

Doenças Neuromusculares: Recentes Avanços

Beatriz H. Kiyomoto*, Acary Souza Bulle Oliveira**,
Alberto Alain Gabbai***

RESUMO

Nos últimos 15 anos os conceitos de genética molecular causaram um grande impacto na clínica neurológica, com um número significativo de doenças sendo definidas a nível molecular. Recentes avanços em doenças neuromusculares tais como as distrofias musculares, miopatias metabólicas e síndromes neurogênicas, assim como algumas das técnicas moleculares, são descritas.

UNITERMOS

Doenças neuromusculares. Genética molecular

INTRODUÇÃO

No campo da Neurologia, os conceitos da genética molecular causaram um grande impacto, aumentando a compreensão dos mecanismos responsáveis pelas doenças genéticas. São exemplos práticos a distrofia muscular de Duchenne e Becker. Eram consideradas similares, mas doenças distintas. Agora sabemos que elas são alélicas, ambas por alterações do mesmo produto do gene, a proteína distrofina²⁷.

O emprego de técnicas de biologia molecular nos últimos anos permitiu a identificação dos genes responsáveis por um grande número de doenças neuromusculares. O diagnóstico, até então baseado apenas em critérios clínicos e testes bioquímicos, apresentava sérias limitações para identificação de portadores e diagnóstico pré-natal. A aplicação dessa nova tecnologia tem trazido importantes contribuições porque permite um diagnóstico correto, identificação de portadores, diagnóstico pré-natal e de pré-sintomáticos, possibilitando assim a prevenção de doenças genéticas através de aconselhamento genético mais preciso.

Neste artigo, revisamos de maneira breve as principais doenças dos músculos dando ênfase aos aspectos genéticos e às técnicas moleculares.

TIPOS DE MUTAÇÕES NAS DOENÇAS GENÉTICAS

Existe um grau de variação no DNA do genoma entre diferentes indivíduos numa população. Isto é, existe um polimorfismo, no qual diferentes versões de uma sequência de DNA podem estar presentes num mesmo locus. Muitas destas diferenças se concentram em porções não codificadoras de proteínas e não têm, aparentemente, efeito sobre o fenótipo. Algumas são deletérias, sendo responsáveis por doenças hereditárias⁴⁹. Estas podem resultar de mutações que variam desde substituição de um único nucleotídeo por um outro à completa deleção de um gene²⁵.

* Mestre em Neurologia.

** Doutor em Neurologia, chefe do Setor de doenças neuromusculares.

*** Professor Adjunto, Livre-Docente. Disciplina de Neurologia. Escola Paulista de Medicina. Universidade Federal de São Paulo.

Mutações puntiformes são alterações de um único par de bases numa sequência de DNA. Por exemplo, substituição de uma purina por outra purina (AG), uma pirimidina por outra pirimidina (CT) ou uma purina por uma pirimidina ou vice-versa (GT). Estas mutações podem ser deletérias porque podem resultar numa substituição de um aminoácido por outro numa cadeia polipeptídica, o qual pode alterar a função da proteína. Mutações também podem ser causadas por **deleções, duplicações e inserções**, que podem ser detectadas através do Southern blotting. Entretanto, estas podem ser muito pequenas ou envolver apenas alguns nucleotídeos, sendo necessárias outras técnicas para serem detectadas²⁵. Algumas destas estratégias serão descritas a seguir.

MÉTODOS DE ANÁLISE DE ÁCIDO NUCLEÍCO

De acordo com o tipo de mutação, usam-se vários recursos diagnósticos para a identificação precisa:

Endonucleases de restrição (enzimas de restrição) - São enzimas que reconhecem sequências específicas de 4 a 8 bases de DNA de duplo filamento, cortando-os em pequenos fragmentos menores apenas nestes sítios. Por exemplo, a enzima de restrição HindIII (*Haemophilus influenzae*) reconhece a sequência de 6 pares de bases:

5' A AGCT T 3'
3' T TCGA A 5'

Uma mutação em tais sítios impede a clivagem pela enzima; por outro lado, uma mutação também pode criar novos sítios de restrição clivando o DNA em locais em que normalmente não ocorreria. Para detectar a mutação, o DNA próximo ao sítio de uma possível mutação é amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR); o produto é incubado com a enzima de restrição e o DNA é analisado por eletroforese. Se houver clivagem, resultará em dois fragmentos; senão, haverá apenas um fragmento. A presença ou ausência de mutação pode ser deduzida conforme a mutação crie ou destrua o sítio de restrição da enzima²⁶ (Figura 1).

Southern blotting - Desenvolvida por E. M. Southern para análise da estrutura de um DNA após clivagem com enzimas de restrição. Fragmentos de DNA clivados são separados por eletroforese em gel de agarose, transferidos por capilaridade para membranas de nitrocelulose e hibridizados com sonda de DNA marcada⁵¹. Com este método detectamos a presença de um gene e se sua estrutura é normal ou não. Detectam-se grandes defeitos moleculares, mas não se detectam alterações de apenas alguns pares de bases ou deleções muito pequenas.

Reação em cadeia da polimerase - Mais conhecida pela sigla inglesa PCR (polymerase chain reaction)⁴⁵. Método mais rápido e que requer menor quantidade de DNA do paciente do que o Southern blotting. Permite detectar mutações puntiformes ou pequenas deleções e inserções. Com a PCR, regiões específicas do gene são isoladas do DNA do paciente e amplificadas através do uso de desencadeadores (primers) e então sua sequência pode ser analisada e visualizada como bandas distintas em gel de agarose e comparadas com o gene normal (Figura 2).

Northern blotting - Análogo ao Southern blotting, para análise de amostras de RNA. O RNA é separado por eletroforese em gel, transferido por capilaridade para membrana de nitrocelulose e submetido à hibridização com uma sonda de DNA. Permite detectar grandes alterações na estrutura do mRNA para um determinado gene⁴⁶.

Análise da sequência de DNA - A determinação da sequência de nucleotídeos de fragmentos de DNA pode ser obtida através de 2 métodos: método químico de Maxam-Gilbert (1977) e método enzimático de Sanger

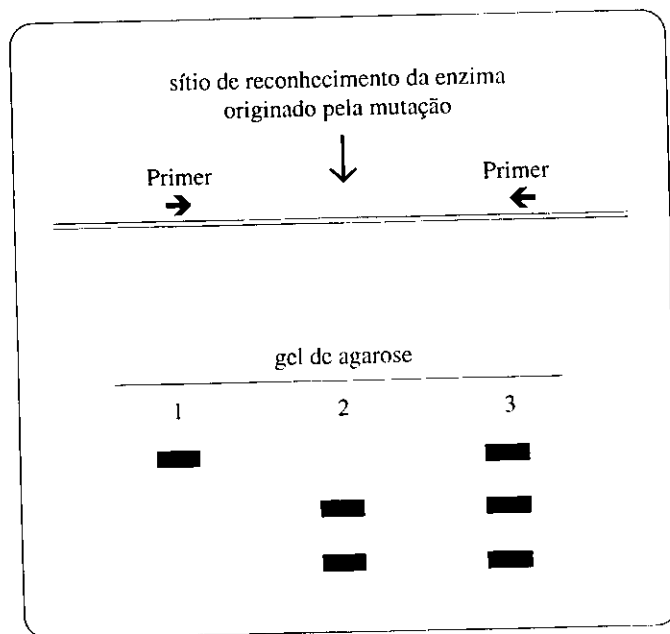


FIGURA 1

Deteção de mutação. A região em torno da mutação é amplificada por PCR e o fragmento resultante é incubado com enzimas de restrição e analisado por eletroforese em gel de agarose: Linha 1- DNA de uma pessoa sem a mutação (há apenas uma banda porque a enzima não corta o DNA). Linha 2- DNA de um homozigoto para a mutação (as duas bandas representam os dois fragmentos após a digestão enzimática). Linha 3- DNA de um heterozigoto, onde há um fragmento que não foi cortado e outros dois cortados (adaptado de Korf, 1995b)²⁶.

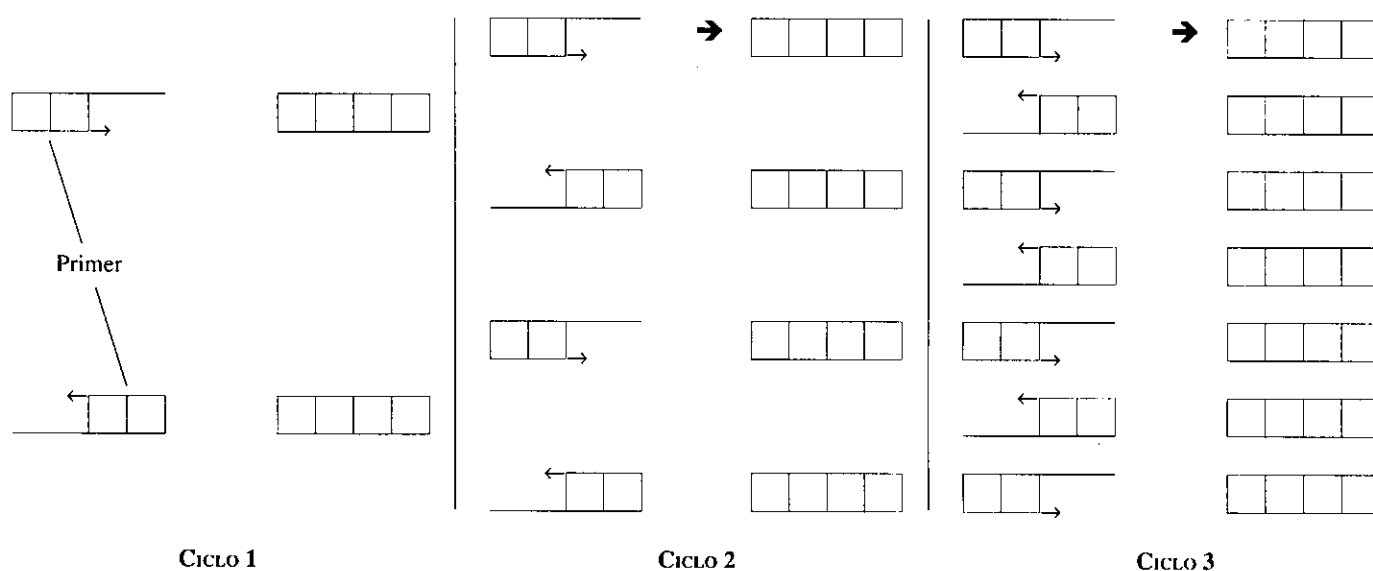


FIGURA 2

Reação em cadeia da polimerase (PCR). O segmento alvo do DNA a ser amplificado é ladeado por dois desencadeadores (primers), que são oligonucleotídeos curtos que se hibridizam com as suas cadeias complementares da sequência alvo e desencadeiam a síntese deste segmento.

Esta região é amplificada especificamente de modo exponencial por ciclos sucessivos de desnaturação pelo calor, hibridização dos desencadeadores e síntese de DNA. Conforme o esquema, os dois filamentos novos de DNA são complementares e são uma segunda cópia do segmento alvo original (adaptado de Rosenthal, 1994)⁴³.

(1977). Embora as técnicas sejam diferentes, obedecem a princípios semelhantes. Informações sobre a sequência de DNA são fundamentais para detectar mutações e determinar a sequência de aminoácidos de um gene isolado⁴².

aperfeiçoados permitem um diagnóstico mais preciso do que apenas com critérios , resolvendo questões sobre a natureza de certas doenças clinicamente semelhantes, mas não idênticas⁴⁴.

MÉTODO DE ANÁLISE DE PROTEÍNAS

Western blotting - Técnica análoga ao Southern blotting, usada para detecção de proteínas, geralmente por métodos imunológicos. Um extrato protéico é separado por eletroforese em gel de poliacrilamida, transferido para membranas de nitrocelulose e submetido à reação com anticorpos poli ou monoclonais que reconhecem especificamente a proteína a ser analisada⁵⁵. Usa-se esta técnica para obter informações sobre o tamanho e quantidade de uma determinada proteína em extratos celulares de pacientes com uma determinada doença genética. Por exemplo, pode ser usada para detectar a presença ou ausência da proteína distrofina em pacientes com distrofia muscular de Duchenne.

Com a aplicação destas técnicas, um grande número de mutações tem sido descrito em inúmeras doenças neuromusculares³⁶. Métodos de diagnóstico assim

DISTROFIAS MUSCULARES

São um grupo heterogêneo de doenças com degeneração progressiva do músculo esquelético que se devem a defeito intrínseco do tecido muscular, e não secundário ao envolvimento do sistema nervoso central ou do nervo periférico. As distrofias musculares mais comuns são a distrofia muscular de Duchenne e Becker (DMD/DMB), distrofia miotônica (DM), distrofia facio-escápulo-umeral (DFSH) e distrofia cintura-membros (DCM).

Distrofia muscular de Duchenne e Becker

A DMD e DMB são doenças de herança recessiva ligada ao cromossomo X. Mais recentemente confirmou-se que são doenças alélicas resultantes de mutação do gene

localizado no braço curto do cromossomo X (Xp21). A clonagem, a caracterização das mutações e suas consequências²⁷ e análise da estrutura e função de seu produto, a proteína distrofina²², foram uma das grandes realizações nos últimos anos no campo da pesquisa das doenças musculares. Elevaram a compreensão dos mecanismos responsáveis pela doença, e têm trazido resultados essenciais para a prevenção da doença, com detecção de portadoras e diagnóstico pré-natal. Através da análise da distrofina pode-se realizar o diagnóstico de portadoras, especialmente as manifestantes que podem ser confundidas com a distrofia cintura-membros¹⁻³⁷. O gene é caracterizado pelo seu grande tamanho; aproximadamente 2300kb, ou seja, 1,0% do cromossomo X. O gene é expresso primariamente no músculo, sendo também encontrado no miocárdio e em menor quantidade no cérebro. A maioria dos defeitos moleculares em pacientes é de deleções (mais de 60%), duplicações em 6% e, em menor número, de mutações puntiformes. A gravidade do quadro clínico não está relacionada ao tamanho da deleção do gene. Pacientes com deleções grandes têm muitas vezes um quadro benigno, enquanto deleções pequenas podem apresentar a forma mais grave de DMD. A razão para a diferença de fenótipo entre a DMD, forma mais grave, e a DMB, forma mais benigna, estaria na dependência do sítio da mutação genética. Na DMB, a deleção remove éxons com um número completo de códons, de modo que não há alteração na matriz de leitura, produzindo uma distrofina truncada, sem alguns dos aminoácidos codificados pela deleção, mas com as extremidades amino e carboxil intactas. A distrofina, mesmo defeituosa, é semifuncional. Na DMD, a matriz de leitura é interrompida e a proteína não é produzida, resultando num quadro mais grave¹⁷⁻²⁴.

Distrofia miotônica (Doença de Steinert)

É uma das doenças neuromusculares mais comuns, de herança autossômica dominante com uma prevalência estimada entre 3 a 5 casos por 100.000 e caracterizada especialmente pela presença de miotonia (dificuldade de relaxamento muscular após contração e melhora com aquecimento e exercício). Há uma expressividade clínica variável quanto à idade de início e à intensidade nas suas principais manifestações: catarata, calvície, fraqueza, hipogonadismo, retardo mental e cardiopatia. Alguns pacientes, filhos de mães afetadas, apresentam manifestações severas com grave retardamento mental, enquanto outros apresentam um início tardio com expressão leve como apenas catarata ou miotonia²⁰. É causada por um gene mutante no braço curto do cromossomo 19, região q13.3^{2,13,18}, cujo defeito molecular é caracterizado por um aumento na repetição do trinucleotídeo CTG na região 3'

não traduzida do gene que codifica uma proteína das famílias das proteoquinases¹⁰. O mapeamento e análise do gene trouxeram resposta ao porquê desta variabilidade fenotípica. Indivíduos normais apresentam 5 a 30 cópias dessa repetição CTG; indivíduos discretamente afetados e assintomáticos têm 50 a 100 e os francamente afetados até mais de 2000 cópias¹⁹⁻²⁹. Existe uma correlação, então, entre o tamanho do fragmento anormal e a severidade clínica. O aumento dessa repetição de uma geração para outra parece se correlacionar com a idade de início e com a piora do quadro clínico em gerações sucessivas, fornecendo uma explicação molecular para o fenômeno conhecido como antecipação. Southern blot e PCR podem ser usados para detectar e medir o tamanho destas repetições. Com a análise genética molecular o diagnóstico é inequívoco, mesmo nos casos discretos e sem informações sobre outros membros da família. Torna-se possível também o diagnóstico pré-natal.

Outras doenças são também caracterizadas por um aumento na repetição trinucleotídica: síndrome do X frágil (repetição na sequência CGG na região 5), amiotrofia espinhal bulbar ligada ao X ou doença de Kennedy, doença de Huntington e ataxia espino-cerebelar.

Distrofia facio-escápulo-umeral

É uma forma de distrofia muscular de herança autossômica dominante, com alta penetrância e de expressividade variável dentro e entre famílias. A fraqueza inicia-se de modo insidioso na musculatura facial acometendo principalmente o músculo orbicular da boca e dos olhos, com característica dificuldade para assobiar e sugar. Concomitantemente existe fraqueza e atrofia predominantemente dos músculos fixadores da escápula e braços ("braços de Popeye"), resultando numa aparência falsamente atlética, bastante característica destes pacientes.

Herança autossômica dominante ocorre na grande maioria dos casos. Os casos esporádicos devem ser mantidos sob suspeita, até que toda a família seja examinada cuidadosamente, pois nos estágios iniciais o quadro costuma ser muito discreto, até assintomático. Com o recente mapeamento do gene no braço longo do cromossomo 4, região 4q35⁵⁶⁻⁵⁷, espera-se que o diagnóstico molecular seja possível em um futuro próximo através da análise do DNA genômico ou através do produto do gene ainda não identificado.

Distrofia muscular tipo cintura-membros

Formam um grupo bastante heterogêneo em que diferentes desordens neuromusculares foram classificadas

como distrofia cintura-membros (DCM). No diagnóstico diferencial devem ser incluídas a atrofia espinhal tipo III (Kugelberg-Welander), DMD, DMB, distrofia facio-escápulo-umeral, portadoras manifestantes de DMD, miopatias endócrinas, inflamatórias e algumas miopatias congênitas de início tardio. Com o advento da genética molecular, evidenciou-se envolvimento de diferentes loci cromossômicos, explicando-se, portanto, a grande variabilidade clínica. Surgiram então novas classificações, baseadas no locus cromossômico¹²:

1. Distrofia muscular ligada ao cromossomo 5 (LGMD 1). Forma autossômica dominante, mapeada no braço longo do cromossomo 5, região 5q22.3-31.3⁵². Descrita numa família afetada em 7 gerações, proveniente da Virgínia (EUA)¹⁶. As principais características são: idade de início de 18 a 35 anos, fraqueza muscular predominantemente proximal e de início em membros inferiores, creatino kinase (CK) moderadamente aumentada (até 9 vezes o normal).

2. Distrofia muscular ligada ao cromossomo 15 (LGMD 2A). Forma autossômica recessiva, localizada no braço longo do cromossomo 15⁵. O início é entre 8 a 23 anos de idade e a progressão é bastante variável. A fraqueza afeta as cinturas pélvica e escapular, poupando face, podendo ou não ocorrer hipertrofia de panturrilhas. Valores de CK são bastante aumentados nos afetados, sintomáticos e pré-sintomáticos. Biopsia muscular com padrão distrófico.
3. Distrofia muscular ligada ao cromossomo 2 (LGMD 2B). Forma autossômica recessiva, mapeada no braço curto do cromossomo 2⁴. Identificada em duas famílias, uma Palestina e outra Siciliana. Idade de início na adolescência, com progressão lenta, comprometendo inicialmente a cintura pélvica e grande elevação nos valores da CK.
4. Distrofia muscular ligada ao cromossomo 13 (LGMD 2C - previamente chamado de SCARMD 1). Forma autossômica recessiva. Com a freqüente observação de

TABELA 1

Algumas das MM mais comuns e suas respectivas mutações do mtDNA.

<i>Tipo de mutação</i>	<i>Doença</i>	<i>Localização do gene*</i>		
Mutação puntiforme	LHON	nt-11778	G->A	ND4
	MERRF	nt-8344	A->G	tRNA-Lys
	MELAS	nt-3243	A->G	tRNA-Leu(UUR)
	NARP	nt-8993	T->G	ATPase 6
	MIMyCA	nt-3260	A->G	tRNA-Leu(UUR)
Deleções e duplicações	KSS			
	PEO			
	miopatia ocular			
	síndrome de Pearson's			
Depleção	miopatia infantil severa	gene nuclear desconhecido		
	hepatopatia infantil severa	gene nuclear desconhecido		
Depleções múltiplas	MINGIE	gene nuclear desconhecido		
	cardiomiopatia familiar	gene nuclear desconhecido		
	mioglobínúria recorrente	gene nuclear desconhecido		
	encefalomiopatia progressiva	gene nuclear desconhecido		
	PEO	gene nuclear desconhecido		
	miopatia	gene nuclear desconhecido		

LHON- neuropatia óptica hereditária de Leber; MERRF- epilepsia mioclônica com ragged-red fibers; MELAS- encefalomiopatia mitocondrial, acidose láctica com episódios semelhantes a acidentes vasculares cerebrais; NARP- neuropatia, ataxia, retinite pigmentosa; MIMyCA- miocardiopatia e miopatia de herança materna; KSS - síndrome de Kearns-Sayre; PEO - oftalmoplegia externa progressiva; MINGIE- encefalopatia com alterações mio-neuro e gastrointestinais; mtDNA- DNA mitocondrial; MM - miopatia mitocondrial.

* Sequência do mtDNA de acordo com Anderson et al.- Sequence and organisation of the human mitochondrial genome. Nature 1981;290:457-465.

fenótipo semelhante a DMD ocorrendo em meninas e a raridade com que se encontram cariótipos XO, X/XX, X/XX/XXX, translocação X-cromossomo autossômico, além de acometimento de meninos e meninas numa mesma irmandade, tornou-se evidente a existência de uma forma autossômica recessiva de distrofia muscular da criança. Foi comumente descrita no norte da África⁶, com características comuns com a DMD: modo de início, progressão, hipertrofia de panturrilhas, CK extremamente aumentada nas fases iniciais da doença e biopsia muscular com padrão distrófico. Em 1992, Matsumura et al.³¹ descreveram a deficiência da proteína adalina (50DAG), componente do complexo associado à distrofina, em pacientes que apresentavam esta forma de distrofia, e foi denominada de DLMD (Duchenne-like muscular dystrophy). Em várias famílias norte-africanas, encontrou-se uma ligação com o cromossomo 13³⁻⁷. Foram também descritos pacientes com doença ligada ao cromossomo 13 que apresentavam quadro clínico discreto, evidenciando-se a imprecisão do termo SCARMD (severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy- distrofia autossômica recessiva severa da criança) para designar tais casos.

5. Distrofia muscular ligada ao cromossomo 17 (LGMD 2D - previamente chamado de SCARMD 2). Forma autossômica recessiva. Em 1994 o gene da adalina foi localizado neste cromossomo (17q)⁴⁰. Existe uma grande variabilidade no quadro clínico, entre famílias e numa mesma família, com início na idade adulta ou na infância e quadros benignos de lenta evolução.

Há famílias que não apresentam mutação ligada a nenhum dos loci já definidos, sugerindo haver outros genes responsáveis pela DCM.

Finalmente, a DMD, a DMB e os heterozigotos manifestantes da DMD devem ser excluídos em todos os casos esporádicos suspeitos de DCM por testes apropriados. A identificação e diferenciação entre tais casos é de extrema importância para o aconselhamento genético e planejamento familiar principalmente em relação às irmãs dos afetados e seus pais. Isto é importante para o aconselhamento genético devido aos riscos diferentes entre herança autossômica recessiva e a herança ligada ao X.

MIOTONIAS NÃO DISTRÓFICAS

Paralisia periódica hipercalêmica e Paramiotonia congênita

A paralisia periódica hipercalêmica (PPhiperK) é caracterizada por episódios de paralisia, frequentemente associada a miotonia e com hiperpotassemia. A para-

miotonia congênita apresenta-se com uma miotonia paradoxal em que a miotonia aparece durante o exercício e piora com o exercício continuado, com predileção por face e pescoço, fraqueza após exercício prolongado e exposição ao frio, e em algumas famílias, ataques de fraqueza como na PPhiperK. Essas 2 entidades foram mapeadas no mesmo locus no cromossomo 17, sendo portanto alélicas³⁸.

MIOPATIAS CONGÊNTAS

São caracterizadas clinicamente por hipotonia neonatal, atraso no desenvolvimento motor, mas, diferentemente das distrofias, podem apresentar evolução favorável com melhora motora progressiva.

Central core

Mapeada no cromossomo 19, com fortes evidências de que seja alélica a hipertermia maligna (HM)³⁴. Deve-se evitar nestes pacientes uso de succinilcolina ou halotano, reconhecidos como desencadeadores de HM.

Miopatía nemalínica

Herança autossômica dominante. Mapeada no cromossomo 1 entre regiões 1p13 e 1q25²⁸.

Miopatía centro-nuclear

Descrita numa forma autossômica dominante, autossômica recessiva e ligada ao X; dessa maneira, o aconselhamento genético torna-se muito complicado.

A forma recessiva ligada ao X, com quadro clínico mais severo, tem o gene mapeado no cromossomo Xq28⁵³.

MIOPATIAS METABÓLICAS

É um grupo de miopatias associadas a defeitos bioquímicos. São todas de herança autossômica recessiva, com exceção da deficiência de fosfoglicerato quinase, ligada ao X.

Deficiência de miofosforilase (glicogenose tipo V)

Também conhecida como doença de McArdle. Caracterizada por intolerância ao exercício com câibras, rigidez muscular sem atividade elétrica (contratura) e, por

vezes, mioglobulinúria. A biopsia muscular mostra uma miopatia vacuolar com acúmulo de glicogênio e ausência da fosforilase muscular. O gene foi mapeado no cromossomo 11 região 11q13-qter³⁰. Algumas famílias aparentemente apresentam transmissão autossômica dominante. Na verdade tem como causa a presença de heterozigotos manifestantes, nas quais a atividade residual da fosforilase cai a um nível crítico abaixo do necessário para uma função muscular normal⁴⁸.

Deficiência de maltase ácida (Doença de Pompe)

A forma infantil cursa com hipotonia, miocardiopatia, insuficiência respiratória com óbito no primeiro ano de vida. A forma adulta pode lembrar as distrofias da forma das cinturas. O gene foi mapeado no cromossomo 17¹⁴.

MIOPATIAS MITOCONDRIAIS

Com a descoberta de deleções do DNA mitocondrial (mtDNA) em 1988²³⁻⁵⁸, iniciou-se uma nova era nas pesquisas das doenças mitocondriais. A mitocôndria contém seu próprio DNA, que é circular e codifica 2 RNAs ribossômicos, 22 RNAs transportadores e 13 polipeptídeos, que são subunidades de enzimas da fosforilação oxidativa (as outras subunidades destas enzimas são codificadas pelo DNA nuclear). As doenças mitocondriais têm um padrão de herança único, que não pode ser explicado apenas por herança mendeliana típica de genes nucleares, pois o mtDNA é transmitido apenas pela mãe, isto é, a herança é materna (a herança se dá apenas pela linhagem materna e nenhum homem afetado transmite a doença). O mtDNA replica-se dentro da mitocôndria e durante a divisão celular ele se distribui aleatoriamente para as células filhas. Quando uma célula, contendo uma mistura de mtDNA normal e mutante, se divide, suas células filhas podem conter apenas mtDNA mutante, mtDNA normal ou uma mistura dos dois. A grande heterogeneidade clínica das doenças mitocondriais pode ser explicada por dois fatores relacionados com este fenômeno: em primeiro lugar, uma certa proporção de mtDNA mutante deve estar presente para que a doença se expresse num determinado tecido, em segundo lugar, o limiar pode variar nos diferentes tecidos de acordo com sua dependência do metabolismo oxidativo¹⁵.

A análise do mtDNA por Southern blotting, e mais recentemente pela PCR, permitiu um mapeamento detalhado do cromossomo e suas várias mutações, como deleções, duplicações e mutações puntiformes. As deleções estão comumente associadas com as oftalmoplegias

externas progressivas e síndrome de Kearns-Sayre (KSS) e as mutações puntiformes com a epilepsia mioclônica com ragged-red fibers (MERRF), encefalomiopatia mitocondrial com acidose láctica e episódios semelhantes a acidentes vasculares cerebrais (MELAS) e a neuropatia óptica hereditária de Leber (LHON)³³. Algumas das MM mais comuns e suas respectivas mutações no mtDNA estão mostradas na tabela 1.

Finalmente, como muitas subunidades das enzimas mitocondriais são codificadas também pelo DNA nuclear, as MM podem ser herdadas por padrões mendelianos. Em suma, as doenças mitocondriais podem se manifestar por um padrão de herança mendeliana, quando causada por mutações do DNA nuclear. Por herança materna, ou esporadicamente com expressão fenotípica variável, quando causadas por mutações do mtDNA. O aconselhamento genético é possível em muitas condições, especialmente naqueles de herança materna.

Mutações do DNA nuclear podem ser explicadas por herança mendeliana, mas um grande número de MM tem uma origem genética não esclarecida, tornando o aconselhamento difícil e o que deve ser feito com muita cautela.

NEUROPATIAS GENÉTICAS

Doença de Charcot-Marie-Tooth

Grupo de doenças caracterizadas por fraqueza muscular lentamente progressiva que afeta os músculos distais das mãos e pés. A doença de Charcot-Marie-Tooth tipo I (CMT1) forma um grupo heterogêneo, com padrão de herança autossômica dominante, autossômica recessiva e ligada ao X. A CMT tipo IA, de herança autossômica dominante, caracteriza-se por atrofia muscular e diminuição da velocidade de condução nervosa. A biópsia de nervo apresenta uma neuropatia desmielinizante hipertrófica, caracterizada pela presença de formações em casca de cebola (onion bulb). O início é geralmente na infância ou adolescência. Como a diminuição da velocidade de condução nervosa tem penetrância completa, esta pode ser usada para o diagnóstico de pré-sintomáticos. O gene foi mapeado no braço curto do cromossomo 17 região p11-12⁵⁴ e o seu produto é a proteína mielínica periférica 22 (PMP-22)³⁹. A CMT tipo IB (CMT1B) é menos comum que a IA, e também é de herança autossômica dominante, com velocidade de condução nervosa menos acometida. O gene foi localizado no cromossomo 1, região q21-23 e o seu produto é a proteína mielínica P₀ (PMP₀)²¹. A forma ligada ao X (CMTX) também foi descrita; foi mapeado no

braço longo do cromossomo X, região q13⁹. A CMT tipo II (CMTII) é menos comum que a CMTI, é de início mais tardio com envolvimento menor dos pequenos músculos das mãos e não apresenta espessamento de nervos. A velocidade de condução é normal ou levemente diminuída. Locus no braço curto do cromossomo 1 (1p36)⁸.

DOENÇAS DO NEURÔNIO MOTOR INFERIOR

Atrofias musculares espinhais

As atrofias musculares espinhais (AME) são doenças genéticas caracterizadas por uma fraqueza muscular proximal simétrica associadas com degeneração das células do corno anterior da medula. Nos casos mais severos, dos núcleos motores bulbares¹¹. A herança é autossômica recessiva. Foram descritas formas agudas e crônicas: doença de Werdnig-Hoffmann (AME tipo I), AME intermediária (AME tipo II) e doença de Kugelberg-Welander (forma crônica ou AME tipo III). Todas as três formas parecem ser alélicas, resultantes de mutação num único locus no cromossomo 5, região 5q11.2-13.3³⁵. Assim, presume-se que a heterogeneidade clínica das três formas se deva a heterogeneidade alélica. O aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal (por análise de ligação) são importantes, pois têm um risco de recorrência de 25% e prognóstico sombrio.

Esclerose lateral amiotrófica

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma doença degenerativa dos neurônios motores inferior e cortical, causando fraqueza e atrofia muscular progressivas, com evolução fatal geralmente em 5 anos. A etiologia é desconhecida, mas aproximadamente 5 a 10% dos casos são formas familiares, sugerindo uma causa genética. A ELA familiar é herdada de maneira autossômica dominante. Siddique et al.⁵⁰, em 1991, demonstraram que em algumas famílias a doença é ligada a um defeito genético no cromossomo 21. É um achado importante, pois a identificação e clonagem do gene da ELA familiar, e caracterização do seu modo de ação, podem levar a uma melhor compreensão dos mecanismos das degenerações dos neurônios motores. Em 1993, foi demonstrada uma ligação genética entre a ELA familiar e o gene SOD1, que codifica a enzima Cu/Zn superóxido dismutase (enzima que catalisa a

dismutação do ânion tóxico superóxido para oxigênio e peróxido de hidrogênio)⁴¹.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um dos principais objetivos da genética molecular é compreender a base das mutações que causam doenças genéticas e usar estes conhecimentos para um tratamento em potencial destas doenças. Embora tenha havido importantes avanços no arsenal de procedimentos laboratoriais para detecção e diagnóstico destas doenças, muitas perguntas ainda estão para ser respondidas: como relacionar mutações no DNA com enzimas específicas e como estas levam às manifestações clínicas, especialmente nas miopatias mitocondriais? Como mutações no mesmo local, 19q23, causam manifestações clínicas divergentes, tais como na hipertermia maligna e doença do central core? De que maneira as alterações moleculares causam os sintomas de uma doença? A resposta a essas perguntas, que permitirá melhor compreender os mecanismos patológicos que causam as doenças hereditárias, constitui um primeiro passo para chegarmos a uma terapia genética efetiva no futuro⁴⁴.

SUMMARY

Neuromuscular diseases: recent developments
In the last 15 years, molecular genetics entered clinical neurology with great impact, with a significant number of diseases being defined at the molecular level. Herein we describe recent advances in neuromuscular diseases such as muscular dystrophies, metabolic myopathies and neurogenic syndromes, as well as some of these molecular techniques.

KEY WORDS

Neuromuscular diseases. Molecular genetics.

Referências bibliográficas

1. Arikawa, E.; Hoffman, E.P.; Kaido, M.; Nonaka, I.; Sugita, I.; Arahata, K. - The frequency of patients with dystrophin abnormalities in a limb-girdle patient population. *Neurology* 41: 1491-1496, 1991.
2. Aslanidis, C.; Jansen, G.; Amemiya, C. et al - Cloning of the essential myotonic dystrophy region and mapping of the putative defect. *Nature* 355:548-551, 1992.
3. Azibi, K.; Bachner, L.; Beckmann, J.S. et al - Severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy with the deficiency of the 50kDa dystrophin-associated glycoprotein maps to chromosome 13q12. *Hum. Mol. Gen.* 2:1423-1428, 1993.
4. Bashir, R.; Strachan, T.; Keers, S. et al - A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 2p. *Hum. Mol. Genet.* 3:455-457, 1994.
5. Beckmann, J.S.; Richard, I.; Hillaire, D. et al - Localization of a gene for limb-girdle muscular dystrophy to chromosome 15. *Cytogenet. Cell Genet.* 58:1991, 1991.

6. Ben Hamida, M.; Attia, N.; Chabouni, H.; Fardeau, M. - Une myopathie proximale et sévère de l'enfance récessive autosomique, fréquent en Tunisie. *Rev. Neurol. (Paris)* 139:289-297, 1983.
7. Ben Othmane, K.; Ben Hamida, M.; Pericak-Vance, M.A. et al. - Linkage of Tunisian autosomal recessive Duchenne-like muscular dystrophy to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nat. Genet.* 2:315-317, 1992.
8. Ben Othmane, K.; Middleton, L.T.; Loprest, L.J. et al. - Localization of a gene (CMT2A) for autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2 to chromosome 1p and evidence of genetic heterogeneity. *Genomics* 17:370-375, 1993.
9. Bergoffen, J.; Scherer, S.S.; Wang, S. et al. - Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 262:2039-2041, 1993.
10. Brook, J.D.; McCurrach, M.E.; Harley, H.G. et al. - Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 68:799-808, 1992.
11. Brooke, M.H. - Diseases of the motor neurons. In: A clinicians view of neuromuscular diseases. 2nd. ed., Baltimore, Williams & Wilkins, p.36-80, 1986.
12. Bushby, K.M.D. & Beckmann, J.S. - The limb-girdle muscular dystrophies - proposal for a new nomenclature. 30th and 31st ENMC International Workshops, Naarden, The Netherlands, held 6-8-January 1995. *Neuromusc. Disord.* 5: 337-343, 1995.
13. Buxton, J.; Shelbourne, P.; Davies, J. et al. - Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy. *Nature* 355: 547-548, 1992.
14. D'Ancona, G.G.; Wurm, J.; Croce, C.M. - Genetics of type II glycogenosis: assignment of the human gene for acid-glucosidase to chromosome 17. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:4526-4529, 1979.
15. DiMauro, S. & Moraes, C.T. - Mitochondrial encephalomyopathies. *Arch. Neurol.* 50:1197-1208, 1993.
16. Gilchrist, J.M.; Pericak-Vance, M.; Silverman, L. & Roses, A.D. - Clinical and genetic investigation in autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Neurology* 38:5-9, 1988.
17. Gillard, E.F.; Chamberlain, J.S.; Murphy, E.G. et al. - Molecular and phenotypic analysis of patients with deletions within the deletion-rich region of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene. *Am. J. Hum. Genet.* 45:507-520, 1989.
18. Harley, H.G.; Brook, J.D.; Rundle, S.A. et al. - Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in myotonic dystrophy. *Nature* 355:545-547, 1992.
19. Harley, H.G.; Rundle, S.A.; MacMillan, J.C. et al. - Size of the unstable CTG repeat sequence in relation to phenotype and parental transmission in myotonic dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 52:1164-1174, 1993.
20. Harper, P.S. & Dyken, P.R. - Early-onset dystrophin myotonia: evidence supporting a maternal environmental factor. *Lancet* 2:53-55, 1972.
21. Hayasaka, K.; Takada, G.; Ionasescu, V.V. - Mutation of the myelin P0 gene in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type IB. *Hum. Mol. Genet.* 2: 1369-1372, 1993.
22. Hoffman, E.P.; Brown JR, R.H.; Kunkel, L.M. - Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51:919-928, 1987.
23. Holt, I.J.; Harding, A. E.; Morgan-Hughes, J.A. - Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331:717- 719, 1988.
24. Koenig, M.; Beggs, A.H.; Moyer, M. et al. - The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am. J. Hum. Genet.* 45: 498-506, 1989.
25. Korf, B. - Molecular diagnosis. *N. Engl. J. Med.* 332: 1218-1220, 1995a.
26. Korf, B. - Molecular diagnosis. *N. Engl. J. Med.* 332:1499-1502, 1995b.
27. Kunkel, L.M. - Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 322:73-77, 1986.
28. Laing, N.G.; Majda, B.T.; Akkari, P.A. et al. - Assignment of a gene (NEM1) for autosomal dominant nemaline myopathy to chromosome 1. *Am. J. Hum. Genet.* 50:576-583, 1992.
29. Lavedan, C.; Hofmann-Radvanyi, H.; Shelbourne, P. et al. - Myotonic dystrophy: size- and sex- dependent dynamics of CTG meiotic instability, and somatic mosaicism. *Am. J. Hum. Genet.* 52:873-883, 1993.
30. Lebo, R.V.; Gorin, F.; Fletterick, R.J.; Kao, F.T.; Cheung, M.C.; Bruce, B.D.; Kan, Y.W. High-resolution chromosome sorting and DNA spot-blot analysis assign McArdle syndrome to chromosome 11. *Science* 225:57-59, 1984.
31. Matsumura, K.; Tomé, F.M.S.; Collin, H.; Azibi, K.; Chaouch, M.; Kaplan, J.C.; Fardeau, M.; Campbell, K.P. - Deficiency of the 50K dystrophin-associated glycoprotein in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *Nature* 359: 320-322, 1992.
32. Maxam, A.M. & Gilbert, W. - A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:560-564, 1977.
33. Moraes, C.T.; Schon, E.A.; DiMauro, S. - Mitochondrial diseases: toward a rational classification. In: Appel, S.H. ed. *Current Neurology*. St.Louis, Mosby Year Book, pp.83-112, vol. 11, 1991.
34. Mulley, J.C.; Kozman, H.M.; Phillips, H.A. et al. - Refined genetic localization for central core disease. *Am. J. Hum. Genet.* 52: 398-405, 1993.
35. Munsat, T.L.; Skerry, L.; Korf, B. et al. - Phenotypic heterogeneity of spinal muscular atrophy mapping to chromosome 5q11.2 - 13.3 (SMA 5q). *Neurology* 40:1831-1836, 1990.
36. Neuromuscular disorders: gene location. *Neuromusc. Disord.* 5:1-VII, 1995.
37. Oliveira, A.S.B.; Gabbai, A.A.; Schmidt, B.; Kiyomoto, B.H.; Lima, J.G.C.; Minetti, C.; Bonilla, E. - Carrier detection of Duchenne and Becker muscular dystrophy using muscle dystrophin immunohistochemistry. *Arq. Neuro-Psiquiat.* 50:478-485, 1992.
38. Ptacek, L.J.; Trimmer, J.S.; Agnew, W.S.; Roberts, J.W.; Petajan, J.H.; Leppert, M. - Paramyotonia congenita and hyperkalemic periodic paralysis map to the same sodium-channel gene locus. *Am. J. Hum. Genet.* 49:851-854, 1991.
39. Roa, B.B.; Garcia, C.A.; Suter, U. et al. - Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. Association with a spontaneous point mutation in the PMP22 gene. *N. Engl. J. Med.* 329:96-101, 1993.
40. Roberds, S.L.; Leturcq, F.; Allamand, V. et al. - Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell* 78: 625-633, 1994.
41. Rosen, D.R.; Siddique, T.; Patterson, D. et al. - Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362: 59-62, 1993.
42. Rosenthal, N. - Fine structure of a gene - DNA sequencing. *N. Engl. J. Med.* 332:589-591, 1995.
43. Rosenthal, N. - Molecular medicine. Tools of the trade-recombinant DNA. *N. Engl. J. Med.* 331:315-317, 1994.
44. Rowland, L.P. - The first decade of molecular genetics in neurology: changing clinical thought and practice. *Ann Neurol* 32:207-214, 1992.
45. Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higushi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B. et al. - Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491, 1988.
46. Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. - Northern hybridization. In: *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd. ed., New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.7.39-7.52. v.1, 1989.
47. Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. - DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:5463-5467, 1977.

48. Schmidt, B.; Servidei, S.; Gabbai, A.A.; Silva, A.C.; Souza Bulle de Oliveira, A.; DiMauro, S. - McArdles disease in two generations: Autosomal recessive transmission with manifesting heterozygote. *Neurology* 37:1558-1561, 1987.
49. Schon, E.A. - The tools of molecular genetics and their application to the study of muscle diseases. In: Engel, A.G. & Franzini-Armstrong, C., (eds). - *Myology*. 2nd.ed., New York, McGraw-Hill, Inc., p.1090-1129, 1994.
50. Siddique, T.; Figlewicz, D.; Pericak-Vance, M.A. et al. - Linkage of a gene causing familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 21 and evidence of genetic-locus heterogeneity. *N. Engl. J. Med.* 324: 1381-1384, 1991.
51. Southern, E.M. - Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-507, 1975.
52. Speer, M.C.; Yamaoka, L.H.; Gilchrist, J.H. et al. - Confirmation of genetic heterogeneity in limb-girdle muscular dystrophy: linkage of an autosomal dominant form to chromosome 5q. *Am. J. Hum. Genet.* 50: 1211-1217, 1992.
53. Thomas, N.S.T.; Sarfarazi, M.; Roberts, K.; Williams, H.; Cole, G.; Liechti-Gallati, S.; Harper, P.S. - X-linked myotubular myopathy (MTM1): evidence for linkage to Xq28 DNA markers. *Cytogenet. Cell Genet.* 46:704, 1987.
54. Timmerman, V.; Raeymaekers, P.; De Jonghe, P. et al. - Assignment of the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type I (CMT1a) gene to 17p11.2-p12. *Am. J. Hum. Genet.* 47:680-685, 1990.
55. Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. - Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:4350-4354, 1979.
56. Upadhyaya, M.; Lunt, P.; Sarfarazi, M.; Broadhead, W.; Farnham, J.; Harper, P.S. - The mapping of chromosome 4q markers in relation to facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *Am. J. Hum. Genet.* 51:404-410, 1992.
57. Wijmenga, C.; Sandkuijl, L.A.; Moerer, P. et al - Genetic linkage map of facioscapulohumeral muscular dystrophy and five polymorphic loci on chromosome 4q35-qter. *Am. J. Hum. Genet.* 51:411-415, 1992.
58. Zeviani, M.; Moraes, C.T.; DiMauro, S.; Nakase, H.; Bonilla, E.; Schon, E.A.; Rowland, L.P. - Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology* 38:1339-1346, 1988.

Endereço para correspondência:

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina - Disciplina de Neurologia Clínica.
Rua Botucatu, 740 - Vila Clementino
CEP 04023-900 - São Paulo / SP