

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**Caracterização do diagnóstico clínico e detecção de portadoras
de deleções no gene da Distrofia Muscular de Duchenne/Becker
no Rio Grande do Sul por PCR quantitativo em tempo real**

Carolina Rosa Franco

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Genética e Biologia
Molecular da UFRGS como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre

Orientador Prof. Dr. Roberto Giugliani

Porto Alegre, julho de 2007

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

- Associação de Assistência à Criança Deficiente – AACD

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

- Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS

Faculdade de Biociências – FaBio

Laboratório de Genética e Biologia Molecular – LabGen

- Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA

Serviço de Genética Médica – SGM

Laboratório de Identificação Genética – LIG

Fundo de Incentivo à Pesquisa – FIPE

AGRADECIMENTOS

Tenho muitos agradecimentos a fazer, então vou fazer em partes e espero não esquecer de ninguém que me ajudou a construir esta dissertação.

Agradeço ao meu orientador, o Prof. Dr. Roberto Giugliani, que sempre esteve lá para me auxiliar em dificuldades que encontrei pelo caminho, mesmo estando do outro lado do mundo. Quero agradecer-lhe por ter aceitado o convite de me orientar, a pedido da Profa. Dra. Clarice Alho, após entrada no programa e desde já também quero me desculpar pelos tropeços que enfrentei. Além do Dr. Giugliani, este trabalho não teria sido realizado sem o auxílio da Profa. Dra. Maria Luiza Saraiva Pereira, a chefe do Laboratório de Identificação Genética (LIG) que me acolheu e me permitiu trabalhar com a sua equipe. Apesar dos desentendimentos e dificuldades conseguimos conquistar mais esta etapa com sucesso. A Dra. Ursula Matte também foi peça fundamental no auxílio da elaboração deste projeto e para os passos iniciais que ele tomou.

Encontro dificuldade em saber como agradecer a Profa. Dra. Clarice Sampaio Alho que me acolheu durante a graduação e serviu de mãe na minha caminhada científica até os dias de hoje. Já passamos por mais de seis anos de pesquisa científica juntas e não sei se ela sabe o quanto ela significa para mim. E agora, durante o meu mestrado, o seu trabalho desenvolvido em 1995 foi de imenso auxílio para que este trabalho fosse realizado.

Quero agradecer a AGADIM (Associação Gaúcha de Distrofias Musculares) pelo auxílio e retorno, em especial a Marisa Fontoura, que esteve junto comigo nos momentos iniciais das minhas buscas por mães para

participarem deste estudo. Em especial quero agradecer a todas as mães da qual eu tive contato e vivenciei junto esta batalha, que é ter um filho com DMD/BMD. Com certeza elas são muito fortes e guerreiras, pois sempre estão em busca do melhor para os seus filhos. Além de todo o apoio da AGADIM, a AACD (Associação de Assistência à Criança Deficiente) também me auxiliou largamente para a realização deste trabalho. O serviço que eles prestam para toda a comunidade é maravilhoso e quero agradecer em especial à Dra. Rosane, à Sabrina e ao Altamiro pelo auxílio e disponibilidade em me ajudar a buscar informações referentes aos pacientes com DMD/BMD, sempre com muita disposição e bom humor.

Eu não poderia deixar de lado os meus colegas de mestrado, especialmente a Priscilla Prestes, a Deise Friedrich, a Fernanda Spies, a Vanessa Emmel, a Francine Marques, o Tiago Dalberto e o Matias Melendez pelos encontros e debates científicos acalorados que me proporcionaram, além dos encontros amigáveis para se distrair e conversar sobre o andamento dos projetos. Vocês foram o apoio necessário para que este trabalho fosse realizado, sempre com palavras amigas e solidárias, fazendo com que esta jornada fosse a mais agradável possível.

Preciso também agradecer aos meus colegas de laboratório, tanto da PUCRS, do LabGen, quanto do SGM-HCPA, do Laboratório de Identificação Genética. Todos foram muito amigáveis e acolhedores nos momentos em que mais precisei, ensinando-me detalhes importantes de etapas imprescindíveis para o meu trabalho. Todos sabem que o seu papel foi mais do que necessário para a realização deste projeto.

Certamente não poderei de deixar de agradecer minhas amigas Lulus que me conhecem desde minha pré-adolescência e serviram como válvula de escape em momentos em que precisei, seja um ombro amigo ou somente para se distrair, sempre me dando força para continuar meus estudos. Andréia Silveira, Carolina Zimmer, Aline Pündrich, Leandro Di Domenico e Viviane Vergottini obrigado pelo apoio que sempre me deram, adoro vocês!

Agradeço aos meus pais que sempre prezaram o ensino como um meio para conquistarmos os nossos sonhos. Muito obrigado pelo conforto do lar, do sustento durante estes 24 anos da minha vida e pelo carinho e palavras amigas. Sem o incentivo e a força que me deram, muito não teria sido conquistado.

Além dos meus pais, também tenho que agradecer os meus irmãos que sempre me serviram de exemplo nesta caminhada acadêmica. Agradeço ao meu irmão mais velho, Eduardo, por acreditar em mim, e ao do meio, Alexandre, por servir de abre-alas para outros caminhos que irei trilhar. E também à minha cachorrinha Luna que serviu de minha companheira neste último ano.

Quero agradecer ao meu namorado Carlos Hiroshi que esteve sempre ao meu lado, me incentivando, me empurrando e ocasionalmente puxando as minhas orelhas. Tenho certeza que parte desta dissertação não teria sido realizada sem o auxílio dele. Obrigado pelos momentos juntos e pela compreensão pelos momentos separados, devido ao trabalho. Você é a minha inspiração para tudo o que faço, pois sem ti tudo teria sido muito mais difícil.

SUMÁRIO

Instituições e Fontes Financiadoras _____	02
Agradecimentos _____	03
Sumário _____	06
Lista de Abreviaturas _____	09
Lista de Figuras e Tabelas _____	11
Resumo _____	12
Abstract _____	13
1. Introdução _____	14
1.1. Histórico _____	14
1.2. Sinais Clínicos _____	15
1.2.1. Mulheres Portadoras _____	16
1.3. Diagnóstico Clínico _____	17
1.4. Tipo De Distrofias _____	18
1.4.1. Distrofia Muscular de Duchenne _____	22
1.4.2. Distrofia Muscular de Becker _____	22
1.4.3. Prevalência de deleções _____	23
1.5. Tratamento _____	23
1.6. Proteína Distrofina _____	24
1.7. Genética / Gene _____	26
1.7.1. Herança _____	28
1.7.2. Mutações _____	29
1.7.3. Diagnóstico Genético _____	32

1.7.3.1. Diagnóstico Genético De Meninos Afetados _____	32
1.7.3.1. Diagnóstico Genético de Mulheres Portadoras _____	35
1.7.4. Aconselhamento Genético e Pré-Natal _____	36
1.7.5. Terapia Gênica _____	36
1.8. PCR em Tempo Real _____	37
1.8.1. SYBR Green _____	40
1.8.2. Empregos do PCR em Tempo Real Quantitativo _____	41
2. Objetivos _____	43
2.1. Objetivo Geral _____	43
2.2. Objetivos Específicos _____	43
3. Artigo _____	44
Title page _____	45
Abstract _____	46
Introduction _____	47
Patients and Methods _____	50
Results _____	53
Discussion _____	54
Acknowledgments _____	56
References _____	57
4. Discussão _____	68
5. Referências Bibliográficas _____	74
6. Anexos _____	80
6.1. Protocolo de liberação pelo Comitê de Ética _____	81
6.2. Carta de liberação de recursos pelo FIPE _____	82

6.3. Formulário para coleta de dados _____	83
6.4. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido _____	84
6.5. Recorte dos anúncios nos jornais _____	88
6.6. Carta de liberação do acesso aos registros AACD _____	90
6.7. Resultados do PCR em tempo real _____	91

LISTA DE ABREVIATURAS

- AACD – Associação de Assistência à Criança Deficiente
- AGADIM – Associação Gaúcha de Distrofias Musculares
- BMD – Distrofia Muscular de Becker (“Becker Muscular Dystrophy”)
- cDNA – Ácido Desoxirribonucléico complementar (“Complementary Deoxyribonucleic Acid”)
- CPK – Creatina-fosfoquinase (“Creatine phosphokinase”)
- Ct – limiar do ciclo (“cycle threshold”)
- DGGE – Eletroforese de Gradiente de Gel Desnaturante (“Denaturing Gradient Gel Electrophoresis”)
- DHPLC – Cromatografia Líquida Desnaturante de Alta Performance (“Denaturing High Performance Liquid Chromatography”)
- DMD – Distrofia Muscular de Duchenne (“Duchenne Muscular Dystrophy”)
- DNA – Ácido desoxirribonucléico (“Deoxyribonucleic Acid”)
- EDMD – Distrofia Muscular de Emery-Dreifuss (“Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy”)
- ENMG – Eletroneuromiografia (“Electroneuromyography”)
- FISH – Hibridização in-situ fluorescente (“Fluorescent in-situ Hybridization”)
- FSHMD – Distrofia Muscular Facio-Escápulo-Umeral (“Fascioscapulohumeral muscular dystrophy”)
- GPD – Complexo distrofina-glicoproteico (“Glycoprotein-dystrophin complex”)
- GPPG – Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
- HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

- kDa – quilo Daltons
- LGMD – Distrofia Muscular do Tipo Cinturas (“Limb-Girdle Muscular Dystrophy”)
- MAPH – “Multiplex Amplifiable Probe Hybridization”
- MLPA – “Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification”
- Mpb – Milhões de pares de bases
- mRNA – Ácido ribonucléico mensageiro (“Messenger Ribonucleic Acid”)
- ng – Nano gramas
- OPMD – Distrofia Muscular Oculofaríngea (“Oculopharyngeal muscular dystrophy”)
- pb – Pares de bases
- PCR – Reação em cadeia da polimerase (“Polymerase Chain Reaction”)
- PTT – Teste da Proteína Truncada (“Protein Truncation Test”)
- SGM – Serviço de Genética Médica
- uM – Micro molar

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Fig. 1.1 – Manobra de Gowers realizada por uma criança com DMD/BMD.
- Fig. 1.2 – Distribuição da fraqueza muscular predominante em diferentes tipos de distrofias.
- Fig. 1.3 – Representação esquemática do complexo glicoproteína-distrofina (GPD).
- Fig. 1.4 – Os oito promotores tecido-específicos do gene da distrofina.
- Fig. 1.5 – Representação esquemática da estratégia de “exon skipping”.
- Fig. 1.6 – Deleções na parte central do gene da distrofina associados à DMD/BMD.
- Fig. 1.7 – PCR multiplex para a identificação de deleções no gene da distrofina em pacientes DMD/BMD.
- Fig. 1.8 – O teste da proteína truncada (PTT).
- Fig. 1.9 – Representação esquemática de uma curva de amplificação tipicamente produzida em um PCR em tempo real, com a devida nomenclatura.
- Tab. 1.1 – Loci dos genes e defeitos protéicos nas formas mais comuns de distrofias.
- Tab. 1 – Patient information regarding diagnosis.
- Tab. 2 – Schematic representation of the exon deletions encountered in patients by PCR Multiplex investigation.
- Tab. 3 – Results of carrier women status of DMD/BMD by use of real-time quantitative PCR.

RESUMO

Palavras-chave: PCR em tempo real, PCR quantitativo, Distrofia Muscular de Duchenne/Becker, detecção de portadoras, aconselhamento genético

A Distrofia Muscular de Duchenne/Becker (DMD/BMD) é a doença neuromuscular mais freqüente em crianças, afetando uma em cada 3.500 nascidos vivos do sexo masculino (DMD), e um em cada 20.000 (BMD). A criança nasce aparentemente saudável, com o aparecimento gradual e progressivo dos sintomas desde o primeiro ano de vida. A perda da habilidade de caminhar se dá entre os sete e 12 anos de idade, com sobrevivência rara acima dos 30 anos; e a BMD, de forma mais amena, com os mesmos sintomas aparecendo mais tardiamente. O diagnóstico se baseia nas características clínicas e na investigação genética de deleções e duplicações no gene da distrofina. Um teste preciso ainda é necessário para a identificação de mulheres portadoras. O PCR quantitativo em tempo real seria um bom ensaio para a determinação deste *status*. O objetivo deste trabalho foi identificar as mulheres portadoras de deleções no gene da distrofina através de PCR quantitativo em tempo real e apresentar informações diagnósticas sobre a população de meninos com DMD/BMD do RS. Informações pertinentes a 123 meninos com diagnóstico clínico foram incluídos neste estudo. Após análise dos exames de DNA nos meninos estudados, os exons 47, 48 e 50 se mostraram mais frequentemente deletados na nossa população, confirmando que o segundo “hotspot” gênico é o que mais sofre alterações. Cinco mulheres com filhos com deleções nos exons 45, 47 e 51 foram testadas para estabelecimento do seu *status* de portadora ou não-portadora. A comparação direta dos exons específicos em relação aos mesmos em outras mulheres, determinou, com uma fácil visualização, a confirmação de três mulheres portadoras e duas não-portadoras, sendo um método preciso e efetivo. É uma abordagem prática e importante para uma utilização em casos de duplicações neste mesmo gene e em outros que necessitem deste tipo de quantificação exata.

ABSTRACT

Key words: Real-time PCR, quantitative PCR, Duchenne/Becker Muscular Dystrophy, carrier detection, genetic counseling.

Duchenne/Becker Muscular dystrophy (DMD/BMD) is the most frequent neuromuscular disorder in children, affecting one in every 3,500 born male boys (DMD), and one in every 20,000 (BMD). The child is born apparently healthy, with a gradual and progressive appearance of the symptoms during the first year of life. Between the ages of seven to 12, the child demonstrates a loss of the ability to walk, with rare survival above 30 years; and BMD, a milder form, with similar symptoms delayed. The diagnosis is based on the clinical characteristics and a genetic investigation of deletions and duplications in the dystrophin gene. A precise test is still necessary for the identification of carrier women. A quantitative real-time PCR would be a good assay for the determination of this *status*. The main goals of this study were to identify the carrier women of deletions in the dystrophin gene through the quantitative real-time PCR and to present the diagnostic information available for the population of boys with DMD/BMD in RS. Information pertaining to 123 boys with a clinical diagnosis was included in this study. After the analysis of the boy's DNA exams, exons 47, 48, and 50 were the most frequently deleted in our population, confirming that the second genetic hotspot suffers most of the alterations. Five women that bore children with deletions in exons 45, 47, and 51 were tested for the establishment of their carrier or non-carrier *status*. A direct comparison of the specific exons to the same ones in other women determined, with an easy visualization, the confirmation of three carrier women and two non-carrier, being a precise and effective method. It is a practical and important approach for the use in cases of duplication in this same gene and in others that may need an exact quantification.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD; OMIM: 310200) foi inicialmente descrita pelo neurologista francês Guillaume Benjamin Amand Duchenne na década de 1860 e alguns anos depois, auxiliando no diagnóstico, W. R. Gowers forneceu informações pertinentes quanto às características sintomáticas do afetado por esta doença. Ela é causada por uma alteração no gene que codifica a proteína distrofina, sendo a doença muscular mais freqüente em crianças, afetando um em cada 3.500 nascidos vivos do sexo masculino (Moser, 1984).

O fato de a doença afetar somente meninos incitou os cientistas a iniciarem as procuras pela localização genética da causa da doença no cromossomo X. Análises citogenéticas de diversos pacientes permitiram que os pesquisadores encontrassem anormalidades no braço curto deste cromossomo. A partir destes estudos, testes de desequilíbrio de ligação confirmaram a localização do gene da distrofina (Kingston *et al*, 1984).

O cDNA completo do gene foi clonado em 1987, auxiliando os pesquisadores a encontrarem as causas desta doença debilitante (Koenig *et al*, 1987). Após a clonagem do cDNA, foi possível utilizar regiões do próprio gene como sonda para examinar especificamente todos os exons por análise de “Southern Blot” (Beggs & Kunkel, 1990) demonstrando que aproximadamente 65% dos pacientes DMD/BMD tinham deleções/duplicações em um ou mais exons deste gene (Koenig *et al*, 1987), permitindo um melhor entendimento desta enfermidade.

1.2. Sinais Clínicos

A doença é caracterizada clinicamente por uma fragilidade proximal dos membros, com uma pseudohipertrofia característica das panturrilhas, lordose lombar, envolvimento cardíaco e elevação massiva dos níveis de creatinafosfoquinase (CPK) circulante no sangue (Arning *et al*, 2004). Os indivíduos também apresentam um movimento característico, que é a manobra de Gowers, que a criança realiza ao tentar se levantar da posição deitada, utilizando as suas mãos como apoio nas suas próprias pernas (Fig. 1.1) devido à fraqueza dos músculos extensores do joelho e quadril (Emery, 2002).



Fig. 1.1 – Manobra de Gowers realizada por uma criança com DMD/BMD (Adaptado de <http://www.sonderpaed-online.de/behind/progmd/progmd.htm>).

Uma criança com DMD nasce aparentemente saudável, sendo que os sintomas aparecem de forma gradual e progressiva durante o primeiro ano de

vida. Os músculos da pélvis, da cintura e das coxas são afetados inicialmente, dificultando a locomoção dos afetados entre as idades de um a três anos. Entre os sete e doze anos há uma perda da habilidade de caminhar, sendo rara a sobrevivência acima dos 30 anos. No estágio terminal, os músculos voluntários, o músculo cardíaco e os músculos respiratórios são afetados.

A falta da proteína distrofina também afeta o cérebro e a retina, apresentando um espectro grande de anormalidades, desde o retardo mental severo que permanece o mesmo em uma família, ou sem comprometimento algum em relação à função intelectual. Com relação a retina, podem ocorrer alterações nas eletroretinografias ou a visão ser normal (Muntoni, Torelli & Ferlini, 2003). O estudo de Alho, e colaboradores, 1995, determinou que no Rio Grande do Sul (RS) não existe correlação entre os níveis de inteligência e os tipos de deleções encontradas em 50 pacientes DMD.

1.2.1. Mulheres portadoras

Em DMD de 5 a 10% das mulheres portadoras apresentam algum grau de fraqueza muscular e freqüentemente têm panturrilhas aumentadas, sendo consideradas mulheres portadoras sintomáticas. Esta fraqueza pode ser assimétrica e pode desenvolver em idade precoce e não se tornar evidente até a idade adulta, podendo ser progressiva de forma bastante lenta ou estática. As mulheres, mesmo assintomáticas, podem desenvolver cardiomiopatia dilatada (Grain *et al*, 2001).

1.3. Diagnóstico Clínico

O progresso de novas ferramentas na detecção da doença providenciou diagnósticos mais precisos, assim como testes genéticos e diagnósticos pré-natal para a maioria das famílias com DMD/BMD. Para que esta doença seja diagnosticada, deve-se levar em conta diversos aspectos da doença, como a história clínica, o histórico familiar, a dosagem da enzima CPK, a biópsia muscular, a eletroneuromiografia (ENMG) e a análise do DNA. A primeira delas se baseia fundamentalmente no exame e na evolução clínica do paciente que, com o passar da idade, começa a ter dificuldades para a locomoção, tendo quedas freqüentes, aumento da panturrilha, lordose lombar e realizando a manobra de Gowers (Fig. 1.1).

O diagnóstico com base na evolução clínica freqüentemente é avaliado em conjunto com os dados do histórico familiar. Os sinais clínicos são avaliados levando-se em consideração as características principais desta doença. O histórico familiar também é de grande valia para o diagnóstico, sendo de fundamental importância para o melhor entendimento da forma como foi herdado, já que a presença de uma alteração poderia ter repercussões familiares maiores.

A medida da atividade das enzimas musculares, em particular da CPK, que aumenta significativamente no soro quando há uma lesão muscular, é um dos exames mais informativos, nestes casos, como complemento para o diagnóstico clínico. Os níveis desta enzima específica encontram-se elevados nos pacientes com DMD muito precocemente. O exame CPK é um fator determinante para o diagnóstico de distrofia muscular em idades iniciais.

Além das metodologias já descritas, também pode ser realizada uma biópsia do músculo do menino afetado para a observação das fibras musculares que sofrem infiltrações de gordura e fibrose. Este método geralmente serve para a distinção, a partir de uma certa idade, entre DMD e BMD, mas nem sempre é recomendada por ser uma técnica bastante invasiva.

A ENMG é um outro exame importante para a compreensão da natureza miopática da distrofia e para a exclusão de causas neurogênicas da fraqueza. Por ser de natureza invasiva, está se tornando uma técnica menos solicitada para a investigação, mas ainda possui um importante papel no diagnóstico da doença em adultos (Emery, 2002).

A análise de DNA é considerada um exame determinante em quase 6% dos casos para a confirmação do diagnóstico sendo que até 35% dos casos resultam em um exame genético negativo (sem alteração nenhuma), porém isto não significa que este menino não possui mutações no gene da distrofina. Isto ocorre devido ao fato de que não existe exame genético viável que consiga abranger toda a região gênica para determinar 100% das alterações existentes causadoras de DMD/BMD (Joncourt *et al*, 2004)

1.4. Tipo de Distrofias

Existem seis principais tipos de distrofias musculares que podem ser caracterizadas com base na distribuição da fraqueza muscular predominante (Fig. 1.2), além da Distrofia Muscular Congênita, na qual a fraqueza é considerada mais generalizada. As causas genéticas e os defeitos protéicos envolvidos no desenvolvimento destas doenças são as mais diversificadas (Tab. 1.1).

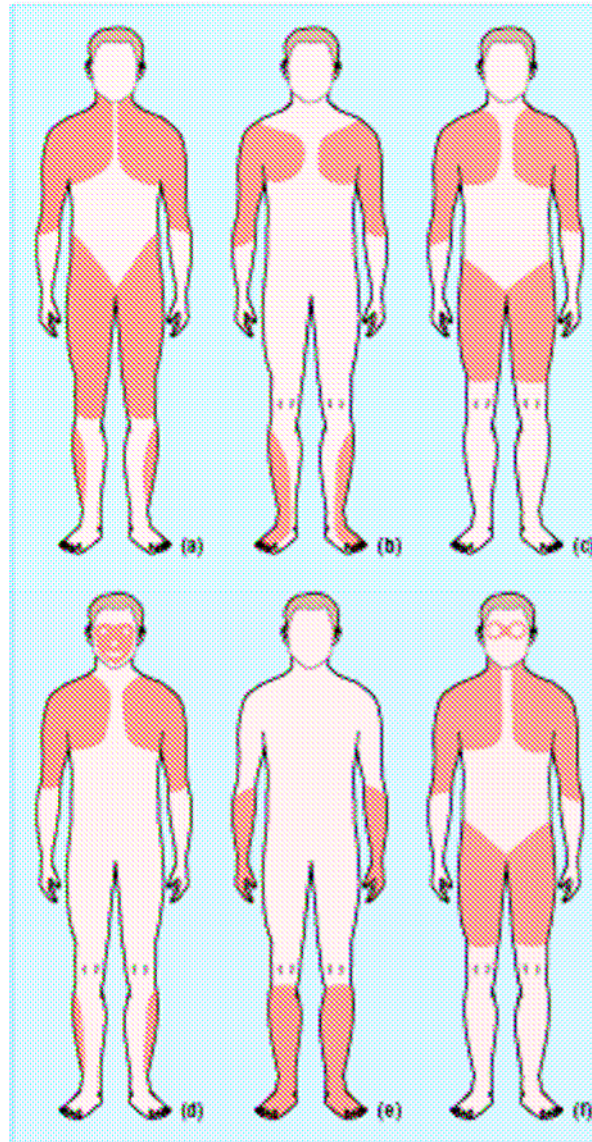


Fig. 1.2 – Distribuição da fraqueza muscular predominante em diferentes tipos de distrofias (em vermelho). A - do tipo Duchenne e Becker; B – do tipo Emery-Dreifuss; C – do tipo Cinturas; D – Facio-Escápulo-Umeral; E – Distal; e F – Oculofaríngeal (Reproduzido de Emery, 1998).

Tab. 1.1 – Loci dos genes e defeitos protéicos nas formas mais comuns de distrofias. Modos de herança: AD – autossômico dominante; AR – autossômico recessivo; XR – ligado ao X recessivo; ? – desconhecido*.

Distrofia	Locus Gênico	Defeito na proteína
Congênita (AR)	6q	Laminina α 2 (merosina)
	12q	Receptor de laminina (α 7 integrina)
	9q	Fukutina (distrofia de Fukuyama)
	1p	Selenoproteína N1 (síndrome da espinha rígida)
	1p	Glicosiltransferase
Duchenne e Becker (XR)	Xp21	Distrofina
Emery-Dreifuss (XR)	Xq28	Emerina
Emery-Dreifuss (AD/AR)	1q	Laminina A/C
Distal (AD)	14q, 2q	?
Distal (AR)	2p	Disferlina
Facio-Escápulo-Umeral (AD)	4q	?
Oculofaríngeal (AD)	14q	Proteína de ligação à Poli(A) 2 (PAB 2)
Limb-Girdle (AD)		
1A	5q	Miotilina
1B	1q	Laminina A/C
1C	3p	Calveolina 3
1D	6q	?
1E	7q	?
1F	2q	?
Limb-Girdle (AR)		
2A	15q	Calpaína-3
2B	2p	Disferlina
2C	13q	γ -sarcoglicano
2D	17q	α -sarcoglicano
2E	4q	β -sarcoglicano
2F	5q	δ -sarcoglicano
2G	17q	Teletoína
2H	9q	?
2I	19q	Relacionada a Fukutina

* Adaptado de Emery, 2002.

A Distrofia Muscular Congênita é uma doença herdável autossômica recessiva no qual a criança apresenta hipotonia e fraqueza ao nascimento ou durante os primeiros meses de vida. Existem diversas formas reconhecidas, com ou sem retardo mental significativo, podendo ser causado pela ausência da proteína merosina ou integrina α 7. A maioria das crianças acometidas não aprendem a caminhar e algumas conseguem se manter em posição ereta com algum apoio. Esta fraqueza muscular não é considerada progressiva, mas a

expectativa de vida não é promissora, pois muitos pacientes desenvolvem sérios problemas respiratórios e de alimentação (Emery, 2002).

A Distrofia Muscular de Emery-Dreifuss (EDMD) é caracterizada por uma tríade de manifestações, a primeira sendo as contraturas precoces do tendão calcâneo, dos cotovelos e dos músculos cervicais posteriores, com limitação da flexão do pescoço. Mais tarde a flexão de toda a espinha se torna restrita. Em segundo lugar, há o desgaste muscular progressivo com distribuição na região do úmero e da fíbula no início da doença. Terceiro, há o surgimento de cardiomiopatia, geralmente presente aos 30 anos de idade. A forma ligada ao X (EDMD; OMIM: 310300) é devido a uma mutação no gene *STA*, que codifica a proteína da membrana nuclear emerina. A forma autossômica dominante (EDMD2; OMIM: 181350) é clinicamente semelhante à outra forma, mas provocada por uma alteração gênica das proteínas laminina A e C (Emery, 1989).

Na Distrofia Muscular Distal a fraqueza é predominantemente distal, e pode ser dividida em dois grupos principais, de início tardio (após os 40 anos) de herança autossômica dominante, e início precoce (antes dos 30 anos) com herança autossômica recessiva que, no caso do tipo Myoshi, é causada por uma alteração na proteína disferlina. A causa dos outros tipos de Distrofias Musculares Distais ainda é desconhecida (Nonaka, 1999).

A Distrofia Muscular Facio-Escápulo-Umeral (FSHMD1A; OMIM: 158900) é uma doença autossômica dominante que atinge inicialmente os grupos musculares da face e região escapular (ombros). E tardiamente os músculos extensores do pé e da pelve são envolvidos. Já foi identificada a região onde está

localizado o gene ou genes responsáveis por esta doença, mas a função específica deles é desconhecida (Wijmenga *et al*, 1991).

A Distrofia Muscular Oculofaríngeal (OPMD; OMIM: 164300) tem seu início perto da terceira década de vida, afetando os músculos extraoculares e da face superior com fraqueza do pescoço e musculatura dos membros proximais superiores e, às vezes, inferiores. O gene que sofre mutações codifica uma proteína que adiciona a cauda poli-A (Brais *et al*, 1998).

Na Distrofia Muscular do tipo Cinturas (Limb-Girdle Muscular Dystrophy – LGMD) a fraqueza afeta a musculatura da cintura escapular e pélvica. Até o momento, 15 tipos geneticamente diferentes já foram identificados com grande heterogeneidade clínica e genética, podendo ser de herança autossômica dominante ou recessiva (Bushby, 1999).

1.4.1. Distrofia Muscular de Duchenne

A forma mais grave das distrofias musculares é a de DMD, sendo a mais freqüente, devido à ausência da distrofina integralmente funcional, que é uma proteína essencial para a manutenção das fibras musculares (Beggs & Kunkel, 1990). As informações clínicas, específicas desta doença, já foram descritas em parágrafos anteriores.

1.4.2. Distrofia Muscular de Becker

Durante os anos 50, um médico alemão descreveu uma variante menos grave da DMD, conhecida como Distrofia Muscular de Becker (BMD; OMIM: 300376), onde a distrofina se encontra parcialmente funcional, com o seu

tamanho ou a sua quantidade presente alterada, ainda afetando os músculos do paciente, porém não o debilitando de forma exacerbada.

A incidência dessa doença é menor, quando comparada a da DMD, acometendo 1 em cada 20.000 meninos nascidos. Os sintomas podem variar de intermediários até os casos mais amenos, no qual existe uma expectativa de vida bastante aumentada, sendo comum os sobreviventes de BMD acima dos 40 anos.

O início do aparecimento dos sintomas é próximo dos 12 anos, porém alguns pacientes não apresentam sintomas até uma idade muito mais avançada. A perda da habilidade de caminhar também é bastante arbitrária, podendo iniciar na adolescência. Em alguns casos, também como na DMD, possuem algum tipo de retardo mental (Emery, 2002).

1.4.3. Prevalência de deleções

A prevalência de deleções varia de 39 a 61%, mundialmente, com frequência de 51,3% no Marrocos (Sbiti, Kerch, & Sefiani, 2002), 52% na população turca (Gokgoz *et al*, 1993) e 56,8% em pacientes iranianos (Kia *et al*, 2003), sendo que no sul do Brasil, a prevalência é de 49% (Alho *et al*, 1995). Neste último estudo, foram analisados 46% dos indivíduos afetados em Porto Alegre, 13% dos meninos doentes no interior do estado e 4 casos em SC, tendo uma amostra relativamente satisfatória para a região de Porto Alegre.

1.5. Tratamento

Atualmente não existe tratamento efetivo para DMD/BMD, considerada incurável e extremamente debilitante. Atualmente são empregados meios de

amenizar os sintomas, como medicamentos, fisioterapias e uma ênfase no cuidado respiratório e cardiológico. Os autores Campbell e Jacob (2003), fazendo uma revisão da literatura, viram que as drogas de maior interesse para a amenização dos sintomas têm sido os corticosteróides, como a Prednisona, demonstrando uma possível melhora inicial em alguns pacientes com o aumento da função e da força muscular e parada da degradação muscular em outros, porém com diversos efeitos colaterais. O corticosteróide Deflazacort, possui efeitos semelhantes ao da Prednisona, mas com efeitos colaterais aparentemente mais amenos, com menor ganho de peso dos pacientes. O mecanismo pelo qual ambos são efetivos na estabilização da força muscular ainda não foi elucidado e apesar do valor terapêutico ser limitado, ainda são considerados os melhores para o tratamento atualmente (Angelini, 2007).

De uma forma geral, a cirurgia preventiva, em estágios iniciais da doença não é recomendada, mas a correção cirúrgica de contraturas pode ser útil em estágios mais avançados da doença, quando há dificuldade na locomoção. A cirurgia corretiva da escoliose está se tornando amplamente aceita, pois após a cirurgia o paciente senta-se mais facilmente e esta posição torna-se mais confortável (Granata, 1996).

1.6. Proteína Distrofina

A distrofina é uma proteína em forma de haste, no qual a isoforma do músculo possui 427kDa, ligada à membrana plasmática das células musculares por um complexo de proteínas transmembranas. Ela possui quatro domínios, um amino-terminal, um central, outro rico em cisteínas e um último carboxi-terminal.

Existem diversos tipos de isoformas tecido-específicas da distrofina, algumas exclusivamente ou predominantemente expressas no cérebro ou retina gerando produtos protéicos de pesos diferentes, mas todos funcionais em regiões específicas do corpo (Muntoni, Torelli & Ferlini, 2003).

No músculo, a proteína é associada com a membrana plasmática do músculo esquelético e cardíaco (sarcolema) ligando o citoesqueleto da actina intracelular funcionalmente à matriz extracelular (Ibraghimov-Beskrovnaya, Ervasti & Leveille, 1992). Seu papel principal no sarcolema é interagir com proteínas íntegras que estão agrupadas no complexo glicoproteína-distrofina (GPD). Este complexo forma uma ponte através do sarcolema e conecta a lâmina basal da matriz extracelular ao citoesqueleto interno (Muntoni, Torelli & Ferlini, 2003). O GPD estabiliza o sarcolema e permite uma resistência mecânica da membrana (Pasternak, Wong & Elson, 1995), protegendo as fibras musculares de danos a longo prazo induzidos por contrações e necrose (Muntoni, Torelli & Ferlini, 2003) (Fig. 1.3). O rompimento da GPD leva a quebras físicas do sarcolema e/ou abertura de canais de cálcio, aumentando o cálcio livre intracelular e necrose da fibra (Rando, 2001).

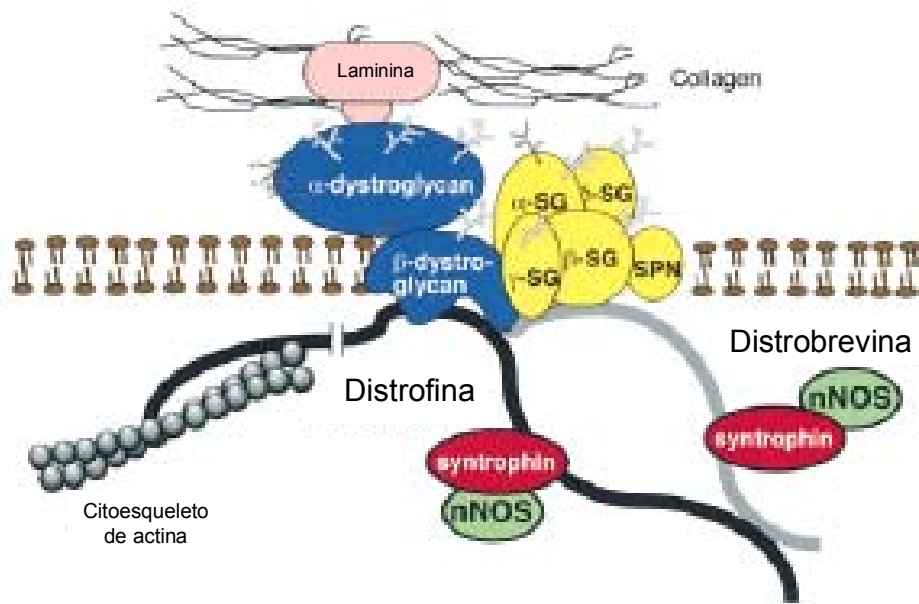


Fig. 1.3 – Representação esquemática do complexo glicoproteína-distrofina (GPD) (Adaptado de Crawford *et al*, 2000).

1.7. Genética / Gene

Davies e colaboradores (1983) mostraram que este gene se localiza no cromossomo X, região p21.2, sendo o maior gene humano conhecido, com 79 exons e cerca de 2,4 milhões de bases, correspondentes a 0,1% do genoma humano total ou 1,5% de todo o cromossomo X. Apesar de ser extenso, 99% deste gene é composto de introns, sendo considerado altamente complexo. Ele contém, no mínimo, oito promotores independentes e tecido-específicos com dois sítios de poli-adenilação (Fig. 1.4). O seu transcrito pode sofrer processamento (“splicing”) alternativo, produzindo diversas isoformas protéicas, tanto por exclusão de alguns exons do transcrito primário (“exon skipping”) (Fig. 1.5) ou pela alteração da ordem recíproca dos exons (“exon scrambling”) (Muntoni, Torelli & Ferlini, 2003). O tamanho do gene explica a alta taxa de mutação, visto que ele

representa um grande alvo (Beggs & Kunkel, 1990). Estes eventos que comumente ocorrem de maneira tecido-específicas geram maior diversidade protéica e são responsáveis pela complexa regulação da expressão das funções da distrofina tecido-específicas. O mRNA de 14.000pb é expresso predominantemente no músculo esquelético e cardíaco com pequenas quantidades expressas no cérebro (Muntoni, Torelli & Ferlini, 2003).

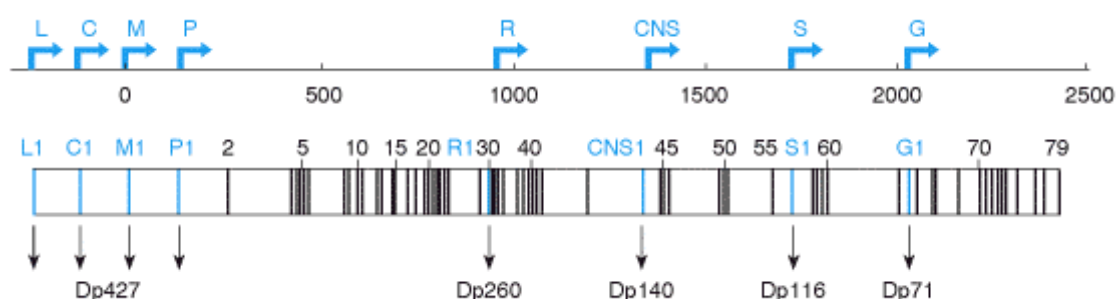


Fig. 1.4 – Os oito promotores tecido-específicos do gene da distrofina. Acima, L – linfócito; C – cortical; M – músculo; P – células de Purkinje; R – retina; CNS – sistema nervoso central; S – células de Schwann; e G – geral. As posições aproximadas dos exons estão ilustradas abaixo, com as regiões de início de transcrição específica para cada promotor em azul, com seu tamanho respectivo de peso molecular descrito abaixo da seta correspondente (Reproduzido de Strachan & Read, 1999).

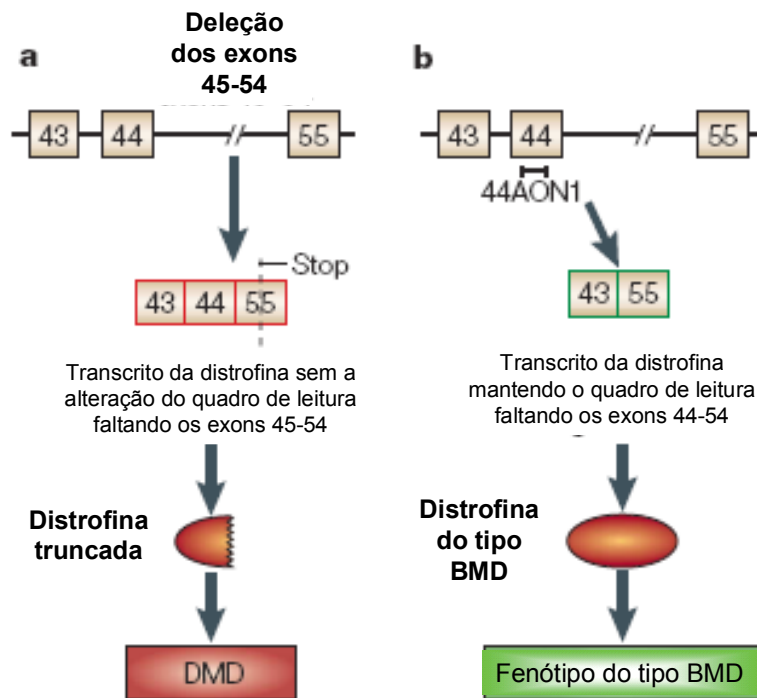


Fig. 1.5 – Representação esquemática da estratégia de “exon skipping”. A – Em pacientes DMD com uma deleção nos exons 45 ao 54, um transcrito fora do quadro de leitura é gerado produzindo uma distrofina truncada. B – Usando um oligonucleotídico antisense interno (AON) no exon 44, ele acaba sendo ignorado na formação da proteína, produzindo uma distrofina que mantém o quadro de leitura gerando um fenótipo mais ameno (Adaptado de van Deutekom & van Ommen, 2003).

1.7.1. Herança

A DMD/BMD atinge os indivíduos do sexo masculino, com casos raros de mulheres afetadas. Cerca de dois terços dos casos existentes são devidos à herança familiar e, o restante, a mutações novas (Moser, 1984).

A DMD/BMD é herdada de forma recessiva, ligada ao X, portanto o risco dos filhos serem afetados pela doença depende do status de portadora ou não da mãe. Mulheres portadoras possuem 50% de chance de transmitirem a mutação

em cada gestação. Isto significa que metade dos filhos irá herdar esta mutação no cromossomo X, sendo que os filhos do sexo masculino que herdarem a alteração serão acometidos pela doença e as filhas que a herdarem, serão portadoras. Entretanto, os indivíduos que herdarem o cromossomo X sem alteração serão saudáveis. Homens com DMD não chegam a deixar descendentes, mas os acometidos por BMD podem deixar descendentes. As filhas dos homens com BMD serão todas portadoras da mutação, porém nenhum dos filhos homens destes afetados será acometido com a doença (pois é o cromossomo Y saudável que é transmitido a eles).

1.7.2. Mutações

É necessário que o gene da distrofina tenha alguma alteração, como uma deleção, duplicação, inserção ou substituição de base para o aparecimento dos sintomas clínicos da DMD/BMD.

Diversas mutações já foram descritas na literatura como causadoras da doença, na sua maioria afetando a expressão da isoforma muscular (Muntoni, Torelli & Ferlini, 2003). Existem dois “hotspots” (regiões propensas a sofrerem mutações) neste gene, um localizado próximo ao centro, que inclui os exons 43 ao 52, e o outro próximo à região 5', dos exons 3 ao 19. As deleções exônicas nestas duas regiões são responsáveis por cerca de 65% dos casos de DMD/BMD, as duplicações por 5 a 10% e o restante por outros tipos de mutações, deleções de introns, inserções ou substituições. Em uma pesquisa realizada com pacientes marroquinos, 81% dos casos de deleções foram encontrados no segundo “hotspot” gênico (Sbiti, Kerch & Sefiani, 2002).

Infelizmente ainda não foi possível estabelecer uma relação direta do tipo ou da extensão da deleção com a severidade da doença, casos familiares e esporádicos e níveis de inteligência em diversos países (Fig. 1.6). No Estado do RS 50 pacientes de 41 famílias foram estudados segundo seu fenótipo e analisados quanto ao perfil genéticos para deleções moleculares em 13 exons e também não foi encontrada tal relação (Alho *et al*, 1995).

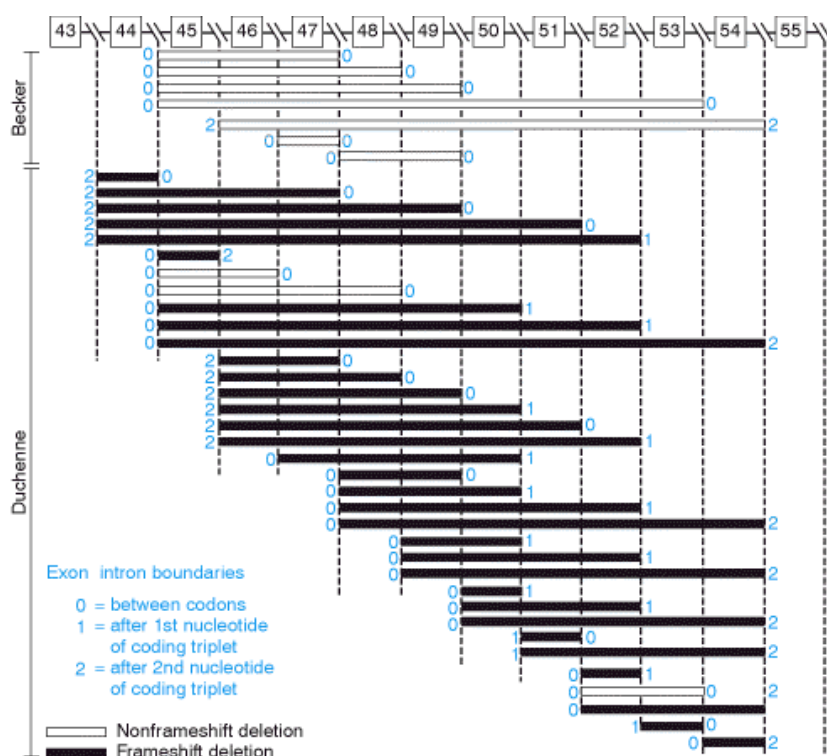


Fig. 1.6 – Deleções na parte central do gene da distrofina associados à DMD/BMD. Caixas numeradas acima representam os exons 43 ao 55. Deleções que geram mudanças no quadro de leitura (coluna preenchida) causam DMD, enquanto que deleções sem alterar o quadro de leitura (colunas vazadas) geralmente causam a forma mais amena, BMD (Reproduzido de Strachan & Read, 1999).

Algumas das isoformas tecido-específicas já foram associadas ao envolvimento do SNC, devido a mutações que afetam a expressão correta destas. Mutações raras também podem ser responsáveis por cardiomiopatias na qual a

função ou expressão da distrofina é afetada na sua maioria ou exclusivamente no coração (Muntoni, Torelli & Ferlini, 2003).

Há uma hipótese que determina uma distinção genética quase total entre os indivíduos DMD e BMD que tem início da doença precoce e tardiamente, respectivamente. A diferença amplamente aceita desta hipótese entre o BMD e o DMD é devido à presença da proteína distrofina de maneira parcialmente funcional, no primeiro caso, e a completa ausência dela no segundo caso. Na maioria dos casos a DMD é causada por uma mutação que interfere no quadro de leitura (“frameshift mutation”) (Monaco *et al*, 1988) que pode levar a uma síntese da distrofina prematuramente abortada (van Deutekom & van Ommen, 2003), resultando em um mRNA instável, ou uma proteína que é completamente não-funcional; e, o BMD é conhecido por portar uma mutação sem alteração do quadro de leitura (“in-frame mutation”), gerando uma proteína com uma falha interna ou que pode estar presente em níveis reduzidos, mas ainda parcialmente funcional (Fig. 1.6). Esta hipótese é verdadeira para aproximadamente 92% dos casos e é utilizada para diagnóstico diferencial entre DMD e BMD (Koenig, 1989).

Existem, de fato, exceções a esta hipótese do quadro de leitura, que inclui pacientes BMD com mutações “frameshift” e DMD com mutações “in-frame” (Muntoni, Torelli & Ferlini, 2003). Os primeiros, BMD, possuem diversas deleções/duplicações bem caracterizadas nos dois “hotspots”, mas o que permite que eles produzam uma certa quantidade de proteína é o fato do gene sofrer “exon skipping” que ocorre por “splicing” alternativo, deixando de lado alguns trechos da proteína, porém a região carboxi-terminal precisa ser conservada para que a proteína seja funcional (Arahata *et al*, 1991). Outra hipótese para estes

casos inclui os pacientes BMD com deleções nos exons três ao sete, nos quais um outro sítio de início da tradução localizado no exon oito, ainda não caracterizado, facilita a tradução de uma proteína com menor peso, porém funcional (Winnard *et al*, 1995). Deleções de grandes porções do domínio em forma de haste da proteína aparentemente causam BMD, desde que as caudas amino e carboxi terminais da distrofina sejam mantidos intactas (Arahata *et al*, 1991). As deleções que mantêm o quadro de leitura, mas que interrompem o domínio de ligação 5'actina, tais como a deleção dos exons três ao treze estão comumente associados com a DMD (Muntoni *et al*, 1994).

1.7.3. Diagnóstico Genético

1.7.3.1. Diagnóstico Genético de meninos afetados

A análise do DNA é um método para confirmação do diagnóstico clínico desta enfermidade. A técnica mais empregada envolve um PCR Multiplex, que permite a análise simultânea de 18 exons, na região dos dois “hotspots”, identificando aproximadamente 98% de todas as deleções existentes (Beggs & Kunkel, 1990; Chamberlain *et al*, 1988) (Fig. 1.7). Porém, este método não é capaz de identificar mutações de ponto ou duplicações de certas regiões, nem de identificar as mulheres portadoras (Muntoni, Torelli & Ferlini, 2003).

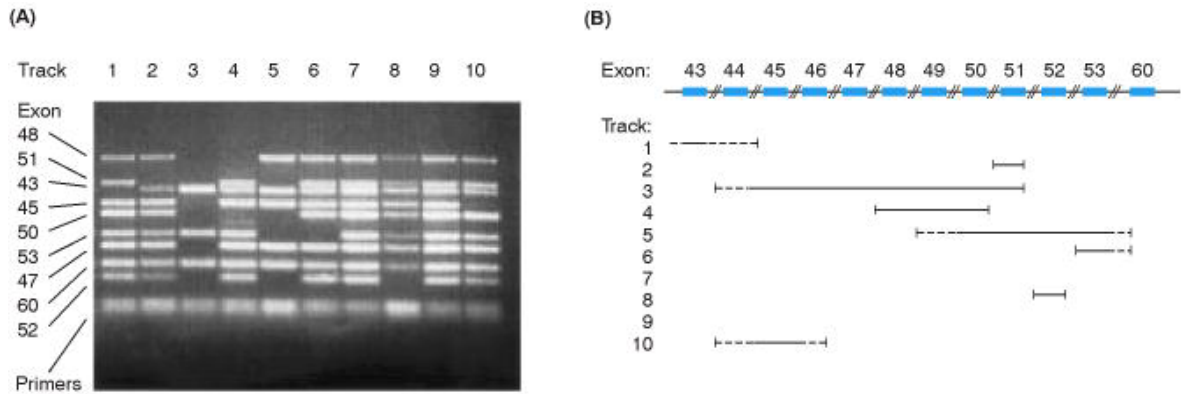


Fig. 1.7 – PCR multiplex para a identificação de deleções no gene da distrofina em pacientes DMD/BMD. A – produtos de PCR multiplex de pacientes DMD para 9 exons. B – Desenho esquemático do resultado do multiplex A. Linhas sólidas demonstram exons definitivamente deletados, linhas tracejadas, demonstram possível extensão da deleção em exons não-testados. Nenhuma deleção foi encontrada nas amostras 7 e 9 (Reproduzido de Strachan & Read, 1999).

Outro teste bastante importante para o diagnóstico genético de meninos afetados é o PTT (Protein Truncation Test) que é realizado com o mRNA do músculo deste menino, em busca de mutações de ponto (Roberts, Bobrow & Bentley, 1992) (Fig. 1.8). A sua única desvantagem é a dificuldade técnica na obtenção do RNA muscular.

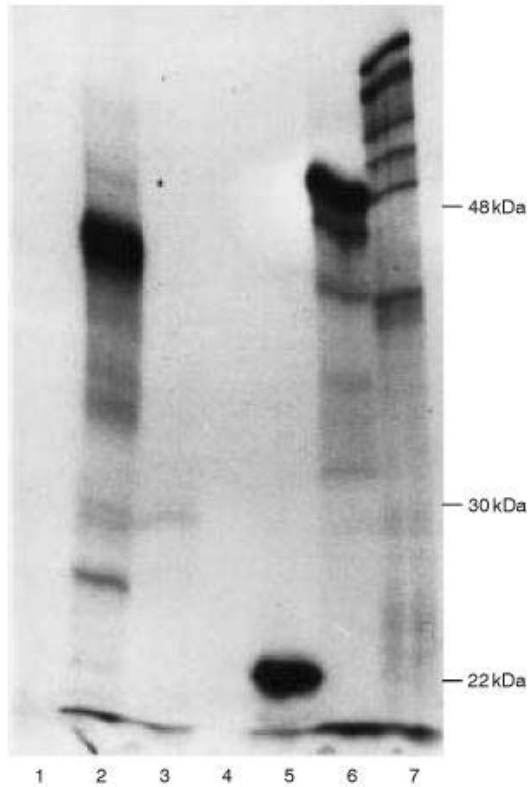


Fig. 1.8 – O teste da proteína truncada (PTT). Os Exons 58 a 68 do paciente 1 resultaram em um produto normal de 47kDa (coluna 2), mas os exons 67 a 79 (coluna 3) codificam um produto truncado de 30kDa (apresentando uma banda fraca). Os exons 58 a 68 do paciente 2 resultaram em um produto truncado de 22kDa (coluna 5), e os exons 67 a 79 resultaram em um único produto normal de 48kDa (coluna 6), de acordo com um marcador (coluna 7) (Reproduzido de Strachan & Read, 1999).

O PCR Multiplex não consegue analisar de 20-35% das mutações envolvidas na doença, então formas alternativas já estão sendo testadas para uma melhor compreensão das alterações existentes. Estas técnicas baseadas em abordagens genômicas também podem ser utilizadas, tais como o “Denaturing Gradient Gel Electrophoresis” (DGGE) (Dolinsky, Moura-Neto & Falcão-Conceição, 2002), detecção de virtualmente todas as mutações (Mendell *et al*, 2001; e Feng

et al, 2002) e cromatografia líquida de alta performance desnaturante (DHPLC) seguida de seqüenciamento, a qual permite a detecção de pequenas mutações (Bennett *et al*, 2001).

Infelizmente este tipo de metodologia ainda não é utilizada amplamente como rotina de diagnóstico destes pacientes e a técnica do PCR Multiplex é a mais empregada, por ser de custo mais acessível.

1.7.3.1. Diagnóstico Genético de mulheres portadoras

Uma das maiores dificuldades encontradas é diagnosticar as mulheres portadoras com precisão. Para este fim, é necessária uma abordagem quantitativa para detectar uma deleção em uma mulher que tenha probabilidade de ter um alelo normal e o outro deletado (Ginzinger, 2002). Nestes casos de heteroziguidade, as estratégias são baseadas em “Southern Blot” quantitativo, PCR quantitativo (Prior *et al*, 1990), “Fluorescent in-situ Hybridization” (FISH) (Ligon *et al*, 2000), análise de ligação, estratégias baseadas em fluorescências, eletroforese capilar (Fortina *et al*, 1997), “Multiplex Amplifiable Probe Hybridization” (MAPH) (White *et al.*, 2002), “Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification” (MLPA) e DHPLC (Hung *et al.*, 2005), técnicas que possibilitam a determinação de uma deleção em um dos cromossomos X, mesmo na presença do outro cromossomo X não alterado. A técnica de “Southern Blot” é bastante laboriosa e muitas vezes pode ter resultados expúrios, falsos-negativos ou falsos-positivos, e a de FISH é de custo elevado. O grupo de White (2002) utilizou a técnica de MAPH para a detecção de duplicações e deleções no gene do DMD, que envolve a recuperação quantitativa de sondas desenhadas especificamente

seguidas de hibridização com DNA genômico imobilizado. Hung e seus colaboradores (2005) conseguiram utilizar a técnica de DHPLC em conjunto com um PCR multiplex para detectar grandes deleções nas portadoras de DMD. O DHPLC é um método que não se baseia em fluorescência, mas que utiliza uma cromatografia líquida de fase reversa de íons pareados na sua detecção, sendo simples, rápido e sem a utilização de gel. Além de todas estas técnicas, ainda há dificuldades na detecção, pois geralmente não existem marcadores para todas as regiões do gene.

1.7.4. Aconselhamento Genético e Pré-Natal

Os exames pré-natais para gestações de risco são possíveis se a mutação causadora da doença já foi anteriormente identificada em um membro da família ou se marcadores de ligação informativos forem identificados (Simard, Gingras & Labuda, 1991). O aconselhamento genético pode ajudar a família a tomar decisões reprodutivas no caso de existirem mulheres portadoras de alguma alteração no gene da distrofina (Beggs *et al*, 1990).

1.7.5. Terapia Gênica

O maior desafio dos estudos com terapia gênica é justamente o tamanho do gene que, neste caso, precisa ser substituído ou reparado para que a criança não sofra mais a lesão muscular (van Deutekom e van Ommen, 2003). Diversos estudos estão sendo realizados com terapias gênicas na tentativa de amenizar os sintomas debilitantes e reverter os danos causados às fibras musculares, através de três estratégias principais. A primeira delas é relativa a entrega de mini- e

micro-distrofinas funcionais por meio de vetores virais adeno-associados (rAAV) (Watchko *et al*, 2002). A segunda é com relação à indução de “exon skipping” antisense terapêutico (Fig. 1.5) (Kapsa *et al*, 2001; e Barton-Davies *et al*, 1999). E a última substituindo-se a distrofina através da superexpressão da utrofina (Tinsley *et al*, 1996; e Rafael *et al*, 1998). Van Deutekom e van Ommen (2003) acreditam que a próxima estratégia a ser implementada para testes clínicos seja a abordagem antisense que tem se mostrado como sendo a mais promissora até o momento.

A possibilidade de terapia com células-tronco está sendo explorada e pesquisadores mostraram que uma pequena proporção de células-troncos hematopoiéticas de camundongos normais podem ser relocadas no músculo de camundongos *mdx* (modelo experimental de DMD) e produzir a distrofina (Gussoni *et al*, 1999).

1.8. PCR em tempo real

O PCR em tempo real possui a habilidade de medir os produtos em tempo real (“real-time PCR”), ou conforme estão acumulando, sendo um detector confiável medindo a quantidade de produto de PCR em um ponto no qual a reação ainda se encontra na fase exponencial. Somente a fase exponencial do PCR pode ser utilizada para determinar a quantidade de cópias iniciais. Durante esta fase, um limiar do sinal de fluorescência é determinado, onde todas as amostras podem ser comparadas. Este limiar é calculado como função da quantidade de ruído (“background”) de fluorescência e é plotado exatamente onde o sinal gerado pela amostra é significativamente maior que a fluorescência de

ruído. Portanto, o número fracional de ciclos de PCR necessários para gerar sinal fluorescente suficiente para alcançar este limiar é definido como o limiar do ciclo (“cycle threshold” – Ct). Estes valores Ct são diretamente proporcionais à quantidade de cópias iniciais e são a base para calcular níveis de expressão de mRNA e medidas de números de cópias de DNA (Fig. 1.9).

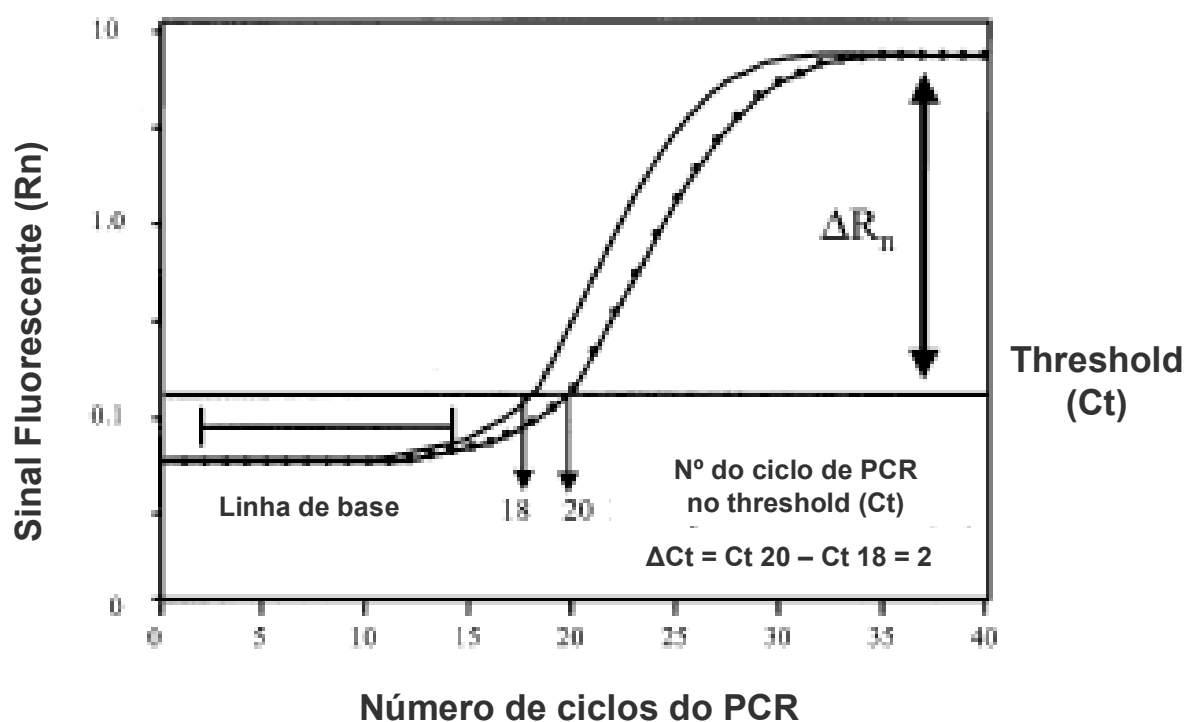


Fig. 1.9 – Representação esquemática de uma curva de amplificação tipicamente produzida em um PCR em tempo real, com a devida nomenclatura. A linha cheia cruza o Ct no ciclo de PCR 18, enquanto que a linha pontilhada cruza no ciclo 20, gerando um ΔCt de 2. Devido à natureza exponencial do PCR, a diferença entre as duas amostras é de 2 elevado ao ΔCt , que é uma diferença de 4x (Adaptado de Ginzinger, 2002).

O primeiro ensaio de PCR *real-time*, relatado por Higuchi *et al*, (1993), utilizou o brometo de etídeo como fluorescência intercalante durante o processo de PCR para a detecção deste sinal fluorescente resultante. Ele construiu um termociclador modificado para irradiar as amostras com luz ultravioleta e depois captar estes sinal por uma câmera CCD (“Charged Coupled Devise”) (Ginzinger, 2002). Yau e colaboradores, em 1996, desenvolveram dois PCR Multiplex semi-quantitativos para deleção/duplicação de 25 exons do gene da distrofina, diagnosticando precisamente mulheres portadoras e meninos afetados por análise da fluorescência por um quociente de dosagem, em comparação com outros exons, abrangendo mais de 70% de todas as mutações. O PCR quantitativo em tempo real foi sugerido e desenvolvido por Heid *et al* (1996) permitindo o monitoramento contínuo da formação do produto de PCR, servindo como uma ferramenta de quantificação absoluta do material em estudo, conseguindo determinar um alelo deletado ou duplicado dependendo do ensaio a ser utilizado. Para a quantificação relativa, um gene de interesse é comparado com um gene controle ou constitutivo (Ginzinger, 2002), com base no limiar do ciclo (Ct). O Ct do gene controle é subtraído do Ct do gene de interesse e a diferença resultante do número de ciclos (ΔCt) é o exponencial com base dois, já que o PCR possui a função de duplicação, representando a diferença da quantidade de molde inicial para estes dois genes (Ginzinger, 2002).

O ensaio de PCR quantitativo em tempo real varia conforme o estudo desenvolvido, podendo-se utilizar diversas abordagens. Uma alternativa é a utilização do ensaio TaqMan®, que possui uma sonda específica para a região de interesse, além dos “primers”, e depende da atividade exonucleásica da Taq DNA

Polimerase. No sistema TaqMan é necessário que a sonda específica seja degradada para que haja emissão de fluorescência, sendo de maior especificidade. Outras duas alternativas são os “molecular beacons” e o corante SYBR Green I intercalante, no qual o primeiro é semelhante ao sistema TaqMan, no que diz respeito a ter um “quencher” para inibir a liberação da fluorescência indesejada, porém não emite fluorescência quando é clivado pela atividade exonucleásica, mas só gera sinal quando há hibridização do “beacon” (Ginzinger, 2002).

1.8.1. SYBR Green

O SYBR Green I é um reagente que se liga à dupla fita de DNA emitindo fluorescência e é utilizado no sistema de PCR em tempo real, com diferentes pares de “primers”, sem a necessidade de aquisição de sondas específicas à região de interesse. O SYBR Green I, quando está ligado ao DNA, é excitado por uma fonte de luz e emite uma grande quantidade de fluorescência, podendo ser utilizado para quantificar o material a ser estudado. O contratempo do ensaio se baseia no fato de que o *SYBR* não consegue discriminar entre a região de DNA de interesse a ser amplificada e outras regiões que possam ser amplificadas erroneamente (Ginzinger, 2002) e, por isso, é necessária a utilização de controles positivos para confirmação do resultado esperado. A fluorescência SYBR Green I pode ser uma alternativa para a quantificação relativa de rearranjos de genes, ampliações gênicas e micro deleções gênicas, sendo uma ferramenta importante para a clínica oferecendo resultados diagnósticos precisos em menos

tempo, utilizando menos material e com um custo menor do que ensaios como FISH ou “Southern Blot” (Ponchel *et al*, 2003).

1.8.2. Empregos do PCR em tempo real quantitativo

Somente nos últimos anos é que o PCR quantitativo em tempo real tem sido aceito como uma técnica valiosa. O ensaio deste PCR já está sendo utilizado para a detecção de diversas doenças, com pequenas alterações, como deleções hemizigóticas ou duplicações. Testes para análise de deleções de uma certa região em pacientes com síndrome de Angelman e Prader-Willi por PCR em tempo real estão sendo implementadas (Raca, Buiting & Das, 2004). A rápida detecção de deleções e duplicações do gene PMP22 em pacientes com a doença Charcot-Marie-Tooth do tipo 1A e neuropatia hereditária por PCR quantitativo em tempo real usando o corante SYBR Green I é mais um exemplo do emprego desta técnica (Kim *et al*, 2003). Análises quantitativas dos genes SMN1 (“Survival of motor neuron 1”) e SMN2 (“Survival of motor neuron 2”) baseadas em PCR em tempo real, para testar os portadores e prever a severidade da atrofia muscular espinhal foram desenvolvidas por Feldkötter e seus colaboradores em 2002.

O grupo de Joncourt (2004) conseguiu identificar mulheres portadoras de deleções/duplicações no gene da DMD/BMD por PCR quantitativo em tempo real inicialmente usando o sistema TaqMan e, posteriormente, validar a técnica para SYBR Green I nos exons 44, 45 e 49 em 100% dos casos. O método deles demonstrou-se simples, rápido, confiável e com um bom custo-benefício, podendo ser facilmente adaptado para outras condições genéticas envolvendo deleções e duplicações, com base na comparação entre um exon potencialmente deletado

(exon testes) e um de referência (não-deletado). Cada indivíduo precisou ser calculado separadamente para determinar o seu status de portador ou não-portador, sendo que uma mulher portadora possuiria no seu exon teste metade da quantidade de DNA do que seu exon referência.

Seguindo a mesma linha de pesquisa, Traverso *et al* (2006) montaram um PCR multiplex dos exons 5, 45 e 51 com a tecnologia de real-time usando a sonda TaqMan específica para estas regiões, visando a determinação de mulheres portadoras de deleções/duplicações, com sucesso.

O PCR quantitativo em tempo real com SYBR Green I poderia ser um bom ensaio para a identificação de mulheres portadoras, que possuem uma região deletada ou duplicada em um dos alelos do gene da distrofina, por ser rápido, robusto e de baixo custo. Para aconselhar as mulheres portadoras de deleções/duplicações neste gene é importante que haja um teste preciso para a correta identificação desse *status*, auxiliando-as a tomarem decisões reprodutivas futuras.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Identificar as mulheres portadoras de deleções/duplicações no gene da distrofina através de PCR quantitativo em tempo real.

2.2. Objetivos Específicos

- 1) Avaliar a informação diagnóstica existente na população de meninos com DMD/BMD do Rio Grande do Sul.
- 2) Determinar quais dos exons estudados no segundo “hotspot” gênico são mais predominantes no Estado do Rio Grande do Sul em relação a outras populações e estudos anteriores realizados no próprio Estado.
- 3) Estabelecer um método, por meio de PCR quantitativo em tempo real, para a detecção de mulheres portadoras de DMD/BMD, proporcionando uma ferramenta para um aconselhamento genético mais preciso.

3. ARTIGO

Os resultados do presente trabalho serão apresentados na forma de um manuscrito que será submetido para publicação na revista científica Neuromuscular Disorders.

Title:

Clinical diagnosis characterization and carrier detection of DMD/BMD gene deletions in the Rio Grande do Sul State (Brazil) by quantitative real-time PCR.

Authors:

Carolina Rosa Franco ^{1, 2}; Hugo Bock ²; Ursula Matte ²; Clarice Sampaio Alho ³;
Maria Luiza Saraiva Pereira ^{1, 2}; Roberto Giugliani ^{1, 2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

² Serviço de Genética Médica – Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Universidade do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

³ Laboratório de Genética e Biologia Molecular – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Corresponding author address:

Prof. Robert Giugliani, MD, PhD

Medical Genetics Serv / Serv Genética Medica

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-903 – Porto Alegre – RS - Brazil

Rgiugliani@hcupa.ufrgs.br

Tel: + 55 51 21018011 Fax: +55 51 21018010

Running Title: Carrier detection of DMD/BMD gene deletions by real-time PCR

ABSTRACT

Clinical diagnosis characterization and carrier detection of DMD/BMD gene deletions in the Rio Grande do Sul State (Brazil) by quantitative real-time PCR.

The current scenario of clinical diagnosis of DMD/BMD in Rio Grande do Sul state, Brazil is appropriate, but critical regarding DNA diagnosis, with only 54.4% of boys with molecular tests. Women with DMD/BMD children currently do not have a precise test for the detection of their carrier status as a tool to facilitate genetic counseling, helping diminish the incidence of births of affected children. The information concerning 123 boys with this ailment were included in this study to allow evaluation of their clinical diagnosis. A quantitative real-time approach using a non-specific dye (SYBR Green I) was performed to identify possible carrier women. Most deletions in the dystrophin gene can be found in the second hotspot (exons 43-55), with a higher frequency observed in exons 47, 48, and 50. The quantitative approach has proved to be efficient in determining the carrier status of these women in exons 45, 47, and 51.

Key words: Real-time PCR, quantitative PCR, Duchenne/Becker Muscular Dystrophy, carrier detection.

INTRODUCTION

Duchenne/Becker Muscular Dystrophy (DMD/BMD) was initially described by a French neurologist around 1860, considered to be caused by an alteration in the dystrophin gene (OMIM: 310200, Duchenne; 300376, Becker). It is the most frequent lethal heritable childhood disease affecting approximately 1 in every 3,500 live-born males and is considered a very severe, progressive, muscle-degenerating disorder that is currently incurable [1]. Children with DMD are usually born healthy with their muscles being affected during the first years of life, and are wheel-chair ridden in between the ages of 7 to 12 years old. Survival is considered rare above 30 years. The disease is clinically characterized by a proximal fragility, with a characteristic pseudohypertrophy of the calves, cardiac involvement, massive elevation of circulant creatine phosphokinase (CPK) levels in the blood [2], and the the Gowers maneuver [3]. In BMD the onset of symptoms is retarded, with intermediate to mild phenotypes, and a higher life expectancy, affecting 1 in every 20,000 newborn boys. Various research studies are being developed with gene therapy in search to help minimize the debilitating symptoms and reverse the damage to the muscle fibers, presumably working towards three new strategies [4]. The first one being the delivery of functional mini- and micro-dystrophins by recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors [5]; the second, and third concerning therapeutic anti-sense induced exon-skipping [6, 7], and dystrophin replacement by utrophin upregulation [8, 9].

The muscle isoform of the dystrophin protein, which is altered or missing in this disease, has a rod-like form, with a molecular weight of 427KDa and connects

the plasmatic membrane of the muscle cells through a transmembrane protein complex, the glycoprotein-dystrophin complex (GPD) [10]. The GPD stabilizes the sarcolemma and protects the muscle fibers from long-term damage induced by contractions and necrosis.

The dystrophin gene is located on Chromosome Xp21.2 and is considered the largest human gene known with 79 exons [11]. Most of the mutations are located in two hotspot regions, one near the 5' region, from exon 3-19, and the other in a more centralized position, from exons 43-55. Mutational deletions and duplications in this gene are responsible for 70-75% of all cases, one-third of all cases are new mutations and 2/3 inherited.

DMD, in most cases, is caused by a frame-shift mutation [12] that can lead to prematurely aborted dystrophin synthesis due to a truncated protein [4], or one that is completely non-functional, and BMD is known to be caused by in-frame mutations, generating a protein with an internal flaw or that may be present at reduced levels, but still considered partially functional [13].

Detection of female carriers for DMD/BMD is a very difficult task due to the fact that in heterozygote women an affected allele is masked by an unaffected one, since it is an X-linked recessive disorder [14]. To do so, a quantitative approach is needed in order to detect a deletion in a heterozygote carrier woman. Approaches, up to date, rely on Southern Blot, linkage analysis, FISH [15], and capillary electrophoresis [16], which are not considered very sensitive, may be time-consuming, or have high costs. With the new technology [17] of real-time PCR we have the ability to measure the PCR products as they are accumulating, relatively quantifying the material in question. For the relative quantification you

compare a gene of interest to a control gene [14]. The quantitative real-time PCR has already been used to detect carrier women of different diseases, such as Angelman and Prader-Willi [18], Charcot-Marie-Tooth type 1A [19, 20], and spinal muscular atrophy [2].

It is extremely important that a precise test exists for the correct identification of this status, to offer proper genetic counseling to carrier women of these deletions. The quantitative real-time PCR with Taqman and SYBR Green has already been used as a good assay for the identification of carrier women that possess a deleted or duplicated region in one of the dystrophin gene alleles, limited to exons 44, 45, and 49 [21].

PATIENTS AND METHODS

All of the information concerning patients with DMD/BMD was collected from the medical records at the Serviço de Genética Médica (SGM) in Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), the Associação Gaúcha de Distrofias Musculares (AGADIM), and the Associação de Assistência à Criança Deficiente (AACD), all in Porto Alegre (RS), Brazil.

All of the patients with clinical information regarding their ailments were included in this study. Out of all patients selected, only the ones who had a genetic diagnosis by molecular analysis were used to identify the most frequent deletions in the dystrophin gene. The mother or sister of the patient with DMD/BMD who had a deletion in exons 45, 47, and 51, all located in the second gene hotspot, were contacted to participate in the real-time PCR carrier identification. A total of five non-related women agreed to participate in this study and all signed a consent form.

A maximum of 4mL of peripheral blood was drawn from each female participant in the carrier detection section of this study in a Vacuette® tube with EDTA and stored at 4°C until further processing. The DNA was extracted according to the manufacturer's protocol for a 30-minute extraction from blood, using the Easy DNA kit (Invitrogen) for genomic DNA isolation. This DNA was then quantified using the Quant-It™ Assay Kit (Invitrogen), in which all of the samples were diluted to a 1ng concentration, and stored in a -20°C freezer until future utilization.

For the real-time PCR primers for the exons 45 and 51, previously described [21] were used, as well as exon 47 [22]. The amplifications for exons 45 and 47 were performed using the SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) with 0,5µM of each primer pair tested individually and 2ng of DNA for each reaction in the 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Exon 51 was amplified by using the Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems).

The temperatures used were optimized for the 7500 System, based on the following temperatures: pre-incubation/initial denaturation at 94°C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 58°C for 20 sec (for exons 45 and 47), and an elongation/extension step at 72°C for 35 sec, followed by a 40° cooling phase and a melting curve, starting at 45°C until 94°C, at 0,1°C/sec transition rate. For exon 51, the annealing temperature was 59°C. The fluorescence was measured once during every cycle after the elongation phase.

For the analysis of the quantifications and proper identification of the carrier status, all samples were tested in triplicates, and compared to other women. Each woman was tested for all three exons. Since the initial quantity of DNA was measured, we were able to identify the carrier women, who had a Cycle threshold (Ct) one full cycle higher than the non-carrier women, using each other as positive controls. Only the results that had concordant triplicates were analyzed.

The amplification products were analyzed by the Sequence Detection Software (1.2.2 version - Applied Biosystems) for the 7500 Real-Time PCR System. The DNA was quantified according to the Cycle threshold (Ct) of the standard curves for each exon.

Genetic counseling of the carrier and non-carrier women diagnosed in this study was performed by the SGM-HCPA.

RESULTS

The results included a general description of the sample studied, with important information regarding their diagnosis, origin, and possible transmission, as described in Table 1. The exams regarding a protein approach, such as Western Blot and the Protein Truncation Test; and a DNA approach, including Western Blot and Sequencing were not found in any of the 123 patients observed. Almost all of the patients (94.3%) showed a high CPK dosage diagnosis, but only 54.4% possessed a DNA analysis (Table 1). All but two patients presented a combination of at least two types of diagnosis, aside from the clinical one, to confirm the DMD/BMD. Our patients were mostly from the RS, comprising a good sample from the southernmost region of Brazil (Table 1). According to their clinical records, most transmissions of this disease are unknown, with a confirmed familial transmission in 18 out of 123 patients.

The results of the Multiplex PCR indicated that out of the 67 boys with a DNA PCR investigation, 29 (43.2%) had no deletions encountered by this method, and their DNA result was not confirmatory of the ailment. Information about the remaining 38 are presented in Table 2. Out of the exons investigated [23, 24], the most frequently deleted ones with 33.3% are exons 47, 48, and 50, confirming a higher prevalence of deletions in the second hotspot.

Five women were correctly identified for their carrier status, comparing the same exons amongst themselves in all of the women (Tab. 3). Three women were identified as carriers, and two as non-carriers through the quantitative real-time method.

DISCUSSION

Of the 5.7% of boys without a CPK diagnosis (Tab. 1), 6 of them were diagnosed more than 20 years ago, and one other was diagnosed in 1991, with a confirmatory ENMG exam, demonstrating that nowadays all of the patients that have a suspicion of DMD/BMD met the confirmatory CPK dosages, which is considered a routine exam, always coupled with any other exam (PCR, Biopsy, or ENMG).

Transmission in most cases is still unknown (Tab. 1), because this diagnosis is currently not available in the RS and has to be sent to São Paulo, SP (Brazil) or other countries. Also, the socioeconomic level of the families in question is a large matter to take into consideration, since they are not able to afford it.

The difficulties encountered in trying to recruit women, after a posted newspaper ad, contacting the major associations that may have patients with DMD/BMD, such as AACD and AGADIM, in Porto Alegre, Brazil, and accessing the clinical files in the SGM-HCPA were numerous. After compiling information regarding 123 boys with a confirmed DMD/BMD, only 54.4% had a DNA test. Out of the 67 patients with a molecular test performed, 29 presented no deletion in the dystrophin gene as established by the PCR Multiplex [23, 24], and only 23 had deletions in the second hotspot, which was our main emphasis, especially exons 45, 47, and 51. We were only able to contact and positively draw blood from five women that met the inclusion criteria.

After an analysis of the DNA tests of the 67 boys, we found that the exons 47, 48, and 50 are the most frequent in our population (Tab. 2), and the second

hotspot in the dystrophin gene is the one that has suffered most deletions. In a previous study in RS, the most frequent deletions were also located in the second hotspot, but the most frequently deleted ones, in decreasing order were exon 48, exon 45, and exon 44 [25]. The most commonly deleted one in São Paulo is Exon 50 [26], and most of the deletions encountered in Curitiba, PR (Brazil) involved exons 2-20 (47.45%) [27].

The carrier status of the five women included in our study was determined by real-time quantitative PCR using a SYBR Green I dye approach. The direct comparison of all of the women investigated for these 3 exons permitted an easy determination of their possible carrier status. The approach demonstrated has proven to be different than earlier methods [21], and may be considered more effective, since there is no need to compare one exon with another, facilitating a diagnosis in women with a larger deletion span.

This method can also be important and effective in cases of duplications in the dystrophin gene, since it is dose sensitive, very easy to visualize, and would result in a Ct one full cycle less than that of a non-carrier woman. By obtaining a proper protocol, this method can also be extrapolated to all the exons in the dystrophin gene, that are currently used in determining deletions and duplications in boys, for the detection of carrier women. It is also an interesting approach for quantification in other genetic diseases that are located in the X chromosome, or may depend on this type of precision.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank all of the patients that agreed to participate in this study, and especially AACD and AGADIM for their help pertaining to this project. This research was supported by Brazilian Funding Agencies (CNPq and FINEP-HCPA) and was approved by the Ethics Committee in Research from the Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) at HCPA (05-389).

REFERENCES

- 1 - Moser, H. Duchenne muscular dystrophy: Pathogenic aspects and genetic prevention. *Hum Genet* 1984; 66: 17-40
- 2 - Arning, L; Jagiello, P; Schara U; *et al.* Transcriptional profiles from patients with dystrophinopathies and limb girdle muscular dystrophies as determined by qRT-PCR. *J Neurol* 2004; 251: 72-78
- 3 – Emery, AEH. The muscular dystrophies. *Lancet* 2002; 359: 687-694
- 4 – Van Deutekom, JC; & van Ommen, GJB. Advances in Duchenne Muscular Dystrophy Gene Therapy. *Nat Rev Genet* 2003; 4: 774-783
- 5 – Watchko, J; O'Day, T; Wang, B; *et al.* Adeno-Associated Virus Vector-Mediated Minidystrophin Gene Therapy Improves Dystrophic Muscle Contractile Function in *mdx* Mice. *Hum Gene Ther* 2002; 13: 1451-1460
- 6 – Kapsa, R; Quigley, A; Lynch, GS; *et al.* *In vivo* and *in vitro* Correction of the *mdx* Dystrophin Gene Nonsense Mutation by Short-Fragment Homologous Replacement. *Hum Gene Ther* 2001; 12: 629-642

7 – Barton-Davis, ER; Cordier, L; Shoturma, DI; Leland, SE; & Sweeney, HL. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. J Clin Invest 1999; 104: 375-381

8 – Tinsley, JM; Potter, AC; Phelps, SR; Fisher, R; Trickett, JI; & Davies KE. Amelioration of the dystrophic genotype of *mdx* mice using a truncated utrophin transgene. Nature 1996; 384: 349-353

9 – Rafael, JA; Tinsley, JM; Potter, AC; Deconinck, AE; & Davies, KE. Skeletal muscle-specific expression of a utrophin transgene rescues utrophin-dystrophin deficient mice. Nat Genet 1998; 19: 79-82

10 – Muntoni, F; Torelli, S; & Ferlini, A. Dystrophin and Mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. Lancet Neurol 2003; 2: 731-740

11 – Davies, KE; Pearson, PL; Harper, PS; *et al.* Linkage analysis of two cloned DNA sequences flanking the short arm of the human X chromosome. Nucleic Acids Res 1983; 11: 2303-2312

12 – Monaco, AP; Bertelson, CJ; Liechti-Gallati, S; Moser, H; & Kunkel, LM. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. Genomics 1988; 2: 90-95

13 – Koenig, M; Beggs, AH; Mayer, M; *et al.* The molecular basis for Duchenne versus Becker Muscular Dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet* 1989; 45: 498-506

14 – Ginzinger, DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 2002; 30: 503–512

15 – Ligon, AH; Kashork, CD; Richards, CS; & Shaffer, LG. Identification of female carriers for Duchenne and Becker muscular dystrophies using a FISH-based approach. *Eur J Human Genet* 2000; 8: 293

16 – Fortina, P; Chenga, J; Shoffner, MA; *et al.* Diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy and quantitative identification of carrier status by use of entangled solution capillary electrophoresis. *Clin Chem* 1997; 43: 745-751

17 – Higuchi, R; Fockler, C; Dollinger, G; & Watson, R. Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Biotechnol* 1993; 11: 1026-1030

18 – Raca, G; Buiting, K; & Das, S. Deletion analysis of the Imprinting Center Region in patients with Angelman Syndrome and Prader-Willi Syndrome by Real-Time Quantitative PCR. *Genet Test* 2004; 8: 387-394

19 – Kim, SW; Lee, KS; Jin, HS; *et al.* Rapid Detection of Duplication/Deletion of the PMP22 Gene in Patients with Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1A and Hereditary Neuropathy with Liability to Pressure Palsy by Real-time Quantitative PCR using SYBR Green I Dye. J Korean Med Sci 2003; 18: 727-732

20 – Ruiz-Ponte, C; Loidi, L; Vega, A; Carracedo, A; & Barros, F. Rapid Real-Time Fluorescent PCR Gene Dosage Test for the Diagnosis of DNA Duplications and Deletions. Clin Chem 2000; 46: 1574-1582

21 – Joncourt, F; Neuhaus, B; Jostarndt-Foegen, K; Kleinle, S; Steiner, B; & Gallati, S. Rapid Identification of Female Carriers of DMD/BMD by Quantitative Real-Time PCR. Hum Mutat 2004; 23: 385-391

22 – Beggs, AH; Hoffman, EP; Snyder, JR; *et al.* Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy: dystrophin gene and protein studies. Am J Hum Genet 1991; 49: 54-67

23 – Beggs, AH; Koenig, M; Boyce, FM; & Kunkel, LM. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. Hum Genet 1990; 86: 45-48

24 – Chamberlain, JS, Gibbs, RA, Ranier, JE; Bguyen, PN; & Thomas, C. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. Nucleic Acids Res 1988; 16: 11141-11156

25 – Alho, CS; Salzano, FM; & Zatz, M. Analysis of deletions and their relationship with clinical severity, family recurrence, and intelligence in Duchenne and Becker Muscular Dystrophy patients from Southern Brazil. *Brazilian Journal of Genetics* 1995; 18: 617-622

26 – Rosenberg, C; Navajas, L; Vagenas, DF; *et al.* Clinical diagnosis of heterozygous dystrophin gene deletions by fluorescence in situ hybridization. *Neuromuscular Disord* 1998; 8: 447-452

27 – Werneck, LC; Scola, RH; Maegawa, GHB; & Werneck, MCM. Comparative analysis of PCR-deletion detection and immunohistochemistry in Brazilian Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. *Am J Med Genet* 2001; 103: 115-120

Table 1 – Patient information regarding diagnosis.

	DMD	DMB	TOTAL
DM diagnosis [n(%)]	108	15	123
CPK	101 (93.5%)	15 (100%)	116 (94.3%)
ENMG	65 (60.2%)	12 (80%)	77 (62.6%)
Muscle Biopsy	18 (16.7%)	1 (6.7%)	19 (15.4%)
PCR (DNA)	61 (56.5%)	6 (40%)	67 (54.4%)
Clinical analysis	108 (100%)	15 (100%)	123 (100%)
Origin [n(%)]			
RS	104 (96.3%)	15 (100%)	119 (96.7%)
Other states	4 (3.7%)	0 (0%)	4 (3.3%)
Transmission			
Familial	16 (14.8%)	2 (13.3%)	18 (14.6%)
Sporadic	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Unknown	92 (85.2%)	13 (86.7%)	105 (85.4%)

Table 1 – (DMD) Duchenne Muscular Dystrophy; (BMD) Becker Muscular Dystrophy; (CPK) Creatine Phosphokinase; (ENMG) electroneuromiography; (PCR) Multiplex Polimerase Chain Reaction for the dystrophin gene; (RS) Rio Grande do Sul State, Brazil.

Table 2 – Schematic representation of the exon deletions encountered in patients by Multiplex PCR investigation.

Patients	MP	Deleted Exons Detected by PCR Multiplex																
		4	6	8	12	13	17	19	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
001	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
003	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
005; 019	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
006; 007	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
008; 010	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
009	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
012; 013 ¹	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
014	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
018	+	*	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
020	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
021	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
022	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
023; 024 ¹	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
026	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
027; 028 ¹	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
029; 030; 031 ¹	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
032	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
033	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
034	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
037	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
038	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
039	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
040	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
041; 042 ²	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
011; 015; 096; 114; 115	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TOTAL (38 ³)	1 3.0%	3 9.1%	5 15.2%	4 12.1%	5 15.2%	5 15.2%	5 15.2%	3 9.1%	4 12.1%	8 24.2%	8 24.2%	11 33.3%	8 24.2%	8 24.2%	11 33.3%	9 27.3%	8 24.2%	
[n(%)]																		

Table 2 – Numbers correspond to the patients who have a PCR DNA test. The second to last line lists five patients who performed the test, with a duplication or deletion encountered, but with no exon specification by the test center. (MP) Muscular Promoter; (+) non-deleted exon; (-) deleted exon; (¹) sibs; (*) possibly deleted exon; (²) cousins; (³) Five sequences do not give specific information by site; percentages calculated for a total of 33 patients.

Tab. 3 – Results of carrier women status of DMD/BMD by use of real-time quantitative PCR.

Women	Son Del	N° of copies			Status
		Ex45	Ex47	Ex51	
001	Ex 51	2	2	1	Carrier
006	Ex 45	1	2	2	Carrier
007	Ex 45	2	2	2	Non-carrier
014	Ex 47/52	2	1	2	Carrier
038	Ex 45/46/47	2	2	2	Non-carrier

Table 3 – The number of copies observed by the quantification, comparing the five women tested and controls. (Son Del) Deletion already detected in affected boy; (Ex) Exon.

4. DISCUSSÃO

O diagnóstico de meninos com DMD/BMD (Tab. 1) é realizado por todos os meninos pela dosagem da CPK, porém em mais de 5% dos casos foi realizado por outros métodos ou somente por análise clínica. Destes sete casos, seis são meninos portadores diagnosticados há mais de 20 anos atrás, 5 com o exame da ENMG, com datas de nascimento entre 1966 e 1985 e o outro nascido em 1961 sem nenhum exame complementar, somente o clínico. O outro menino sem a realização da dosagem da enzima CPK, nascido em 1991, fez a ENMG, confirmando o diagnóstico.

O diagnóstico nunca é realizado somente pela CPK, mas sempre em conjunto com exames complementares, como a ENMG, a biópsia muscular, ou o exame genético. Somente dois casos portavam exclusivamente o diagnóstico por análise clínica e aumento significativo da CPK no sangue, sem exames alternos.

A ENMG se tornou um exame complementar largamente usado, apesar de ser um exame considerado invasivo. Presente em um pouco mais de 60% dos casos, serve como complementação ao resultado clínico e para confirmação de que existe uma lesão muscular, causando o aumento da CPK, confirmando a DMD/BMD.

A biópsia muscular é significativamente menos usada, em 15,4% dos casos, pois é um exame bastante invasivo, apesar de ser importante também na diferenciação entre a DMD e a BMD.

As técnicas utilizadas anteriormente para complementação dos exames clínicos, como o "Southern Blot" e o PTT, medindo a quantidade de proteína

distrofina presente e o “Western Blot”, para identificação do gene da proteína distrofina presente no DNA não são mais solicitadas. Já o seqüenciamento de toda a região, de diversas regiões específicas ou dos dois “hotspots” gênicos, é uma técnica que não foi utilizada em nenhum dos casos registrados aqui. Esta técnica é de alto custo, e muitas vezes considerada inviável tecnicamente, devido ao tamanho do gene, e não é muito mais eficiente que o PCR Multiplex na identificação das deleções e duplicações.

A transmissão da maioria dos casos ainda é desconhecida, como está demonstrado na Tabela 1, sem nenhum caso esporádico já identificado. Os casos de transmissão familiar, com confirmação de portadoras por diversos métodos, são verdade para 14,6% da população estudada. Este número baixo é devido ao alto custo para identificar mulheres portadoras e as famílias que possuem estas condições precisam mandar o seu material para análise em São Paulo ou no exterior.

Após diversas tentativas de obter maior número de contatos para ampliação da amostra, não obtivemos o sucesso esperado. A primeira busca por pacientes DMD/BMD foi na AGADIM, pois seria a fonte com mais fácil acesso aos registros, pois já havíamos um vínculo com a instituição. Esta associação não presta serviços somente a pacientes, parentes e familiares DMD/BMD, mas todos os tipos de distrofias musculares, então a busca pelo maior número possível de famílias com esta doença foi diminuindo. O resultado obtido desta abordagem foi 27 pacientes com contatos telefônicos, do RS. Destes, nove não possuíam exame de DNA realizado; não foi possível entrar em contato com oito famílias, pois os telefones para contato já não existiam, ou não era possível encontrá-los em casa;

sete não possuíam deleção no exame de DNA; dois resultaram em coletas positivas, com deleções nos exons 45 ou 51; e uma não tinha interesse em participar, por motivo de depressão. Então, dos 27 pacientes, só conseguimos informações pertinentes a 19 famílias com DMD/BMD.

A próxima fonte para obtenção de informações foram as fichas clínicas do SGM do HCPA. Conseguimos informações completas dos pacientes, com resultados de todos os exames realizados de 101 meninos com DMD/BMD. Alguns destes meninos eram os mesmos que já haviam sido contatados pela AGADIM.

Um anúncio no jornal foi outra abordagem buscada, pois seria uma fonte possível de obtenção de novas amostras com filhos com DMD/BMD com deleções na região de nosso interesse. Apesar da veiculação nos grandes jornais de Porto Alegre, como Zero Hora, Correio do Povo e Diário Gaúcho, o retorno foi mínimo, e não se mostrou muito eficaz no recrutamento de novas famílias a participarem do estudo.

Achamos mais uma alternativa para a busca de novas coletas na AACD. Desde o princípio todos se mostraram bastante atenciosos e dedicados pela causa. A quantidade de contatos obtidos foram 19 meninos com DMD/BMD, porém com a falta de exame de DNA realizado, em quase todos os casos, menos um, com coleta positiva de uma mãe com o filho com a deleção nos exons 47 e 52. Estas famílias possuem uma situação econômica mais fragilizada e por isso é mais difícil a realização de exames que não são incluídos no Sistema Único de Saúde (SUS), dificultando a obtenção de famílias capacitadas a realizarem este exame de detecção de mulheres portadoras.

Não só o fato de não conseguirmos obter mulheres com filhos com deleções nas regiões que estamos estudando, a dificuldade em obter um contato atualizado, com telefone ou endereço, se tornou recorrente. O banco de dados acaba se tornando desatualizado devido à mudança de endereço dos pacientes e troca constante de número de telefone em uma grande quantidade dos casos, dificultando o nosso trabalho quando precisamos localizar estas pessoas.

De todos os exames de DNA realizados nos nossos pacientes, 45,4% deles foram determinados por um projeto de pesquisa desenvolvido em 1993 (Alho *et al*, 1995) de forma gratuita para os pacientes, demonstrando que a situação econômica deles é mais complicada do que se imaginava, com somente 29,2% do total de meninos acometidos possuindo o exame de DNA realizado em outros lugares.

A ênfase deste trabalho estava voltada para a identificação das mulheres portadoras, e devido a isso, não buscamos fazer testes moleculares nos meninos acometidos para a identificação de deleções e duplicações, por PCR Multiplex. Não acreditávamos que teríamos problemas na busca de meninos com análise de DNA realizado, e isto não foi abordado no início do projeto, comprometendo o tamanho da nossa amostra final de mulheres portadoras. Futuramente, seria de grande interesse para este tipo de pesquisa uma abordagem para permitir o acesso a este exame, às vezes tão fundamental para o esclarecimento da herança familiar, permitindo um aconselhamento genético mais esclarecido.

Considerando que 54,4% dos pacientes possuíam um exame de DNA realizado, diminuindo a nossa amostra de interesse em busca de possíveis mulheres portadoras, muitos resultados eram negativos, sem nenhuma deleção

encontrada nos dois hotspots gênicos testados por PCR Multiplex (Tab. 2). Este número era elevado, de 43,3%, diminuindo a nossa amostra para 38 pacientes possíveis de serem contatados por apresentarem um exame de DNA positivo já realizado.

Destes 38 pacientes com o exame de DNA realizado, 18 meninos tinham deleções nas regiões de interesse para o nosso estudo (o segundo hotspot gênico), sendo que tivemos somente cinco coletas positivas, com mulheres concordantes em participar da pesquisa na obtenção do status de portadora ou não. Do restante, uma não tinha interesse em participar, pois estava em estado depressivo pronunciado e não foi possível localizar as outras mulheres, devido à falta de um contato telefônico ou endereço correto.

Acreditávamos que não podíamos contar com as amostras que tinham todo o segundo “hotspot” gênico deletado, já que a nossa análise e identificação de portadoras se basearia fundamentalmente na quantificação relativa entre um exon deletado e um outro não deletado (Joncourt *et al*, 2004). Após as análises realizadas, conseguimos demonstrar que isto não se tornava verdade para o nosso teste, pois a quantificação se baseava na comparação direta de um único exon por vez em todas as mulheres em estudo. As portadoras deste exon tinham metade do material inicial do que as não-portadoras deste exon, sendo possível verificar esta diferença pela quantificação inicial do DNA de todas as mulheres.

As deleções nos exons 47, 48 e 50 foram as mais freqüentes encontradas na nossa amostra, com 33,3% de freqüência, e logo após o exon 51 com uma freqüência de 27,3% (Tab. 2). O segundo “hotspot” gênico da distrofina é de fato o mais deletado no RS, assim como em diversos outros estudos, no Marrocos, com

81% dos casos de deleção nesta região central (Sbiti, Kerch & Stefiani, 2002). Em outro estudo, com iranianos, 74% das deleções se concentram nesta mesma região, com os exons 50, 48 e 47 mais frequentemente deletados (16,2%, 16,2%, e 12%, respectivamente) (Kia, 2003).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alho, CS; Salzano, FM; & Zatz, M. Analysis of deletions and their relationship with clinical severity, family recurrence, and intelligence in Duchenne and Becker Muscular Dystrophy patients from Southern Brazil. *Brazilian Journal of Genetics* 1995; 18: 617-622
- Angelini, C. The role of corticosteroids in muscular dystrophy: a critical appraisal. *Muscle Nerve*; May 31, (2007) [Epub ahead of print]
- Arahata, K; Beggs, AH; Honda, H; *et al.* Preservation of the C-terminus of dystrophin molecule in the skeletal muscle from Becker muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 1991; 101: 148-156
- Arning, L; Jagiello, P; Schara U; *et al.* Transcriptional profiles from patients with dystrophinopathies and limb girdle muscular dystrophies as determined by qRT-PCR. *J Neurol* 2004; 251: 72-78
- Barton-Davis, ER; Cordier, L; Shoturma, DI; Leland, SE; & Sweeney, HL. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J Clin Invest* 1999; 104: 375-381
- Beggs, AH; & Kunkel, LM. Improved Diagnosis of Duchenne/Becker Muscular Dystrophy. *J Clin Invest* 1990; 85: 613-619
- Beggs, AH; Koenig, M; Boyce, FM; & Kunkel, LM. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1990; 86: 45-48
- Beggs, AH; Hoffman, EP; Snyder, JR; *et al.* Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy: dystrophin gene and protein studies. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 54-67
- Bennett, RR; den Dunnen, J; O'Brien, KF; Darras, BT; & Kunkel, LM. Detection of mutations in the dystrophin gene via automated DHPLC screening and direct sequencing. *BMC Genet* 2001; 2: 17
- Brais, B; Bouchard, J-P; Xie, Y-G; *et al.* Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nat Genet* 1998; 18: 164-167
- Bushby, KMD. The limb-girdle muscular dystrophies – multiple genes, multiple mechanisms. *Hum Molec Genet* 1999; 8: 1875-1882
- Campbell, C; & Jacob, P. Deflazacort for the treatment of Duchenne Dystrophy: A systematic review. *BMC Neurol* 2003; 3: 7

Chamberlain, JS, Gibbs, RA, Ranier, JE; Bguyen, PN; & Thomas, C. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 11141-11156

Crawford, GE; Faulkner, JA; Crosbie, RH; Campbell, KP; Froehner, SC; & Chamberlain, JS. Assembly of the Dystrophin-associated Protein Complex Does Not Require the Dystrophin COOH-terminal Domain. *J Cell Biol* 2000; 150: 1399-1409

Davies, KE; Pearson, PL; Harper, PS; *et al.* Linkage analysis of two cloned DNA sequences flanking the short arm of the human X chromosome. *Nucleic Acids Res* 1983; 11: 2303-2312

Dolinsky, LCB; Moura-Neto RS; & Falcão-Conceição, DN. DGGE analysis as a tool to identify point mutations, de novo mutations and carriers of the dystrophin gene. *Neuromuscular Disord* 2002; 12: 845–848

Emery, AEH. The muscular dystrophies. *Lancet* 2002; 359: 687-694

Emery, AEH. Fortnightly review: The muscular dystrophies. *BMJ* 1998; 317: 991-995

Emery, AE. Emery-Dreifuss syndrome. *J Med Genet* 1989; 26: 637-641

Feldkötter, M; Scharzer, V; Wirth, R; Wienker, TF; & Wirth, B. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on Real-Time LightCycler PCR: Fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of Spinal Muscular Atrophy. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 358–368

Feng, J; Yan, J; Buzin, CH; Towbin, JA; & Sommer, SS. Mutations in the dystrophin gene are associated with sporadic dilated cardiomyopathy. *Mol Genet Metab* 2002; 77: 119-126

Fortina, P; Chenga, J; Shoffner, MA; *et al.* Diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy and quantitative identification of carrier status by use of entangled solution capillary electrophoresis. *Clin Chem* 1997; 43: 745-751

Ginzinger, DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 2002; 30: 503–512

Grain, L; Cortina-Borja, M; Forfar, C; Hilton-Jones, D; Hopkin, J; & Burch, M. Cardiac abnormalities and skeletal muscle weakness in carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophies and controls. *Neuromuscular Disord* 2001; 11: 186-191

Granata, C; Merlini, L; Cervellati, S; *et al.* Long term results of spine surgery in Duchenne Muscular Dystrophy. *Neuromuscular Disord* 1996; 6: 61-68

Gokgoz, N; Kuseyri, F; Topaloglu, H; Yuksel, AM; & Kirdar, M. Screening of deletions and RFLP analysis in Turkish DMD/BMD families by PCR. Clin Genet 1993; 43: 261-266

Gussoni, E; Soneoka, Y; Strickland, CD; *et al.* Dystrophin expression in the *mdx* mouse restored by stem cell transplantation. Nature 1999; 401: 390-394

Heid, CA; Stevens, J; Livak, KJ; *et al.* Real time quantitative PCR. Genome Res 1996; 6: 986-994

Higuchi, R; Fockler, C; Dollinger, G; & Watson, R. Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. Biotechnol 1993; 11: 1026-1030

Hung, CC; Su, YN; Lin, CY; *et al.* Denaturing HPLC Coupled with Multiplex PCR for Rapid Detection of Large Deletions in Duchenne Muscular Dystrophy Carriers. Clin Chem 2005; 51: 1252-1256

Ibraghimov-Beskrovnaia, O; Ervasti, JM; & Leveille, CJ. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. Nature 1992; 355: 696-702

Joncourt, F; Neuhaus, B; Jostarndt-Foegen, K; Kleinle, S; Steiner, B; & Gallati, S. Rapid Identification of Female Carriers of DMD/BMD by Quantitative Real-Time PCR. Hum Mutat 2004; 23: 385-391

Kapsa, R; Quigley, A; Lynch, GS; *et al.* *In vivo* and *in vitro* Correction of the *mdx* Dystrophin Gene Nonsense Mutation by Short-Fragment Homologous Replacement. Hum Gene Ther 2001; 12: 629-642

Kia, SK. Farhud, DD, Zeinali, S; *et al.* Molecular Analysis of Iranian Patients with Duchenne/Becker Muscular Dystrophies. Iranian J Publ Health 2003; 32: 47-53

Kingston, HM; Sarfarazi, M; Thomas, NST; & Harper, PS. Localization of the Becker muscular dystrophy gene on the short arm of the X chromosome by linkage to cloned DNA sequences. Hum Genet 1984; 67: 6-17

Kim, SW; Lee, KS; Jin, HS; *et al.* Rapid Detection of Duplication/Deletion of the PMP22 Gene in Patients with Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1A and Hereditary Neuropathy with Liability to Pressure Palsy by Real-time Quantitative PCR using SYBR Green I Dye. J Korean Med Sci 2003; 18: 727-732

Koenig, M; Hoffman, EP; Bertelson, CJ; Monaco, AP; Feener, C; & Kunkel, LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. Cell 1987; 50: 509-517

Koenig, M; Beggs, AH; Mayer, M; *et al.* The molecular basis for Duchenne versus Becker Muscular Dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet* 1989; 45: 498-506

Ligon, AH; Kashork, CD; Richards, CS; & Shaffer, LG. Identification of female carriers for Duchenne and Becker muscular dystrophies using a FISH-based approach. *Eur J Human Genet* 2000; 8: 293

Mendell, JR; Buzin, CH; Feng, J; *et al.* Diagnosis of Duchenne dystrophy by enhanced detection of small mutations. *Neurology* 2001; 57: 645-650

Monaco, AP; Bertelson, CJ; Liechti-Gallati, S; Moser, H; & Kunkel, LM. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 1988; 2: 90-95

Moser, H. Duchenne muscular dystrophy: Pathogenic aspects and genetic prevention. *Hum Genet* 1984; 66: 17-40

Muntoni, F; Torelli, S; & Ferlini, A. Dystrophin and Mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol* 2003; 2: 731-740

Muntoni, F; Gobbi, P; Sewry, C; *et al.* Deletions in the 5' region of dystrophin and resulting phenotypes. *J Med Genet* 1994; 31: 843-847

Nonaka, I. Distal myopathies. *Curr Opin Neurol* 1999; 12: 493-499

Pasternak, C; Wong, S; & Elson, EL. Mechanical function of dystrophin in muscle cells. *J Cell Biol* 1995; 128: 355-361

Ponchel, F; Toomes, C; Bransfield, K; *et al.* Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol* 2003; 3: 18

Prior, TW; Papp, AC; Snyder, PJ; *et al.* Determination of Carrier Status in Duchenne and Becker Muscular Dystrophies by Quantitative Polymerase Chain Reaction and Allele-Specific Oligonucleotides. *Clin Chem* 1990; 36: 2113-2117

Raca, G; Buiting, K; & Das, S. Deletion analysis of the Imprinting Center Region in patients with Angelman Syndrome and Prader-Willi Syndrome by Real-Time Quantitative PCR. *Genet Test* 2004; 8: 387-394

Rafael, JA; Tinsley, JM; Potter, AC; Deconinck, AE; & Davies, KE. Skeletal muscle-specific expression of a utrophin transgene rescues utrophin-dystrophin deficient mice. *Nat Genet* 1998; 19: 79-82

- Rando, TA. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 2001; 12: 1575-1594
- Roberts, RG; Bobrow, M; & Bentley, DR. Point mutations in the dystrophin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 2331-2335
- Sbiti, A; Kerch, FE; & Sefiani, A. Analysis of Dystrophin Gene Deletions by Multiplex PCR in Moroccan Patients. *J Biomed Biotech* 2002; 2: 158-160
- Simard, LR; Gingras, F; & Labuda, D. Direct analysis of amniotic fluid cells by multiplex PCR provides rapid prenatal diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *Nucleic Acids Research* 1991; 9: 2501
- Strachan, T & Read, AP. *Human Molecular Genetics 2*. New York: BIOS Scientific Publishers Ltd, 1999.
- Tinsley, JM; Potter, AC; Phelps, SR; Fisher, R; Trickett, JI; & Davies KE. Amelioration of the dystrophic genotype of *mdx* mice using a truncated utrophin transgene. *Nature* 1996; 384: 349-353
- Traverso, M; Malnati, M; Minetti, C; *et al.* Multiplex real-time PCR for detection of deletions and duplications in dystrophin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 339: 145-150
- Van Deutekom, JC; & van Ommen, GJB. Advances in Duchenne Muscular Dystrophy Gene Therapy. *Nat Rev Genet* 2003; 4: 774-783
- Watchko, J; O'Day, T; Wang, B; *et al.* Adeno-Associated Virus Vector-Mediated Minidystrophin Gene Therapy Improves Dystrophic Muscle Contractile Function in *mdx* Mice. *Hum Gene Ther* 2002; 13: 1451-1460
- White, S; Kalf, M; Liu, Q; *et al.* Comprehensive detection of genomic duplications and deletions in the *DMD* gene, by use of Multiplex Amplifiable Probe Hybridization. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 365-374
- Wijmenga, C; Padberg, GW; Moerer, P; *et al.* Mapping of facioscapulohumeral muscular dystrophy gene to chromosome 4q35-qter by multipoint linkage analysis and *in situ* hybridization. *Genomics* 1991; 9: 570-575
- Winnard, AV; Mendell, JR; Prior, TW; Florence, J; & Burghes, AHM. Frameshift Deletions of Exons 3-7 and Revertant Fibers in Duchenne Muscular Dystrophy: Mechanisms of Dystrophin Production. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 158-166
- Yau, SC; Bobrow, M; Mathew CG; & Abbs, SJ. Accurate diagnosis of carriers of deletions and duplications in Duchenne/Becker muscular dystrophy by fluorescent dosage analysis. *J Med Genet* 1996; 33: 550-558

REFERÊNCIAS ELETRÔNICAS:

<http://www.sonderpaed-online.de/behind/progmd/progmd.htm>:
Muskeldystophie, acessada em 10/07/2007.

Progressive

6. ANEXOS

6.1. Protocolo de liberação pelo Comitê de Ética _____	81
6.2. Carta de libertação de recursos pelo FIPE _____	82
6.3. Formulário para coleta de dados _____	83
6.4. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido _____	84
6.5. Recorte dos anúncios nos jornais _____	88
6.6. Carta de liberação do acesso aos registros AACD _____	90
6.7. Resultados do PCR em tempo real _____	91

6.1. Protocolo de liberação pelo Comitê de Ética



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto.

Projeto: 05-389

Versão do Projeto: 07/11/2005

Versão do TCLE: 24/11/2005

Pesquisadores

ROBERTO GIUGLIANI
CLARICE SAMPAIO ALHO
CAROLINA ROSA FRANCO
URSULA DA SILVEIRA MATTE
MARIA LUIZA PEREIRA

Título: ANÁLISE DE DELEÇÕES/DUPLICAÇÕES NO GENE DA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE/BECKER EM MULHERES PORTADORAS DO RIO GRANDE DO SUL POR PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL

- Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA. Somente poderão ser utilizados os Termos de Consentimento onde consta a aprovação do GPPG/HCPA.

- De acordo com a regulamentação da Resolução 340/2004 do CNS/MS o CEP/HCPA foi credenciado, através da Carta Circular Nº 037 CONEP/CNS/MS de 11 de agosto de 2004, para dar aprovação final para este projeto.

Porto Alegre, 24 de novembro de 2005.

Profª Nadine Clausell
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA

6.2. Carta de liberação de recursos pelo FIPE



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

Porto Alegre, 12 de dezembro de 2005

Il.mo(a) Sr.(a)
ROBERTO GIUGLIANI
Prezado(a) Pesquisador(a)

Gostaríamos de comunicar que em reunião realizada no dia 06/12/2005 a Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde aprovaram recursos financeiros do FIPE para o projeto GPPG:

05-389

ANÁLISE DE DELEÇÕES/DUPLICAÇÕES NO GENE DA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE/BECKER EM MULHERES PORTADORAS DO RIO GRANDE DO SUL POR PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL.

APROVADO O VALOR DE R\$ 3.975,00, SENDO R\$ 3.075,00 PARA AQUISIÇÃO DE MATERIAIS DE CONSUMO E R\$ 900,00 PARA AXAMES LABORATORIAIS.

Solicitamos seu comparecimento no GPPG para esclarecimentos quanto as normas de utilização deste recurso, caso não seja do seu conhecimento.

Atenciosamente,


Prof. Nadine Clausell
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA

6.3. Formulário para coleta de dados

COLETA DE DADOS

Mulheres aparentadas de Pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne / Becker (DMD/BMD)

Data: ___ / ___ / ___

DADOS PESSOAIS

Nome do Sujeito da Pesquisa: _____

Data de Nascimento: ___ / ___ / ___

Estado Civil: _____

Número de Filhos: _____ homens e _____ mulheres

Escolaridade: _____

Profissão: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ Estado: _____ CEP: _____

Telefone: _____

Telefone alternativo: _____

Endereço alternativo para contato: _____

Parentesco com o paciente: _____

DADOS DO PACIENTE (MENINO APARENTADO COM DMD/BMD)

- DADOS PESSOAIS

Nome do paciente: _____

Data de Nascimento do paciente: ___ / ___ / ___

- DADOS GENÉTICOS DO PACIENTE

Deleção ou Duplicação já identificada: _____ (sublinhar se deleção ou duplicação)

Exons deletados ou duplicados: _____

Data do exame genético: ___ / ___ / ___

Local da realização do exame genético: _____

COLETA DE SANGUE

Coleta de Sangue do sujeito da pesquisa:

() Sim

() Não

Ficha preenchida por: _____

6.4. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – SUJEITOS DA PESQUISA

Página - 1 - de 4

Título da pesquisa:

Análise de deleções/duplicações no gene da Distrofia Muscular de Duchenne/Becker em mulheres portadoras do Rio Grande do Sul por PCR quantitativo em tempo real.

Justificativa e objetivos da pesquisa:

Esta pesquisa tem como objetivo principal identificar as mulheres portadoras de alterações (deleções/duplicações) no gene da Distrofia Muscular de Duchenne/Becker (DMD/BMD). A DMD/BMD ocorre devido a alguma alteração no gene da distrofina, que está contido no nosso material genético (DNA). Este gene, quando alterado, diminui ou impede a produção da proteína distrofina. Esta proteína é importante para a manutenção dos nossos músculos, permitindo que eles suportem a contração muscular. A ausência ou a baixa produção desta proteína leva uma pessoa a ter esta doença muscular que impede ela de manter os seus músculos. O gene da distrofia se localiza numa parte do DNA chamada cromossomo X. As mulheres possuem dois cromossomos X, portanto, duas cópias deste gene, e os homens só possuem um cromossomo X, e com isso, só uma cópia deste gene.

Esta doença muscular atinge basicamente os homens, justamente por terem uma única cópia deste gene da distrofina. Quando esta única cópia se encontra alterada, o indivíduo apresenta DMD/BMD. As mulheres, por possuírem duas cópias deste gene são protegidas da doença, pois quando uma das cópias se encontra alterada, a outra, geralmente, é funcional. Ter somente uma cópia do gene funcional já permite que as mulheres continuem produzindo níveis normais da proteína necessária para os seus músculos, sendo consideradas saudáveis, apesar de serem portadoras.

Mulheres familiares (mães, irmãs e tias) de meninos com DMD/BMD podem possuir a mesma alteração que os meninos em uma das duas cópias do gene da distrofia. Uma mulher que possui uma cópia do gene da distrofia é tida como portadora da doença. Isto quer dizer que ela "carrega" esta alteração em uma das cópias do seu gene da distrofina, mas não é doente. Sendo portadora, ela tem 50% de possibilidade de passar este gene alterado aos seus filhos. Quando a mãe transmite este gene alterado aos seus filhos homens, estes serão doentes com DMD/BMD, porém quando ela transmite este gene alterado às suas filhas mulheres, elas também serão portadoras como a mãe.

Saber o seu estado de portadora, sendo tia, irmã ou mãe de uma criança com DMD/BMD é importante na hora de planejar ter uma família, já que a chance de se ter um filho com a doença é alta. Queremos, com este estudo permitir que as mulheres familiares de meninos com Distrofia Muscular de Duchenne/Becker possam saber se são ou não portadoras desta alteração neste gene.

Como este gene é bastante grande, é necessário para os pesquisadores saberem qual a alteração que o menino aparentado apresenta, para buscarmos no seu DNA esta mesma alteração. Se você não possuir a mesma alteração, será considerada "não-portadora" do gene alterado da distrofina e não precisará se preocupar com isso na hora de pensar em ter filhos. Já se você possui esta alteração no gene, será considerada "portadora" e poderá receber

Rubrica do Sujeito da Pesquisa (ou responsável)

HCPA / CPPG
VERSÃO APROVADA

24.11.105
105385

Rubrica do Pesquisador

GPPG - Recebido

23 NOV 2005

Por Elaine M. [Assinatura]

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – SUJEITOS DA PESQUISA

Página - 2 - de 4

aconselhamento genético para entender os riscos e chances de ter um filho com esta doença. Este teste não é necessário nos homens, pois os que têm a alteração no gene apresentam DMD/DMB e os que não possuem a alteração são saudáveis e não-portadores.

Os procedimentos a serem utilizados:

Para realizar este trabalho, vamos usar uma amostra de seu sangue e deste sangue será extraído o DNA para análise. Um questionário também será realizado, sobre os seus dados pessoais do sujeito, para posterior contato, e dados referentes à alteração (deleção/duplicação) no gene do menino afetado com DMD/BMD aparentado.

Os desconfortos ou riscos esperados:

A participação no estudo implica na coleta de 4ml de sangue, com riscos e desconfortos mínimos. Que poderá ser dor no momento da coleta e formação de hematoma (vermelhidão) na região da coleta, após ela ter sido realizada.

Garantia de resposta a qualquer pergunta;

Você (ou responsável) deve sentir-se à vontade para fazer qualquer pergunta a fim de esclarecer suas dúvidas. Os responsáveis pela pesquisa garantidamente responderão.

Os benefícios que se pode obter:

Você obterá conhecimento do estado de portadora ou não-portadora do gene da distrofia. Este resultado poderá influenciar sua escolha de querer ou não ter filhos. Este exame é meramente um teste de detecção, e não impede, de maneira alguma, que você deseje engravidar futuramente.

Além do conhecimento a respeito do seu estado, será oferecido aconselhamento genético a todas as mulheres que participaram deste estudo, incluindo as portadoras e não-portadoras.

Liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si:

Caso você (ou o responsável) tenha vontade de ser retirado da pesquisa, isso poderá ser feito a qualquer momento, sem necessidade de que se apresentem justificativas e sem que ele sofra qualquer tipo de prejuízo. Unicamente você (ou o responsável) deverá comunicar aos pesquisadores sua decisão de abandonar a pesquisa, retirando-se o consentimento dado.

Compromisso com informação atualizada do estudo:

Toda e qualquer informação atualizada sobre este estudo estará à disposição de todos os que participam do mesmo. Os resultados deste estudo poderão ser comunicados aos sujeitos da pesquisa (ou responsáveis), sempre que solicitados.

Garantia de Privacidade:

A dignidade e a sua privacidade, em relação a qualquer dado utilizado nesta pesquisa, serão mantidas. Seus dados estarão protegidos pelos pesquisadores responsáveis contra qualquer

Rubrica do Sujeito da Pesquisa (ou responsável)

HCPA / CPPG
VERSÃO APROVADA

24/11/2015
105387

Rubrica do Pesquisador

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – SUJEITOS DA PESQUISA

Página - 3 - de 4

tipo de uso que não os previstos na investigação. Além disto, os dados receberão um número pelo qual serão identificados, garantindo assim, também, seu anonimato. Sua identidade será, portanto, totalmente protegida pela equipe do trabalho de pesquisa ou por qualquer outra pessoa.

Permissão para uso da amostra de DNA e outros dados em estudos futuros:

A partir da mesma amostra do material genético, poderão ser futuramente estudados outros segmentos de DNA ou outras técnicas para o diagnóstico de mulheres portadoras. Para isso, você (ou o responsável) poderá permitir que sua amostra de DNA seja usada em novos estudos. Mesmo que esta permissão seja dada, estudos futuros só poderão ser realizados desde que sejam aprovados antes por um Comitê de Ética em Pesquisa.

Eu, _____ (preencher com nome do responsável) fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informação a respeito dos procedimentos do estudo e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar. A Bióloga Carolina Rosa Franco certificou-me de que todos os dados referentes ao sujeito desta pesquisa serão confidenciais, e que, ainda, terei a liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa se assim o desejar. Assim, como responsável pelo sujeito da pesquisa _____ (preencher com nome do sujeito da pesquisa), dou consentimento para que ele participe da pesquisa.

Paralelamente,

() permito que a amostra de material genético seja usada em pesquisas futuras, sem a necessidade de nova consulta, desde que os novos estudos sejam devidamente aprovados por um Comitê de Ética em Pesquisa e estejam sob responsabilidade do mesmo Pesquisador Coordenador. Fui informado que, também nesta situação, caso alguma informação considerada importante seja identificada no material genético analisado em decorrência da pesquisa, os pesquisadores poderão buscar ao paciente (ou ao responsável) para oferecer-lhe acesso a tal informação. Assim,

() estou de acordo em receber a informação.

() não me interessa pelas informações.

() não permito que o material genético seja usado em novos estudos.

Caso tenha novas perguntas sobre este estudo, para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo, ou se penso que fui prejudicado pela minha participação posso telefonar à Bióloga Carolina Rosa Franco nos telefones (51) 9648-1606 ou (51) 3381-2624 ou o Dr. Roberto Giugliani pelo Serviço de Genética Médica no telefone (51) 2101-8011.

Rubrica do Sujeito da Pesquisa (ou responsável)

Rubrica do Pesquisador

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA

24.11.105
*05383

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – SUJEITOS DA PESQUISA

Página - 4 - de 4

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

_____/_____/20_____
Assinatura do Sujeito da Pesquisa (ou responsável) Nome do Sujeito da Pesquisa (ou responsável) Data

_____/_____/20_____
Assinatura do Pesquisador Nome do Sujeito da Pesquisa Data

Na impossibilidade de autonomia para a leitura deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o mesmo foi lido para _____
(preencher com nome do sujeito da pesquisa ou do responsável) pelo pesquisador _____
(preencher com nome do pesquisador) enquanto eu estava presente como testemunha.

_____/_____/20_____
Assinatura da Testemunha Nome da Testemunha Data

HCFA / GPPG
VERSÃO APROVADA

24/11/09
855385

6.5. Recorte dos anúncios nos jornais

painel

Distrofia muscular

■ O Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Rua Ramiro Barcelos, 2.350) está pesquisando um novo método para a detecção de portadores do gene da distrofia muscular dos tipos Duchenne e Becker. Essas doenças afetam homens, mas são transmitidas por mulheres normais, já que o gene se localiza no cromossomo X. Os resultados do trabalho devem conduzir a uma maneira mais rápida e precisa de detectar as mulheres que, embora sendo normais, podem transmitir a doença para descendentes. As familiares de pacientes que quiserem participar do projeto devem entrar em contato com a pesquisadora Carolina Franco, pelo ☎ (51) 9648-1606. A participação envolve apenas a coleta de uma amostra de sangue.

SERVIÇO

DISTROFIA MUSCULAR – O Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pesquisa um novo método para a detecção de portadoras do gene da distrofia muscular dos tipos Duchenne e Becker. Estas doenças afetam homens mas são transmitidas por mulheres normais. As familiares de pacientes que quiserem participar do projeto devem entrar em contato com a pesquisadora Carolina Franco, pelo telefone (51) 9648-1606. A participação envolve apenas a coleta de uma amostra de sangue.

6.6. Carta de liberação do acesso aos registros AACD



Porto Alegre, 05 de fevereiro de 2007

Ao
Prof. Roberto Giugliani
Prof. Titular Departamento de Genética da UFRGS

Em resposta ao seu pedido para acesso ao nosso cadastro de pacientes com DNM, para participação em pesquisa com mulheres portadoras de Distrofia Muscular de Duchenne/Becker, em projeto de mestrado da aluna Carolina Franco (sob sua orientação), venho informá-lo que estamos de acordo com esta solicitação. Pedimos somente que seja citada a AACD neste estudo.

Atenciosamente,

Rosane Boger Stelzer
Dra. Rosane Boger Stelzer
Médica Fisiatra
Coordenadora Clínica da AACD/RS



Considerada de Utilidade Pública Decreto Federal nº1.325 de 30.08.62
Av. Professor Cristiano Fischer, 1510 - Jardim do Salsó
Porto Alegre - RS - CEP 91410-000

6.7. Resultados do PCR em tempo real

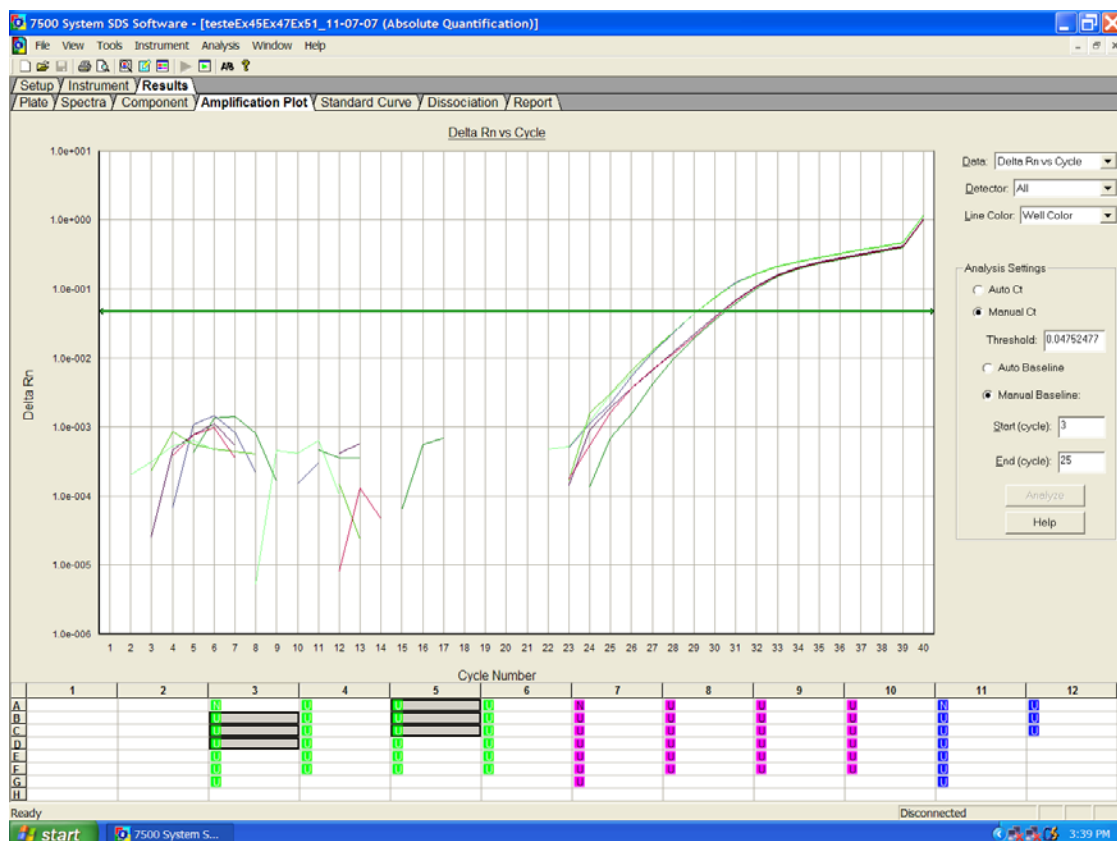


Fig 6.1 – Gráfico de amplificação das triplicatas de dois indivíduos para o exon 45, para a determinação do *status* de portadora. Curvas à esquerda demonstram uma mulher não-portadora (Cts = 29,12; 29,13; e 29,10), e curvas à direita demonstram uma mulher portadora (Cts = 30,45; 30,27; e 30,35).