileiros mostrou que esta diferença sexual na frequência de afetados é devida a uma proporção significativamente maior de mulheres portadoras da deleção e que permanecem assintomáticas. Ainda não se tem uma explicação para estes achados mas compreender porque as mulheres são em média menos afetadas do que os homens vai ser muito importante para futuros tratamentos.

Apesar do gene responsável pela DFSH ainda não ter sido isolado, o mecanismo molecular proposto para explicar esta miopatia seria uma deleção de um número integral de cópias de uma sequência de 3.3 kb "em tandem". Sugere-se que a função do gene FSHD poderia estar alterada (ou "aumentada") devido a um efeito de posição ou à perda das repetições de 3.3 kb. Nesse sentido, deleções maiores levariam à uma desativação desse gene proximal em uma proporção maior de células. É possível também que o gene estrutural da DFSH produza transcritos alternativos distintos em diferentes tecidos musculares ou de acordo com a idade<sup>82</sup>.

Do ponto de vista prático de Aconselhamento Genético, é importante salientar que enquanto o gene não for clonado, a aná-

lise do fragmento 4q35 só é possível: a) em famílias com múltiplos afetados ou b) nos casos isolados, quando for possível confirmar que um fragmento de tamanho reduzido encontrado no probando está ausente nos seus pais. Por outro lado, sabe-se que pacientes afetados têm um risco de 50% de passar o gene defeituoso para a sua descendência. Entretanto, o aconselhamento genético nas famílias em risco é complexo pois deve levar-se em conta a possibilidade de antecipação clínica e também a diferença de manifestação de acordo com o sexo do afetado. Isto é, não é possível prever a severidade do quadro clínico em crianças portadoras da mutação. Por este motivo, do ponto de vista ético, a conduta tem sido de não testar crianças assintomáticas em risco enquanto não houver um tratamento preventivo.

## ***DISTROFIA MIOTÔNICA DE STEINERT***

A distrofia miotônica de Steinert (DMS), uma patologia multisistêmica, é a forma mais comum de distrofia muscular do adulto com uma incidência estimada em 1 em cada 8500 indivíduos. A herança é autossômica dominante e a idade de início pode variar desde o nascimento (distrofia miotônica congênita) até após os 60 anos de idade com quadro clínico extremamente variável. Uma característica importante é a presença de **antecipação clínica**, isto é, em genealogias com várias gerações observa-se um aparente aumento de severidade (e/ou idade de início mais precoce) em gerações sucessivas.

De acordo com a idade de início e os sintomas os afetados são classificados em diferentes sub-grupos<sup>33,34</sup>, discriminados abaixo:

- a) forma tardia, leve ou senil, com início geralmente após os 50 anos. Os sinais clínicos podem limitar-se a uma catarata, calvície frontal com um mínimo ou sem comprometimento muscular.
- b) Forma clássica, com início na adolescência ou na terceira década caracterizada por fraqueza e atrofia muscular da musculatura esquelética, fenômeno miotônico (dificuldade para relaxar os músculos quando contraídos, particularmente abrir as mãos), calvície frontal precoce principalmente no sexo masculino, atrofia testicu-

lar podendo haver comprometimento intelectual. Os sinais clínicos neste sub-grupo são extremamente variáveis podendo ocorrer diabetes e comprometimento da musculatura lisa com envolvimento gastro intestinal e do trato urinário. Complicações cardíacas, particularmente defeitos de condução e arritmias são frequentes e constituem uma causa importante de óbito. Cerca de 80-85% dos pacientes com a forma clássica ou precoce tem alterações no eletrocardiograma

- c) Forma severa infantil com início na primeira década com fraqueza facial, retardo mental importante e comprometimento muscular importante.
- d) Forma congênita grave com hipotonia grave ao nascimento, dificuldades respiratórias e de deglutição, retardo mental importante e atraso no desenvolvimento motor. É interessante observar que geralmente a hipotonia e a função motora melhoram durante a primeira infância mas os sintomas clássicos de distrofia miotônica tendem a reaparecer na segunda década.

Existem também casos atípicos onde observa-se, na primeira década, somente retardo mental importante<sup>1</sup> sem outros sinais clínicos indicando portanto a importância de testar-se este gene em casos onde foram excluídas outras causas de retardo mental.

O mecanismo molecular responsável pela DMS, cujo gene foi mapeado em 19q é uma expansão de um trinucleotídeo (CTG)<sub>n</sub> na região 3' não traduzida do gene que codifica uma proteína quinase ou DM-PK<sup>11,19,20,23,29,32,48,58</sup>. Indivíduos normais podem ter de 5 até 37 repetições (CTG)<sub>n</sub>. Pacientes afetados podem ter de 50 até 8000 repetições e existe uma correlação entre o tamanho da expansão em DNA de sangue periférico e a severidade do quadro clínico. Este tipo novo de mutação foi denominado **mutação dinâmica** e hoje conhecem-se várias doenças que são causadas por este mecanismo patológico, isto é, **por genes dinâmicos** (como a Coreia de Huntington, as várias formas de ataxias espinocerebelares e a doença de Kennedy entre outras).

Quando o gene se torna instável, existe uma tendência para um aumento da expansão em gerações sucessivas o que fornece uma explicação biológica para o fenômeno da antecipação<sup>6,7,35</sup>.

Esta variabilidade no tamanho das expansões explica as diferenças na severidade clínica observada na DMS, isto é, como uma mutação, em um mesmo loco, pode resultar em fenótipos tão distintos. Entretanto, é importante salientar que a correlação não é linear e portanto o tamanho da expansão CTG em sangue periférico não pode ser utilizada como prognóstico da severidade clínica.

Além disso, o estudo de fetos portadores da mutação mostrou uma grande variabilidade no tamanho da expansão em diferentes tecidos que confirma a heterogeneidade somática<sup>5,8</sup>. Em pacientes afetados, inclusive da população brasileira, observou-se que a expansão é sempre maior no músculo e fibroblastos<sup>62,75,91,92</sup> do que no sangue. Entretanto os mecanismos que levariam a uma expansão tecido-específica diferencial não são conhecidos. Além disso, não observamos, principalmente em adultos, uma correlação entre o tamanho da expansão no músculo e a expansão CTG no sangue ou com a severidade do quadro clínico. Observou-se também que existe uma expansão (CTG)<sub>n</sub> contínua com a idade<sup>49</sup> mas ainda não se sabe se esta explicaria o porque da progressão da doença. De qualquer modo, esta heterogeneidade tecido específica explica porque o tamanho da expansão em sangue periférico não pode ser usada como prognóstico clínico.

A partir de experimentos a nível de DNA, RNA e proteína, várias hipóteses foram propostas para explicar os mecanismos patológicos resultantes da expansão CTG tais como: a) a expansão CTG levaria a um efeito de dose monogênico, isto é, afetando somente a expressão da DM-PK; b) a expansão afetaria a expressão de vários genes simultaneamente, isto é, seria uma síndrome causada por genes contíguos; c) a expansão CTG teria efeitos transdominantes a nível de RNA; d) a expansão CTG teria efeitos deletérios na função celular e na replicação celular. Existe, entretanto muitos resultados conflitantes, já que estudos diferentes em pacientes afetados já descreveram um aumento, uma diminuição ou uma expressão inalterada dos níveis de RNA do gene DM-PK. Uma possível explicação para estes achados disparatados é a grande dificuldade de comparar-se pacientes com mesma idade, sexo e grau semelhante de degeneração muscular.

### Aspectos Genéticos: transmissão e antecipação

A herança é autossômica dominante na DMS e mutações novas são raras sugerindo um efeito ancestral fundador. A penetrância entretanto não é completa pois alguns indivíduos com a mutação podem permanecer assintomáticos ou quase durante toda a vida.

Curiosamente, existe uma diferença na transmissão de acordo com o sexo<sup>9,10,24,25,26,30,40,43,93</sup>. Uma delas é que a forma congênita grave é transmitida quase exclusivamente pelo sexo feminino. Por outro lado existe um excesso significativo de afetados do sexo masculino o que também foi confirmado por nós na população brasileira. Além disso, esta distorção de segregação é mais evidente para descendentes de homens do que mulheres com DMS. A observação de que o alelo mutado é mais frequentemente transmitido para o sexo masculino do que para o feminino fornece uma explicação para o excesso de homens nas famílias de afetados. Outro achado interessante é a baixa incidência da DMS observada por nós na população brasileira de origem africana em comparação com a população caucasóide ou oriental. Esta observação suporta os achados de Goldman *et al.*<sup>31</sup> que não identificaram pacientes com DMS na população negroide da África do Sul. De acordo com estes autores, a ausência de DMS nesta população explica-se porque o número máximo de repetições (CTG)<sub>n</sub> encontrada na população normal foi de 22. Isto é, estaria abaixo do limite de 37 repetições quando aparentemente o gene começa a mostrar-se instável com tendência a expandir-se.

O estudo da transmissão do gene da DM em genealogias com várias gerações mostrou que em cerca de 80% dos casos, observa-se antecipação clínica (isto é, o início é mais precoce e o quadro mais severo) acompanhada por um aumento médio da repetição CTG (no sangue periférico) em gerações sucessivas. Além disso, os maiores aumentos são geralmente transmitidos pela mãe o que explicaria porque a forma congênita é quase exclusivamente de origem materna.

Por outro lado, já foram descritos exemplos onde o tamanho da expansão no sangue periférico era menor nos descendentes afetados do que na geração parental, isto é, há uma **contração** da expansão<sup>2,9,21</sup>. Observou-se também que as contrações ocor-

rem mais frequentemente na transmissão de origem paterna (cerca de 10%) do que de origem materna (cerca de 3%). Além disso, as maiores expansões paternas têm maior tendência a se contrair durante a transmissão.

Os dados sugerem que existe um limite no número de repetições CTG em espermatozoides viáveis, isto é, haveria uma seleção contra espermatozoides com expansões acima de um determinado tamanho<sup>40</sup>. Isto explicaria porque descendentes de pais com expansões maiores do que 1.5kb tendem a ter expansões menores do que seus pais afetados. Além disso, homens com expansões grandes são frequentemente estéreis impedindo portanto a transmissão destas para as gerações sucessivas.

### Heterogeneidade genética

Na maioria das famílias (cerca de 98%) com afetados pela DMS, o estudo molecular confirma tratar-se do gene DM-PK. Entretanto, já foi mapeado um outro gene, em 3q, em uma família com vários afetados e quadro clínico muito semelhante a DMS. Este gene foi classificado como DM2 (ou DMS2)<sup>67</sup>. Embora seu produto ainda não foi identificado, a observação de antecipação clínica sugere tratar-se também de um gene dinâmico.

Portanto, em afetados onde não for encontrada expansão (CTG) no gene DM-PK é importante suspeitar-se de heterogeneidade genética.

Outras doenças onde ocorre miotonia incluem a miotonia de Thomsen, e a paramiotonia congênita mas o diagnóstico diferencial é muitas vezes possível através de estudos clínicos e/ou genéticos (modo de herança)<sup>55</sup>.

O diagnóstico diferencial pode ser mais difícil em relação a miopatia miotônica proximal (proximal myotonic myopathy ou PROMM) cuja herança também é autossômica dominante. Entretanto alguns sinais clínicos (tais como o comprometimento intelectual) não são observados em pacientes com PROMM, o que pode ajudar na classificação clínica. Ainda não se sabe se a PROMM e a DMS2 são condicionados pelo mesmo gene.

### Diagnóstico molecular e Aconselhamento Genético

Em indivíduos clinicamente afetados, o diagnóstico molecular só pode ser confir-

mado por técnica de Southern blot pois expansões grandes não são visíveis através de PCR. Nas pessoas em risco (assintomáticas) o diagnóstico molecular pode ser iniciado por técnica de PCR e de acordo com os resultados, confirmado através de técnica de Southern blot. Por exemplo, em indivíduos normais, que são heterozigotos para o número de repetições CTG, observam-se duas bandas nítidas através de técnica de PCR. Entretanto, uma única banda pode ser observada tanto em indivíduos normais homozigotos (isto é, onde os dois alelos têm o mesmo número de repetições CTG) como em indivíduos afetados (pois alelos expandidos não são visualizados pela técnica de PCR).

Portanto, toda vez que for observada uma única banda em um caso suspeito, o resultado precisa ser confirmado por técnica de Southern blot.

O Aconselhamento Genético em famílias de afetados é complexo pois a confirmação do diagnóstico, principalmente em indivíduos assintomáticos ou pouco afetados é dificilmente aceita e o apoio psicológico é muitas vezes necessário. Por outro lado, o diagnóstico precoce é importante para prevenir as complicações cardíacas que são frequentes nos afetados. Além disso, é importante alertar mulheres portadoras do alelo mutado em relação ao maior risco de ter descendentes com a forma congênita grave.

O diagnóstico pré-natal também é possível através da análise da expansão CTG em DNA extraído de vilosidades coriônicas. Entretanto, não é possível prever qual será a gravidade do quadro clínico em um feto portador da mutação particularmente levando-se em conta a grande heterogeneidade somática no tamanho da expansão.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS E ASPECTOS ÉTICOS**

Como acabamos de ver, o sequenciamento do GENOMA HUMANO ainda trouxe poucas novidades em relação as doenças genéticas mais importantes como a hemofilia, as distrofias musculares, a mucoviscidose cujos genes já eram conhecidos. Entretanto, os novos conhecimentos vão nos ajudar a entender como nossos genes interagem entre si e com o ambiente o que vai ser fun-

damental para o desenvolvimento de novas terapias. A terapia gênica, isto é, a substituição de um gene defeituoso por sua cópia normal, talvez demore um pouco. Entretanto, recentemente, descobriu-se que células sanguíneas ainda imaturas (*stem cells* ou **células tronco**) presentes por exemplo na medula óssea ou no cordão umbilical de um recém-nascido podem manter a capacidade de diferenciar-se em outros tecidos como o muscular ou nervoso. Esta descoberta abre novas esperanças de tratamento para inúmeras doenças degenerativas como as distrofias musculares pois permitirá que células normais de um doador externo (transplante heterólogo) ou que células modificadas do próprio indivíduo doentes (transplante autólogo) sejam capazes de atingir todos os órgãos e tecidos afetados através da corrente sanguínea.

Por um lado, saber que temos predisposição genética para certos tipos de câncer, hipertensão ou diabetes pode ser muito importante para futuros tratamentos e com certeza a medicina será muito mais preventiva do que é hoje. Uma outra área que promete revolucionar a medicina será a **farmacogenética**, que estuda porque temos reações tão diferentes a drogas, indo desde uma ausência de resposta até reações tão adversas que podem causar óbito. É o caso, por exemplo da hipertermia maligna, uma reação violenta a certos anestésicos que causa uma morte rápida se não houver uma intervenção imediata. No futuro próximo, ao invés de sermos cobaias cada vez que experimentamos uma medicação nova, os remédios serão receitados de acordo com o perfil genético de cada um.

Por outro lado, enquanto procura-se a cura definitiva para estas doenças, prevenir o nascimento de novos afetados é fundamental principalmente para as doenças graves e irreversíveis, incompatíveis com uma vida normal. Neste sentido, o número de testes genéticos disponíveis vem aumentando dia a dia. Casais ou famílias que já tiveram filhos ou parentes afetados por uma doença genética podem, através de testes genéticos, saber se correm o risco de vir a ter outros descendentes com o mesmo problema e planejar a sua futura prole de acordo. Os casais em risco que desejam ter seus próprios filhos mas não querem colocar no mundo uma criança destinada a uma vida de sofrimento, podem submeter-se ao diagnóstico pré-natal.

Este permite diagnosticar ao redor da décima semana de gestação se o feto herdou o gene mutado. Ao contrário do que se imagina, o DPN de certeza tem salvado muitas vidas normais no caso de casais que optariam por interromper uma gestação no caso de dúvida. Neste sentido, é fundamental que a nossa legislação acompanhe os avanços científicos e apoie a interrupção médica da gestação em casos de fetos com doenças genéticas graves e irreversíveis.

Entretanto, a possibilidade de testar-se um número cada vez maior de genes e o interesse comercial trazem questões éticas que devem ser discutidas por toda a sociedade. Por exemplo, é um consenso internacional que não se deve testar crianças assintomáticas para doenças genéticas de início tardio para as quais ainda não há tratamento, como por exemplo, a Coreia de Huntington, a doença de Alzheimer, as distrofias musculares de início tardio ou as degenerações es-

pino-cerebelares. Isto porque, **ao testar uma criança estamos tirando-lhe o direito de decidir quando adulta se quer ou não ser testada.** E em relação aos adultos? Qual é a vantagem de sabermos que somos portadores de uma mutação para uma doença grave, de início tardio ainda sem tratamento? As companhias de seguro saúde e os nossos empregadores certamente gostariam de saber de antemão qual é o nosso perfil genético. Cabe a nós, lutar para preservar os aspectos éticos e o direito de decidir se queremos ou não ser testados. Os resultados de um teste genético não mudam com o tempo e seu impacto pode influenciar o futuro de uma pessoa ou de toda uma família. Por isso, antes de submeter-nos a qualquer teste genético as questões que se colocam são: Para o que estamos sendo testados? O que significa um resultado positivo? O que significa um resultado negativo? **Qual é a vantagem de sermos testados?**

Zatz, M.: O Estudo do genoma humano contribuindo para a compreensão, o diagnóstico e a prevenção de doenças genéticas: o exemplo das doenças neuromusculares. *Rev Med, São Paulo*, 80(1):24-40, jan./fev./mar., 2001.

**ABSTRACT:** The announcement of the finishing of the Human Genome will start to bring many responses related to the molecular aspect of diverse diseases but also it will bring many questions as: Which is the benefit for the Medicine in studying the genes? Which is the involved ethical aspects? Which are the real perspectives ahead of this discovery? To study genetic illnesses assists the study of the genes even though in its ethical aspect, exactly in view of that the Human Genome has brought little of new developments for the main genetic illnesses, since its genes already were known. Here the example of the Neuromusculares Illnesses will be shown, more accurately the Muscular Dystrophies, since its genetic and molecular aspects until its different presentations, its diagnosis, the factors of risk and the involved questions in the genetic counseling.

**KEYWORDS:** Muscular Dystrophies/diagnosis; Muscular Dystrophies/classification; Muscular Dystrophies/genetics; Diagnosis, Differential; Genetic Counseling.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abe, K., Fujimura, H., Toyooka, K. *et al.* (1994) Involvement of central nervous system in myotonic dystrophy. *J. Neurol. Sci.*, **127**,179-185.
2. Abeliovich, D., Lerer, I.; Pashut-Lavon, I. *et al.* (1993) Negative expansion of the myotonic dystrophy unstable sequence. *Am.J.Hum.Genet.*, **52**, 1175-1181.
3. Anderson LVB, Davison K, Moss JÁ, Richard I, Fardeau M, Tomé FMS, Hubner C, Lasa A, Colomer J, Beckmann JS. Characterization of monoclonal antibodies to calpain 3 and protein expression in muscle from patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Am J Pathol* 153:1169-1179, 1998.
4. Anderson LVB, Davison K, Moss JÁ, Young C, Cullen MJ, Walsh J, Johnson MA, Bashir R, Britton S, Keers S, Argov Z, Mahjneh I, Fougousse F, Beckmann JS, Bushby K (1999): Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Hum. Molec. Genet* 8:855-861.
5. Anvret, M., Ahlberg, G., Grandell, U. *et al.* (1993) Larger expansions of the CTG

- repeat in muscle compared to lymphocytes from patients with myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **2**, 1397-1400.
6. Ashizawa, T., Dunne, C.J., Dubel, J.R., *et al.* (1992a) Anticipation in myotonic dystrophy I. Statistical verification based on clinical and haplotype findings. *Neurology*, **42**, 1871-1877.
  7. Ashizawa, T., Dubel, J.R., Dunne, P.W. *et al.* (1992b) Anticipation in myotonic dystrophy. II. Complex relationships between clinical findings and structure of the GCT repeat. *Neurology*, **42**, 1877-1883.
  8. Ashizawa, T., Dubel, J.R. and Harati, Y. (1993) Somatic instability of CTG repeat in myotonic dystrophy. *Neurology*, **43**, 2674-2678.
  9. Ashizawa, T., Anvret, M., Baiget, M. *et al.* (1994a) Characteristics of intergenerational contractions of the CTG repeat in myotonic dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.*, **54**, 414-423.
  10. Ashizawa, T., Dunne, P.W., Ward, P.A. *et al.* (1994b) Effects of the Sex of myotonic dystrophy patients on the unstable triplet repeat in their affected offspring. *Neurology*, **44**, 120-122.
  11. Aslanidis, C., Jansen, G., Amemiya, C. *et al.* (1992) Cloning of the essential myotonic dystrophy region and mapping of the putative defect. *Nature*, **355**, 548-551.
  12. Azibi, K., L. Bachner, J.J.S. Beckmann, K. Matsumura, E. Hamouda, M. Chaouch, A.R. Chaouch, R. Ait-Ouarab, A. Vignal, J. Weissenbach, M-C. Vinet, F. Leturcq, H. Collin, F.M.S. Tomé, M. Fardeau, K.P. Campbell, J-C Kaplan. Severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy with the deficiency of the 50 kDa dystrophin-associated glycoprotein maps to chromosome 13q12. *Hum. Mol. Genet.* **2** (1993) 1423-1428
  13. Baghdiguian S, Martin M, Richard I, Pons F, Astier C, Bourg N, Hay RT, Chemaly R, Halaby G, Loiselet J, Anderson LVB, Lopez de Munain A, Fardeau M, Mangeat P, Beckmann JS & Lefranc G (1999) Calpain 3 deficiency is associated with myonuclear apoptosis and profound perturbation of the I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B pathway in limb-girdle muscular dystrophy type 2. *Nature Medicine* **5**:503-511
  14. Bashir R, Britton S, Stratchan T, Keers S, Vafiadaki E, Richard I, Marchan S, Bourg N, Argov Z, Sadeh M, Mahjneh I, Marroni G, Passos-Bueno MR, Moreira ES, Zatz M, Beckmann JS, Bushby K (1998): A novel mammalian gene related to the *C. elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2B (LGMD2B). *Nature Genetics* **20**:37-42
  15. Beckmann JS, Richard I, Hillaire D, Broux O, Antignac C, Bois E, Cann H, Cottingham Jr RW, Feingold N, Feingold J, Kalil J, Lathrop GM, Marcadet A, Masset M, Mignard C, Passos-Bueno MR, Pellerain N, Zatz M, Dausset J, Fardeau M, Cohen D. (1991): A gene for limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 15 by linkage. *C R Acad Sci Paris*, t. 312, série III, p. 141-148.
  16. Ben Othmane, K., M. Ben Hamida, M. A. Pericak-Vance, C. Ben Hamida, S. Blel, S.C. Carter, A M. Bowcock, K. Petruhkin, T.C. Gilliam, A D. Roses, F. Hentati, J.M. Vance. Linkage of Tunisian autosomal recessive Duchenne-like muscular dystrophy to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nature Genet.* **2** (1992) 315-317.
  17. Bonnemann, C.G., R. Modi, S. Noguchi, Y. Mizuno, M. Yoshida, E. Gussoni, E.M. McNally, D.J. Duggan, C. Angelini, E.P. Hoffman, E. Ozawa, L.M. Kunkel. (1995). b-sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nature Genetics*, **11**: 266-273.
  18. Bonnemann C, Passos-Bueno MR, McNally EM, Vainzof M, Moreira ES, Marie SK, Pavanello RCM, Noguchi S, Ozawa E, Zatz M, Kunkel L (1996) Genomic screening for b-sarcoglycan mutations: missense mutations may cause severe limb-girdle muscular dystrophy type 2E (LGMD2E) *Hum. Molec. Genet.* **5** (12): 1953-1962.
  19. Brewster B, Groenen P, Wieringa B (1998): Myotonic dystrophy: clinical and molecular aspects. In *Neuromuscular disorders: Clinical and Molecular Genetics* (Emery A.E.H., Editor): John Wiley & Sons, New York
  20. Brook, J.D., McCurrach, M.E., Harley, H.G. *et al.* (1992) Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end

- of transcript encoding a protein kinase family member. *Cell*, **68**, 799-808.
- Brunner, H.G. (1993) Genetic studies in myotonic dystrophy. Thesis, University of Nijmegen.
21. Brunner, H.G., Brüggewirth, H.T., Nillesen, W. *et al.* (1993a) Influence of Sex of the transmitting parent as well as of parental allele size on the CTG expansion in myotonic dystrophy (DM). *Am. J. Hum. Genet.*, **53**, 1016-1023.
  22. Bushby K (1999): Making sense of the limb-girdle muscular dystrophies. *Brain* 122:1403-1420
  23. Buxton, J., Shelbourne, P., Davies, J. *et al.* (1992) Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy. *Nature*, **355**, 547-548.
  24. Carey N, Johnson K, Nokelianem P *et al.* (1994): Meiotic drive at the myotonic dystrophy locus? *Nature genetics* 6:17-18.
  25. Chakraborty, R., Stivers, D.N., Deka, R. *et al.* (1996) Segregation distortion of the CTG repeats at the myotonic dystrophy locus. *Am. J. Hum. Genet.*, **39**, 109-118.
  26. Cobo, A.M., Baiget, M., Lopez de Munain, A, *et al.* (1993) Sex-related difference in intergenerational expansion of myotonic dystrophy gene. *Lancet*, **341**, 1159-1160.
  27. Emery, A. E. H. (1993) Duchenne muscular dystrophy, 2d ed. Oxford University Press, Oxford and New York, pp. 25-45.
  28. Ervasti JM, Campbell KP. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 1991; **66**: 1-20.
  29. Fu, Y.-H., Pizzuti, A, Fenwick, R.G. *et al.* (1992) An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science*, **255**, 1256-1258
  30. Gennarelli M, Dallpaiccola B, Baiget M, Martorell L, Novelli G (1994) Meiotic drive at the myotonic dystrophy locus. *J. Med. Genet.* 31:980
  31. Goldman, A, Ramsay, M. and Jenkins, T. (1994) Absence of myotonic dystrophy in southern African Negroids is associated with a significantly lower number of CTG trinucleotide repeats. *J. Med. Genet.* **31**, 37-40.
  32. Harley, H.G. Book, D.J., Rundle, S.A *et al.* (1992 a) Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in myotonic dystrophy. *Nature*, **355**, 545-546.
  33. Harper, P.S. and Dyken, P.R. (1972) Early onset dystrophia myotonica – evidence supporting a maternal environmental factor. *Lancet*, **2**, 53-55.
  34. Harper, P.S. (1989) Myotonic Dystrophy, 2nd edn. W.B. Saunders Co., London, Philadelphia, Toronto, Sydney, Tokyo.
  35. Harper, P.S., Harley H.G., Reardon, W. and Shaw, D.J. (1992) Anticipation in myotonic dystrophy: new light on an old problem. *Am. J. Hum. Genet.*, **51**, 10-16.
  36. Hoffman, EP; Brown, RH; Kunkel, LH.(1987) Dystrophin: the Protein Product of the Duchenne Muscular Dystrophy Locus. *Cell* 51, 919-928.
  37. Hoffman, E.P.; Fischbeck, K.H.; Brown, R.H.; Johnson, M.; Medori, R.; Loike, J.D.; Harris, J.B.; Waterston, R.; Brooke, M.; Specht, L.; Kupsky, W.; Chamberlain, J.; Caskey, T.; Shapiro, F.; Kunkel, L.M.(1988) - Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *N.Engl.J.Med.*, 318: 1363-1368.
  38. Ikeuchi T, Igarashi S, Takiyama Y *et al.* (1996): Non-Mendelian transmission in dentatorubral-pallidolusian atrophy and Machado-Joseph disease: the mutant allele is preferentially transmitted in male meiosis. *Am.J.Hum.Genet.* 58:730-3.
  39. Iughetti P, Zatz M, Passos-Bueno MR, Marie SK (1996) Different origin of mutations for the Machado-Joseph Locus (MJD1). *J. Med. Genet.* 33:439-440
  40. Jansen, G., Willems, P., Coerwinkel, M. *et al.* (1994) Gonosomal mosaicism in myotonic dystrophy patients: involvement of mitotic events in (CTG)<sub>n</sub> repeat variation and selection against extreme expansion in sperm. *Am. J. Hum. Genet.*, **5**, 575-585.
  41. Koenig, M.; Hoffman, E.P.; Bertelson, C.J.; Monaco, A.P.; Feener, C.; Kunkel, L.M.(1987) Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*, 50:509-517.
  42. Koenig, M.; Beggs, A.H.; Moyer, M.; Scherpf, S. (1989) The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: Correlation of severity with

- type of deletion. *Am. J. Hum. Genet.*, 45:498-506.
43. Lavedan, C., Hofman-Radvanyi, H., Shelbourne, P. *et al.* (1993b) Myotonic dystrophy: SIZE AND Sex-dependent dynamics of CTG meiotic instability and somatic mosaicism. *Am. J. Hum. Genet.*, **52**, 875-883.
  44. Lim, L.E., Duclos, f., Broux, O., Bourg, N., Sunada, Y., Allamand, V., Meyer, J., Richard, I., Tomé, F. Fardeau, M., Moomaw, C., Slaughter, C., Jackson, C.E., Beckmann, J.S. Campbell, K.P. (1995) b-sarcoglycan (43 DAG): Characterization and involvement in a recessive form of limb-girdle muscular dystrophy linked to chromosome 4q12. *Nature Genetics*, **11**, 257-265.
  45. Lindlöf, M.; Kiuru, A.; Kaariaenin, H.; Kalimo, H.; Lang, H.; Pihko, H.; Rapola, J.; Somer, H.; Somer, M.; Savonters, M.L. & De La Chapelle, A. (1989) - Gene Deletions in X-linked Muscular Dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.*, **44**: 496-503.
  46. Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C, Serrano C *et al.* Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb-girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 20: 31-36, 1998.
  47. Lunt PW, Jardine PE, Koch MC, Maynard J, Osborn M, Williams M, Harper PS, Upadhyaya M (1995): Correlation between fragment size at D4f104S and age at onset or at wheelchair use with a possible generational effect accounts for much phenotypic variation in 4q35-facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *Hum. Molec. Genet* 4:951-958.
  48. Mahadevan, M., Tsifidis, C., Sabourin, L. *et al.* (1992) Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3'untranslated region of the gene. *Science*, **255**, 1253-1255.
  49. Martorell, L., Martinez, J.M., Carey, N. *et al.* (1995) Comparison of CTG repeat length expansion and clinical progression of myotonic dystrophy over a five year period. *J. Med. Genet.*, **32**, 593-596.
  50. McNally E, Passos-Bueno MR, Bonnemann C, Vainzof M, Moreira ES, Lidov HGW, Othmane KB, Denton PH, Vance JM, Zatz M, Kunkel LM (1996) Mild and severe muscular dystrophy caused by a single g-sarcoglycan mutation. *Am. J. Hum. Genet.* 59:1040-1047
  51. Monaco, A; Bertelson, C; Liechti-Gallati, SHM; Kunkel, LM.(1988) An Explanation for the Phenotypic Differences Between Patients Bearing Partial Deletions of the DMD locus. *Genomics* 2, 90-95.
  52. Moreira ES, Vainzof M, Marie SK, Sertié A, Zatz M, Passos-Bueno MR (1997) The seventh form of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy (LGMD2G) is mapped at 17q11-12. *Am. J. Hum. Genet* 61:151-159
  53. Moreira ES, Vainzof M, Marie SK, Nigro V, Zatz M, Passos-Bueno MR (1998) A first missense mutation in the d-sarcoglycan gene associated with a severe phenotype and frequency of limb-girdle muscular dystrophy type 2F (LGMD2F) among Brazilian sarcoglycanopathies. *J. Med. Genet.* 35:951-953
  54. Moreira ES, Wiltshire TJ, Georgine Faulkner G, Antje Nilforoushan A, Mariz Vainzof M, Suzuki OT, Valle G, Reeves R, Zatz M, Passos-Bueno MR, Jenne DE (2000) ) Limb-Girdle muscular dystrophy type 2G (LGMD2G) is caused by mutations in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin. *Nature Genetics* 24: 163-166
  55. Moxley, R.T.(1996) Proximal myotonic myopathy: mini review of a recently delineated clinical disorder. *Neuromusc. Disord.*, **6**, 87-93.
  56. *Neuromuscular Disorders* 10 (2000): I-VIII.
  57. Nigro V, Moreira ES, Piluso G, Vainzof M, Belsito A, Politano L, Puca AA, Passos-Bueno MR & Zatz M (1996) The 5q autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy (LGMD2F) is caused by a mutation in the d-sarcoglycan gene. *Nat. Genet.* 14:195-196
  58. Novelli, G., Gennarelli, M., Menegazzo, E. *et al.* (1993a) (CTG)<sub>n</sub> triplet mutation and phenotype manifestations in myotonic dystrophy patients. *Biochem. Med. Metab. Biol.*, **50**, 85-92.
  59. Passos-Bueno MR, Lima MABO, Zatz M (1990): Estimate of germinal mosaicism in Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet* 27: 727-728.
  60. Passos-Bueno MR, Bakker E, Kneppers ALJ, Takata RI, Rapaport D, den Dunnen

- JT, Zatz M, van Ommen GJB (1992): Mosaicism for Duchenne muscular dystrophy mutations: New recurrence risk estimates based on the deletion site in the gene. *Am J Human Genet* 51:1150-1155
61. Passos-Bueno MR, Vainzof M, Marie SK, Zatz M (1994): Half the dystrophin gene is apparently enough for a mild clinical course: confirmation of its potential use for gene therapy. *Hum. Molec. Genet.* 3: 919-922.
  62. Passos-Bueno MR, Cerqueira A, Vainzof M, Marie SK, Zatz M (1995): Myotonic dystrophy: genetic, clinical and molecular analysis of patients from 41 Brazilian families. *J. Med. Genet.* 32:14-19.
  63. Passos-Bueno MR, Moreira ES, Marie SK, Bashir R, Vasquez L, Love DR, Vainzof M, Iughetti P, Oliveira JR, Bakker E, Strachan T, Bushby K, Zatz M (1996): Main clinical features for the three mapped autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies and estimated proportion of each form in 13 Brazilian families. *J. Med. Genet.* 33: 97-102
  64. Passos-Bueno MR, Moreira ES, Vainzof M, Chamberlain J, Marie SK, Pereira L, Akiyama J, Roberds SL, Campbell KP, Zatz M (1995): A common missense mutation in three unrelated Brazilian families with a relatively mild form of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy. *Hum. Molec. Genet.* 4:1163-1167.
  65. Passos-Bueno MR, Moreira ES, Vainzof M, Marie SK, Zatz M (1996): Linkage analysis in autosomal recessive muscular dystrophy (AR LGMD) maps a sixth form to 5q33-34 (LGMD2F) and indicates that there is at least one more subtype of ARLGMD. *Hum. Molec. Genet* 5: 815-820.
  66. Passos-Bueno MR, Vainzof M, Moreira ES, Zatz M (1999) The seven autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies (LGMD): from lgmd2a to lgmd2g. *Am. J. Med. Genet* 82:392-398
  67. Ranum LPW, Rasmussen PF, Benzow KA, Koob MD, Day JW (1998): Genetic mapping of a second myotonic dystrophy locus. *Nature Genetics* 19: 196-198
  68. Rapaport D, Passos-Bueno MR, Brandão L, Love D, Vainzof M, Zatz M (1991): Apparent association of mental retardation and specific patterns of deletions screened with probes cf56a e cf23a in Duchenne muscular dystrophy *Am J Med Genet*; 39: 437-441.
  69. Rapaport D, Passos-Bueno MR, Takata RI, Campiotto, S, Eggers S, Vainzof M, Makover A, Nudel U, Yaffe D, Zatz M. (1992): A deletion including the brain promoter of the Duchenne muscular dystrophy gene is not associated with mental retardation. *Neuromuscular Disorders* 2: 117-120.
  70. Richard I, Broux O, Allamand V, Fougereuse F, Chiannilkulchai N, Bourg N, Brenguier L, Devaud C, Pasturaud P, Roudaut C, Hillaire D, Passos-Bueno MR, Zatz M, Tishfield JA, Fardeau M, Jackson CE, Cohen D, Beckmann J (1995). Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* 81: 27-40.
  71. Richard I, Roudaut C, Saenz A, Pogue R, Grimbergen JEMA, Anderson LVB, Beley C, Cobo A-M, Diego C, Eymard B, Gallano P, Ginjaar HB, Lasa A, Pollitt C, Topaloglu H, Urtziberea JÁ, Visser M, van der Kooi A, Bushby K, Bakker E, Lopez de Munain A, Fardeau M, Beckmann JS (1999): Calpainopathy-a survey of mutations and polymorphisms. *Am.J.Hum.Genet.* 64:1524-1540
  72. Roberds SL, Leturcq F, Allamand V, Piccolo F, Jeanpierre M, Anderson RD, Lim LE, Lee JC, Tomé FMS, Romero NB, Fardeau M, Beckmann JS, Kaplan JC, Campbell KP (1994): Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell* 78:625-633.
  73. Spencer MJ, Tidball JG, Anderson LVB, Bushby K, Harris JB, Passos-Bueno MR, Sommer H, Vainzof M, Zatz M (1997): Absence of calpain 3 in a form of limb-girdle muscular dystrophy (LGMD2A). *J. Neurol. Sci.* 146: 173-178
  74. Takata Reinaldo: Estudos de deleções moleculares com sondas de cDNA ao longo do gene da distrofina, Memória de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.
  75. Thornton, C.A, Johnson, K. and Moxley, R.T. (1994) Myotonic dystrophy patients have larger CTG expansions in skeletal muscle than in leukocytes. *Ann.Neurol.*, 35, 104-107.
  76. Vainzof M, Pavanello RCM, Pavanello I, Hoffman EP, Passos-Bueno MR, 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.
77. Vainzof M, Passos-Bueno MR, Takata RI, Pavanello RCM, Zatz M (1993a): Intrafamilial variability in dystrophin abundance correlated with difference in the severity of the phenotype *J.Neurol.Sci.*: 119:38.
  78. Vainzof M, Passos-Bueno MR, Takata RI, Pavanello RCM, Zatz M(1993b): Is the maintainance of the C-terminus domain of dystrophin enough to ensure a milder Becker muscular dystrophy phenotype? *Human Molecular Genetics* 2 (1) 39-42.
  79. Vainzof M, Passos-Bueno MR, Canovas M, Moreira ES, Pavanello RCM, Marie SK, Anderson LVB, Bonneman CG, McNally E, Nigro V, Kunkel LM, Zatz M (1996) The sarcoglycan complex in the six autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Hum. Molec. Genet.* 5 (12): 1963-1970.
  80. Vainzof M, Passos-Bueno MR, Pavanello RCM, Marie SK, Oliveira ASB, Zatz M (1999) Sarcoglycanopathies are responsible for 68% of severe autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in the Brazilian population. *J. Neurol. Sciences* 164:44-49
  81. Vainzof M, Moreira ES, Ferraz G, Passos-Bueno MR, Marie SK, Zatz M (1999) Further evidences for the organization of the four sarcoglycans proteins within the dystrophin-glycoprotein complex. *European Journal of Human Genetics* 7: (2) 251-254
  82. Van Deutekom, JCT (1996): Ph.D. Thesis, University of Leiden, Leiden, Netherlands
  83. Weiler T, Greenberg CR, Zelinski T, Nylen E, Coghlan G, Crumley MJ, Fujiwara TM *et al.* A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in Manitoba Hutterites maps to chromosome region 9q31-33: evidence for another limb-girdle muscular dystrophy locus. *Am J Hum Genet* 63: 140-147, 1998.
  84. Wijmenga, C.; Frants, R. R.; Brouwer, O. F.; Moerer, P.; Weber, J. L.; Padberg, G. W. Location of fascioscapulohumeral muscular dystrophy gene on chromosome 4. *Lancet* 336: 651-653, 1990.
  85. Wijmenga, C.; Hewitt, J. E.; Sandkuijl, L. A.; Clark, L. N.; Wright, T. J.; Dauwerse, H. G.; Gruter, A. M.; Hofker, M. H.; Moerer, P.; Williamson, R.; Van Ommen, G-JB; Padberg, G. W.; Frants, R. R. Chromosome 4q DNA rearrangements associated with fascioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nature Genetics* 2: 26-30, 1992.
  86. Zatz M, Passos-Bueno MR, Rapaport D (1989): Estimate of the proportion of Duchenne muscular dystrophy with autosomal inheritance. *Am J Med Genet* 32:407-410.
  87. Zatz M, Frota-Pessoa O, Levy JA, Peres CA (1976): Creatine - phosphokinase (CPK) activity in relatives of patients with X-linked muscular dystrophies: a Brazilian study. *J Genet Hum*, 24(2): 153-168.
  88. Zatz, M; Lange, K; Spence, MA. Frequency of Duchenne Muscular Dystrophy Carriers. *Lancet*, I, 759, 1977.
  89. Zatz M, Vianna-Morgante AM, Campos P, Diamant AJ (1981): Translocation (X;6) in a female with Duchenne muscular dystrophy: implications for the localisation of the DMD locus. *J Med Genet*, 18(6): 442-447.
  90. Zatz M, Marie SK, Passos-Bueno MR, Campiotto S, Cerqueira A, Vainzof M, Wijmenga C, Padberg G, Frants R (1995). High proportion of new mutations and possible anticipation following genetic molecular studies in Brazilian facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) families. *Am. J. Hum. Genet.* 56:99-105.
  91. Zatz M, Passos-Bueno MR, Cerqueira A, Marie S, Vainzof M, Pavanello RCM (1995): Analysis of CTG repeat in skeletal muscle of myotonic dystrophy young and adult patients: when does the expansion occur? *Hum. Molec. Genet.*, 4: 401-406.
  92. Zatz M, Passos-Bueno MR, Cerqueira A, Vainzof M (1996): CTG repeat length in muscle from patients with myotonic dystrophy. *J. Med. Genet.* 33:173-176.
  93. Zatz M, Cerqueira A, Vainzof M, Passos-Bueno MR (1997) Segregation distortion of the CTG repeats at the myotonic dystrophy (DM) locus: new data from Brazilian DM families. *J. Med. Genet.* 34: 790-791
  94. Zatz M, Marie SK, Cerqueira A, Vainzof M, Pavanello RCM, Passos-Bueno MR (1998) The fascioescapulohumeral muscular dystrophy (FSHD1) gene affects

- more severely and more frequently males than females. Am.J. Med.Genet. 77: 155-161.
95. Zatz M, Vainzof M, Passos-Bueno MR (2000). Limb-girdle muscular dystrophy: one gene with different phenotypes; one phenotype with different genes. Current Opinion in Neurology: 13:511-517.
96. Zatz M, Vainzof M, Passos-Bueno MR (2001) Serum Creatine-Kinase (Ck) In Progressive Muscular Dystrophies in *Methods in Molecular Medicine* (no prelo)

Recebido para publicação em 02.2001

Aceito para publicação em 03.2001

---

### Agradecimentos

Gostaríamos de expressar nossos profundos agradecimentos as seguintes pessoas, pela inestimável colaboração, convívio e companheirismo de muitos anos: Dra. Mariz Vainzof, Dra. Maria Rita Passos-Bueno, Dra. Rita de Cássia Pavanello, Dr. Ivo Pavanello, Antonia Cerqueira, Marta Canovas e Constanca Urbani. Este trabalho foi financiado pela FAPESP, CNPq e PRONEX