

# Gene *DMD* e a distrofia muscular de Duchenne\*

**Caroline Christine Pincela da Costa<sup>1</sup>, Rayana Pereira Dantas de Oliveira<sup>1</sup>, Jéssica Barletto de Sousa Barros<sup>1</sup>, Kamilla de Faria Santos<sup>1</sup>, Nayane Soares de Lima<sup>2</sup>**

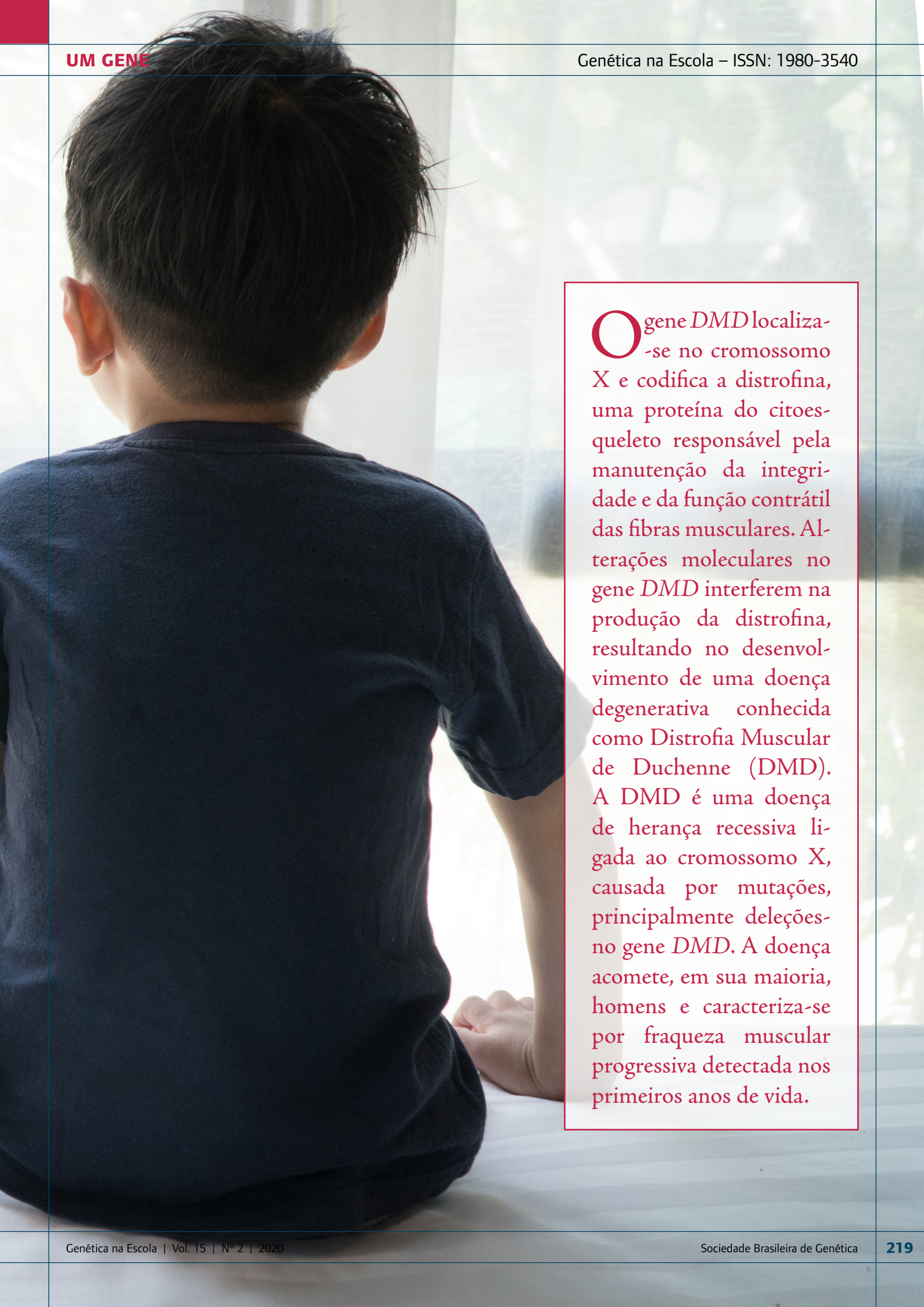
<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Assistência e Avaliação em Saúde, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO

Autor para correspondência - carolinechristine@hotmail.com

**Palavras-chave:** distrofias musculares, doença degenerativa, mutações genéticas, herança recessiva, cromossomo X, distrofina

\*Atividade proposta pela disciplina de Tópicos Especiais em Genética: Ensino de Genética, do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM).



O gene *DMD* localiza-se no cromossomo X e codifica a distrofina, uma proteína do citoesqueleto responsável pela manutenção da integridade e da função contrátil das fibras musculares. Alterações moleculares no gene *DMD* interferem na produção da distrofina, resultando no desenvolvimento de uma doença degenerativa conhecida como Distrofia Muscular de Duchenne (DMD). A DMD é uma doença de herança recessiva ligada ao cromossomo X, causada por mutações, principalmente deleções no gene *DMD*. A doença acomete, em sua maioria, homens e caracteriza-se por fraqueza muscular progressiva detectada nos primeiros anos de vida.

## O GENE *DMD* E A FUNÇÃO DA PROTEÍNA DISTROFINA

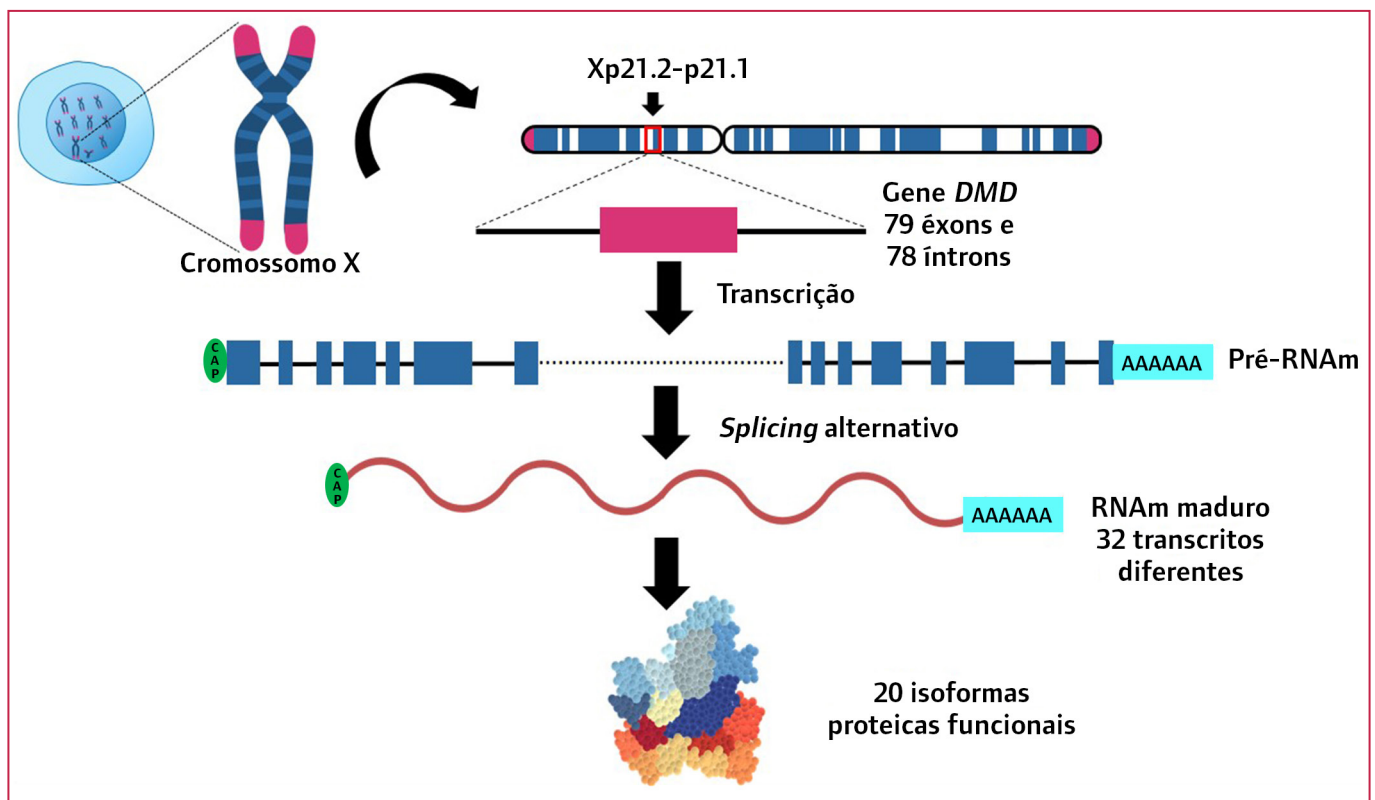
Localizado no cromossomo X, na região cromossômica Xp21.2-p21.1, o *DMD* é o maior gene descrito em humanos, com aproximadamente 2,4 milhões de pares de bases, o que corresponde a aproximadamente 0,1% do genoma humano ou 1,5% do total do cromossomo X. Esse gene é constituído por 79 **êxons** e 78 **íntrons**. O gene *DMD* sofre dois processos distintos que influenciam na produção de transcritos/proteínas diferentes. Um deles é o uso de **promotores alternativos**, que são tecido-específicos, produzindo proteínas específicas no cérebro, músculo e retina. O outro processo é pelo **splicing alternativo** do pré RNA mensageiro (pré-RNA<sub>m</sub>). Dessa forma, o gene é capaz de originar 32 tipos diferentes de transcritos, com 20 diferentes isoformas funcionais da proteína distrofina, que é o produto do gene *DMD*. Tais isoformas são constituídas por 30 a 3.685 resíduos de aminoácidos (Figura 1).

**Êxon** – segmento que permanece no RNA<sub>m</sub> maduro, após processamento do pré-RNA<sub>m</sub>.

**Splicing alternativo** – mecanismo de remoção de diferentes íntrons que dá origem a diferentes moléculas de RNA<sub>m</sub> maduro a partir do *splicing* de um mesmo pré-RNA. Deste modo, a partir de um único gene, diferentes proteínas podem ser formadas.

**Íntrons** – segmentos não codificadores do gene presentes entre os êxons, que são removidos durante o processo de *splicing* (recomposição) do RNA<sub>m</sub> recém-transcrito.

**Promotor alternativo** – Muitos genes possuem mais de um local para iniciar a transcrição, portanto, mais de um promotor. Como consequência, há uma diversidade de tamanho dos transcritos produzidos, dependendo do promotor que foi usado. O uso de promotores alternativos é um mecanismo versátil para criar diversidade e flexibilidade na regulação gênica dos eucariotos.



As diferentes isoformas da proteína localizam-se em tecidos específicos e, no músculo, têm a função de conectar o citoesqueleto da fibra esquelética à matriz proteica extracelular, a fim de estabilizar a contração muscular. O RNA<sub>m</sub> completo desse gene, ou seja, o transcrito mais longo, é constituído de 14.000 pares de bases, sendo principalmente expresso no músculo esquelético e cardíaco e, em menor quantidade, no tecido cerebral.

**Figura 1.**

Estrutura do gene *DMD* e representação dos transcritos e produtos proteicos. O gene *DMD* localiza-se no cromossomo X e apresenta 79 êxons e 78 íntrons, representados pelas caixas e linhas, respectivamente; contudo a imagem é apenas representativa, não demonstrando a quantidade total desses elementos. O *splicing* alternativo origina 32 transcritos diferentes (RNA<sub>m</sub>) cuja tradução resulta em 20 isoformas proteicas funcionais, as quais variam de tamanho entre 30 a 3695 resíduos de aminoácidos.

**Sarcolema** – é a membrana plasmática das células musculares que, no caso da fibra muscular, são sincícios.

**Sintrofina** – Componente do complexo de glicoproteínas associadas à distrofina, que se liga a outras proteínas como istrobrevina e distrofina.

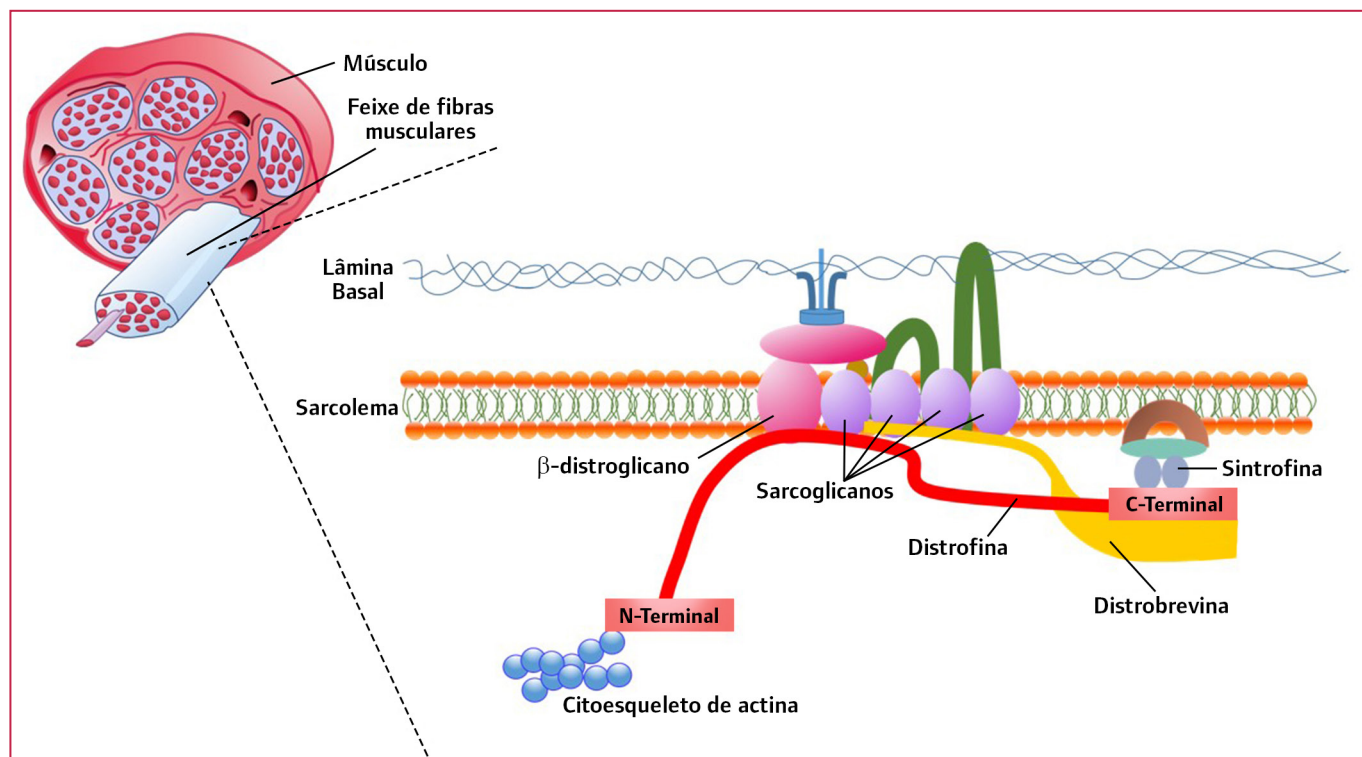
**$\beta$ -distroglicano** – proteína transmembrânica que organiza a união entre a laminina da matriz celular muscular e a distrofina que se conecta com o citoesqueleto.

Nas células musculares, a distrofina localiza-se na superfície intracelular do **sarcolema**, abrangendo todo o comprimento da miofibrila. Essa proteína é componente essencial do complexo de glicoproteínas associadas à distrofina (CPAD), um sistema constituído por diversos polipeptídeos, como **sarcoglicanos**, **distroglicanos**, **sintrofinas** e **distrobrevina**, conectado à membrana plasmática das miofibras.

A função do complexo de glicoproteínas associadas à distrofina é conectar a actina, uma proteína contrátil, à parte externa da célula, estabelecendo uma via de sinalização entre a matriz extracelular e o citoesqueleto interno de actina, permitindo assim a contração muscular. A conexão é realizada a partir da união do domínio N-terminal da distrofina aos filamentos de F-actina na porção citoplasmática da célula muscular, bem como da junção da região C-terminal às proteínas transmembranares ( **$\beta$ -distroglicano**, sarcoglicano e sintrofina) e a uma pequena proteína intracelular em formato de bastão, a distrobrevina (Figura 2).

**Sarcoglicanos** – são uma família de proteínas transmembrânicas que fazem parte do complexo de glicoproteínas associadas à distrofina. As proteínas desse complexo são responsáveis por conectar o citoesqueleto das fibras musculares à matriz extracelular.

**Distrobrevina** – Componente do complexo de glicoproteínas associadas à distrofina. Trata-se de uma pequena proteína em formato de bastão, responsável por dar suporte à distrofina.

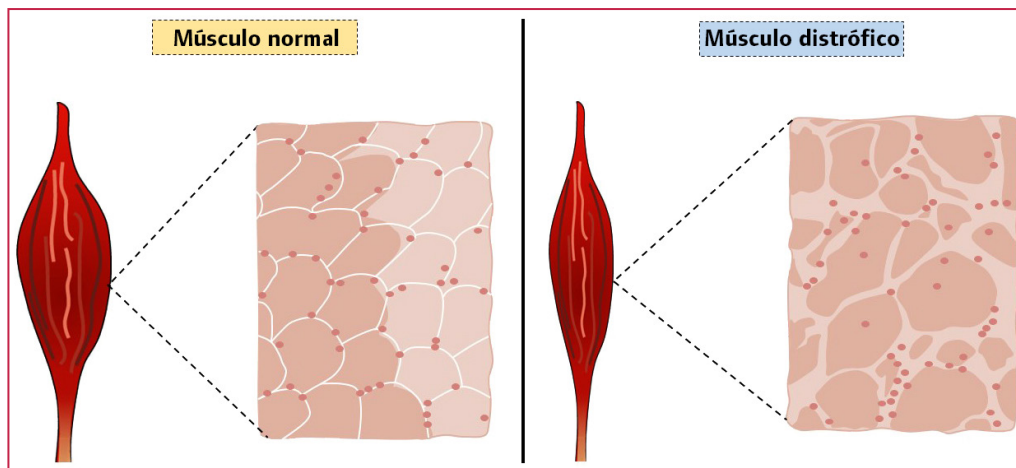


**Figura 2.**

Estrutura do Complexo de Glicoproteínas Associadas à Distrofina (CPAD). A distrofina liga-se ao citoesqueleto de actina pelo domínio N-terminal promovendo a conexão das proteínas contráteis com as proteínas transmembranares, por meio do seu domínio C-terminal, constituindo o CPAD.

Dessa forma, ao conectar o citoesqueleto subsarcolêmico ao sarcolema, a distrofina estabiliza as fibras musculares, atuando na manutenção da integridade e da função contrátil das fibras musculares. A perda de distrofina ocasiona a ruptura do CPAD, tendo como consequência a instabilidade da membrana, o aumento da suscetibilidade ao estresse mecâ-

nico e, por fim, a degeneração das miofibras. Existe um grupo de doenças degenerativas, as distrofias musculares, caracterizadas por fraqueza e atrofia muscular, que compartilham um padrão distrófico que compreende variação no tamanho das fibras musculares, sua degeneração, bem como a substituição do tecido muscular por conjuntivo (Figura 3).

**Figura 3.**

Representação ilustrativa de um corte transversal de músculo esquelético. No músculo normal, todas as fibras musculares apresentam um diâmetro uniforme e estão organizadas de forma simétrica e próximas entre si. No músculo distrófico, as fibras musculares assumem aspecto irregular, devido à degeneração, ocorrendo também a substituição do tecido muscular por tecido conjuntivo.

## A DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE (DMD)

A **DMD** foi descrita, pela primeira vez, em 1861 pelo neurologista francês Guillaume Benjamin Amand Duchenne. Em 1981, um grupo de pesquisadores, incluindo a geneticista brasileira Mayana Zatz, localizaram o gene da DMD no braço curto do cromossomo X. Entretanto, apenas em 1987, após clonagem do gene da DMD, revelou-se que o produto gênico era a distrofina, uma proteína com função de promover a estabilidade da fibra muscular durante o processo de contração.

Caracterizada por uma fraqueza muscular progressiva, a DMD acomete uma em cada 3000 crianças do sexo masculino. A maioria dos meninos com DMD apresentam os primeiros sintomas entre os três e cinco anos de idade, geralmente dificuldade para correr e **levantar-se do chão**, quedas frequentes e andar na ponta dos pés.

Uma criança com DMD nasce visivelmente saudável. Os primeiros sintomas da doença, como , quedas frequentes, dificuldade em correr e subir escadas, por exemplo, são perceptíveis nos primeiros três anos de vida. Muitos pacientes apresentam atraso motor desde os primeiros meses de vida e demoram a adquirir a marcha (por volta de 18 meses). O uso de cadeira de rodas normalmente é necessário a partir da idade de oito a 14 anos, devido ao enfraquecimento muscular progressivo. A fraqueza da musculatura torácica e paravertebral é responsável por

complicações como a escoliose. Além disso, o paciente também é acometido por contraturas e encurtamento dos tendões, resultantes da fibrose destas estruturas.

As manifestações cardíacas e respiratórias são comuns após os dez anos de idade. Taquicardia e alterações na condução elétrica são as primeiras evidências de comprometimento cardíaco e acometem quase todos os pacientes antes dos dezoito anos de idade, sendo frequentemente detectadas antes dos seis anos de idade.

A insuficiência respiratória causada por fraqueza dos músculos envolvidos no processo também é universal e progressiva, acometendo todos os pacientes especialmente após a perda da marcha. Portanto, os problemas cardiorrespiratórios colocam o paciente em risco de vida e embora tenham assistência médica adequada, muitos dos pacientes com DMD morrem de insuficiência cardíaca ou respiratória na faixa etária dos 20 aos 30 anos. No entanto, melhorias no manejo clínico e fisioterápico têm propiciado que alguns pacientes cheguem até a quarta década de vida.

A DMD é uma doença de herança ligada ao cromossomo X, **recessiva**. A patogênese da doença decorre de mutações no gene *DMD*, descrito acima. As mutações nesse gene resultam na deficiência ou ausência de seu produto proteico, resultando em degeneração progressiva das fibras musculares. A ausência da proteína distrofina também prejudica o funcionamento cerebral, provocando alterações neurológicas que podem incluir deficiência intelectual.

**DMD** – Distrofia Muscular de Duchene, doença degenerativa, de herança recessiva, ligada ao cromossomo X.

**Sinal de Gowers** – é um sinal clínico que indica fraqueza muscular principalmente dos membros inferiores. Crianças com miopatias fazem esse movimento característico, também chamado de manobra de Gowers, para levantar-se do chão usando as mãos como apoio.

**Herança recessiva** – mecanismo de herança no qual as características somente se manifestam quando o alelo recessivo está presente nos dois pares de cromossomos homólogos.

**Fenótipo** – conjunto das características de um indivíduo, resultado da interação do **genótipo** com o meio ambiente.

**Genótipo** – constituição genética de um indivíduo, ou seja, conjunto de alelos recebidos do pai e da mãe.

**Pseudo hipertrofia muscular** – substituição do tecido muscular por tecido adiposo e conjuntivo, ocasionando perda da função e falsa hipertrofia.

**Gene letal** – gene que, quando mutado, impede a sua transmissão para a geração seguinte.

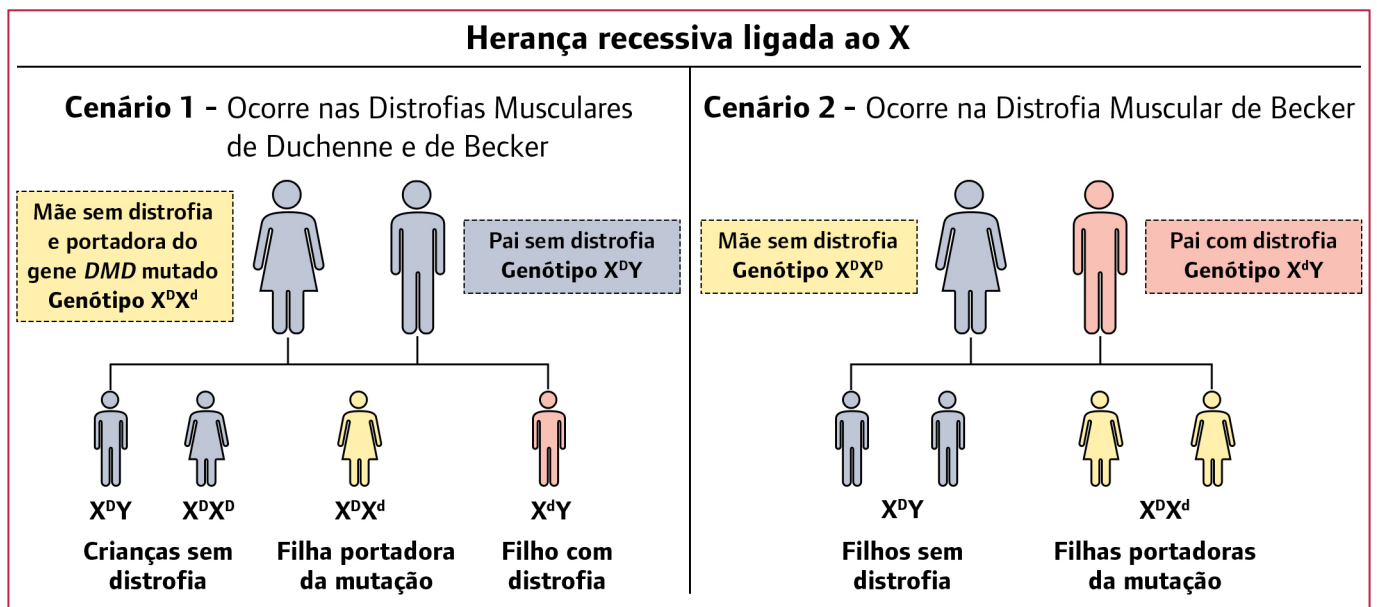
A ocorrência de DMD em mulheres é rara, visto que possuem dois cromossomos sexuais X. Caso um dos cromossomos X tenha o alelo mutado, que confere a doença, o outro cromossomo X, contendo o alelo normal, será capaz de compensá-lo na síntese de distrofina. Dessa forma, a mulher é uma portadora da mutação, capaz de transmitir o gene mutado aos descendentes. A maioria das mulheres portadoras da DMD é assintomática. Quando apresentam sintomas, o **fenótipo** é sutil, como leve fraqueza muscular e panturrilhas **pseudo hipertrofiadas**, podendo desenvolver também cardiomiopatia, um sintoma clínico clássico de mulheres portadoras de DMD.

A manifestação clínica é consequência do padrão de inativação do cromossomo X (Figura 4), pois depende da porcentagem de células que mantêm ativo o cromossomo X que contém o gene *DMD* mutado. O risco de recorrência da doença na prole de uma mulher portadora é elevado, visto que metade dos seus filhos do sexo masculino terão a doença, e metade das filhas poderão ser igualmente portadoras do alelo mutado que confere a doença, o que enfatiza a im-

portância do aconselhamento genético para tais famílias.

A DMD possui uma variante clínica menos agressiva, chamada de Distrofia Muscular de Becker (DMB). Com uma incidência de um em 1/30000 crianças do sexo masculino, na DMB a distrofina é parcialmente funcional, o que é capaz de afetar o paciente sem debilitá-lo tanto como ocorre na DMD. O início da doença costuma ser mais tardio, com sintomas que se iniciam entre cinco e quinze anos de idade. Entretanto, a sintomatologia e a progressão da doença variam entre os pacientes.

Na DMB, a perda da marcha ocorre, geralmente, após os 16 anos e grande parte dos pacientes também desenvolvem cardiomiopatias, limitando a qualidade de vida dos mesmos. Contudo, a sobrevida é relativamente ampla e permite, inclusive, a reprodução, o que é raro no caso de homens afetados pela DMD. Por ser uma das formas mais graves das distrofias, o gene da DMD era considerado um **gene letal** em homens, porque os afetados não se reproduziam. No entanto, com o melhor manejo clínico dos casos, há relatos de afetados por DMD que se reproduziram



**Figura 4.**

Esquema representativo do padrão de herança recessiva ligada ao X para as Distrofias Musculares de Duchenne e Becker. No primeiro cenário, em ambas as distrofias, uma mãe portadora do gene mutado e um pai sem distrofia possuem 50% de chance de terem crianças sem a doença, 25% de chance de terem uma filha portadora da mutação, que geralmente é assintomática, e 25% de chance de terem um filho com distrofia. Homens com DMD raramente conseguem se reproduzir dada a gravidade da doença. No segundo cenário, mais viável no caso da DMB, uma mãe sem distrofia e um pai com distrofia possuem 50% de chances de terem filhos sem a doença e 50% de chances filhas com a mutação. Homens com a DMB podem reproduzir-se, pois a variante alélica para a doença confere um fenótipo menos agressivo da distrofia.

## MUTAÇÕES NO GENE *DMD* E SUAS CONSEQUÊNCIAS

Tendo em vista o enorme tamanho do gene, é elevada a frequência de mutações de vários tipos, incluindo deleções e duplicações. O defeito molecular mais comum encontrado no gene *DMD* é a deleção de um ou mais éxons, ocorrendo em 65% dos casos de distrofia muscular de Duchenne (DMD), uma das formas mais comuns e mais graves entre as distrofias musculares.

As mutações do tipo duplicações são responsáveis por 6% a 10% das ocorrências, sendo os demais casos (aproximadamente 25%) oriundos de pequenas mutações (dos tipos **missense**, **nonsense** e alterações nos **sítios de splicing**) e outros pequenos rearranjos (inserções/deleções de poucos pares de bases e pequenas inversões).

As alterações ocorridas no gene *DMD* podem interferir na produção proteica de várias maneiras. Pequenas deleções ou inserções podem gerar erros ou deslocar o **quadro de leitura aberta (ORF)**, assim como mutações pontuais podem originar um **códon** de parada (mutação do tipo **nonsense**), gerando distrofina truncada. Por fim, substituições e pequenas deleções e/ou inserções também podem alterar um sítio de **splicing**, ocasionando a síntese de proteínas parcialmente funcionais ou que não conseguem desempenhar sua função.

O tipo de mutação ocorrida no gene implicará na alteração ou não do quadro de leitura do RNAm, o que influencia as características clínicas da distrofia muscular. Na Distrofia Muscular de Becker, geralmente as mutações presentes no gene não deslocam o quadro de leitura, permitindo a tradução do RNAm em distrofina que, embora mais curta ou mais longa ou com alguns aminoácidos trocados, ainda apresenta os domínios N-terminal e C-terminal íntegros, estabelecendo a conexão do citoesqueleto de actina à matriz extracelular. Devido a isso, os sintomas característicos da doença são mais brandos que os detectados em indivíduos com DMD.

Em contrapartida, alterações no gene *DMD* que deslocam o quadro de leitura (por exemplo, deleções ou inserções de nucleotídeos em número não múltiplo de 3), ou acarretam a parada prematura da tradução proteica, resultam em distrofina não funcional. Como consequência da ausência de certos domínios proteicos da distrofina, tem-se a ruptura do CPAD, conduzindo à perda da **homeostasia** do íon cálcio intracelular, essencial para os mecanismos de contração.

Durante o processo normal de contração do músculo esquelético, o **retículo sarcoplasmático** libera uma grande quantidade de íons cálcio para as miofibrilas situadas no interior da fibra muscular. Os íons de cálcio, por sua vez, promovem a atração entre os filamentos de actina e miosina, permitindo que os filamentos deslizem uns sobre os outros, constituindo assim o processo contrátil.

**Nonsense** – tipo de mutação genética na qual a substituição de um único par de bases (nucleotídeos), em um segmento gênico codificador de proteína, leva à troca de um códon que acarreta incorporação de um aminoácido por um códon determinador da parada da tradução do polipeptídeo. O resultado é o término prematuro da tradução de uma proteína, que fica mais curta. A proteína alterada pode ser parcial ou completamente inativada, resultando em uma alteração ou perda da função da proteína.

**Códons** – são sequências de três bases nitrogenadas contíguas do RNAm que codificam um determinado aminoácido ou que indicam o ponto de início ou fim de tradução da cadeia de RNAm.

**Retículo sarcoplasmático** – retículo endoplasmático das células musculares.

**Missense** – tipo de mutação genética na qual uma substituição de um único par de bases (nucleotídeos), em um segmento gênico codificador de proteína, ocasiona, durante o processo de tradução, a incorporação de um aminoácido diferente do usual nessa posição.

**Sítio de splicing** – Limite entre um éxon e um íntron, ou seja, local de excisão do íntron no processo de recomposição (**splicing**). Alteração nessa região pode alterar o **splicing** do pré-RNAm resultando na perda de éxons ou na inclusão de íntrons e, conseqüentemente, em uma sequência, alterada, codificadora de proteínas.

**Quadro de leitura aberta (ORF – Open Reading Frame)** – é uma sequência de DNA que se inicia com um códon de início da tradução e termina um códon de parada da tradução, contendo vários códons consecutivos, ou seja, é um segmento de DNA que, se for transcrito e traduzido, tem potencial para gerar um polipeptídeo.

**Homeostasia** – processo autorregulatório que os organismos desempenham para manter o estado de equilíbrio.

**Proteases** – classe de enzimas, denominadas ligações peptídicas, que clivam ligações entre os aminoácidos que constituem uma proteína.

**Células satélites musculares** – são células progenitoras mononucleares encontradas em músculos maduros entre a lâmina basal e o sarcolema; são capazes de se diferenciar e se fundir para aumentar o número de fibras musculares existentes e formar novas fibras.

Alterações estruturais ou a ausência da distrofina propiciam a entrada excessiva de cálcio na membrana celular muscular. O excesso da passagem de cálcio para o interior da célula leva a um processo de necrose da fibra muscular por ativação de **proteases** e à consequente perda da propriedade contrátil, o que implica em fraqueza muscular progressiva. Tal processo favorece a ocorrência de lesões das fibras musculares durante a contração, levando a danos musculares crônicos, perda da função muscular pela presença de **citocinas inflamatórias** e substituição das fibras musculares por tecido adiposo e fibroso (Figura 5).

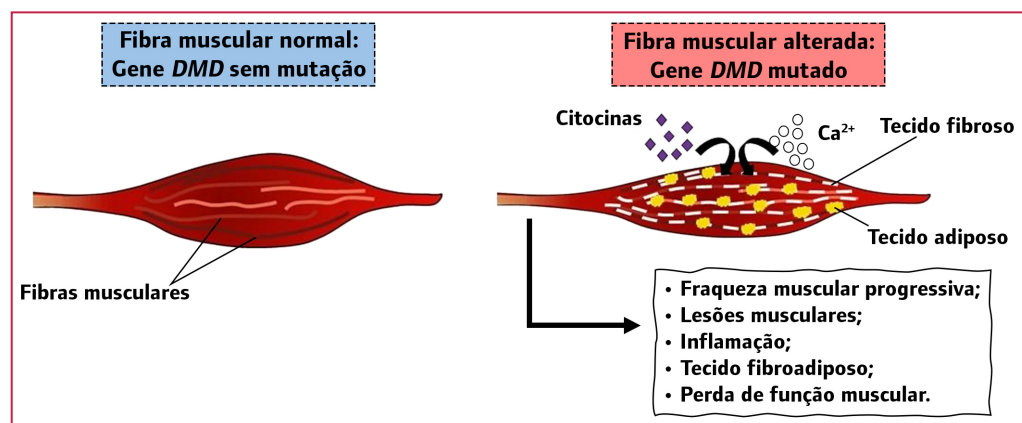
Embora o músculo esquelético apresente alta capacidade de regeneração em resposta a lesões, o potencial regenerativo das miofibrilas é comprometido na DMD, o que pode ocorrer devido à exaustão das **células satélites musculares** como resultado de lesão crônica ou por maturação incompleta das fibras musculares, contribuindo para a disfunção. Diante desse quadro, o processo necrótico das fibras musculares aumenta os níveis plasmáticos da enzima creatina quinase (CK). A avaliação dos níveis dessa enzima é um dos métodos diagnósticos laboratoriais da DMD.

#### Citocinas inflamatórias

– São um tipo de moléculas sinalizadoras produzidas por alguns tipos de células do sistema imunológico e causam inflamação.

#### Figura 5.

Representação esquemática de alterações da fibra muscular decorrente de mutações no gene *DMD*. A desestabilização da membrana plasmática muscular em decorrência da ausência de distrofina, favorece o influxo de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ocasionando fraqueza muscular progressiva, inflamação, lesões musculares, acúmulo de tecido fibroadiposo e perda da função muscular.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A DMD é uma doença de causa genética decorrente de mutações no gene *DMD*, que codifica a proteína distrofina. Embora ainda não haja cura, pesquisas clínicas internacionais têm mostrado resultados promissores para a terapia das doenças neuromusculares em geral, sendo a DMD a forma mais estudada em busca de um tratamento. Diversas abordagens têm sido avaliadas por diferentes grupos de pesquisa, e espera-se que, num futuro próximo, tenhamos acesso a terapias mais eficientes. A conduta atual é voltada para melhoria da qualidade de vida dos pacientes, com cuidados cardiorrespiratórios e fisioterapêuticos. Diante disso, ressalta-se a importância do aconselhamento genético às famílias, realizado por um geneticista/aconselhador genético, tendo em vista o alto risco

de recorrência da doença na família, especialmente na prole das mulheres portadoras da mutação.

## PARA SABER MAIS

- AARTSMA-RUS, A.; GINJAAR, I. B.; BUSHBY, K. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Medical Genetics*, v. 53, n. 3, p. 145-151, 2016.
- ANNEXSTAD, E. J.; LUND-PETERSEN, I.; RASMUSSEN, M. Duchenne muscular dystrophy. *Tidsskr Nor Laegeforen*, v. 134, n. 14, p. 1361-1364, 2014.
- FALZARANO, M. S.; SCOTTON, C.; PASSARELLI, C.; FERLINI, A. Duchenne muscular dystrophy: from diagnosis to therapy. *Molecules*, v. 20, n. 10, p. 18168-18184, 2015.
- YIU, M. E.; KORNBERG, A. J. Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Paediatrics and Child Health*, v. 51, n. 8, p. 759-764, 2015.