Leonardo Galleni Leão da Silva

**Caracterização molecular de pacientes brasileiros com Miopatia de
Central Core, através de ferramentas de Sequenciamento de Nova
Geração**

*Molecular characterization of brazilian patients with Central Core
Disease using Next Generation Sequencing tools*

São Paulo

2020

Leonardo Galleni Leão da Silva

Caracterização molecular de pacientes brasileiros com Miopatia de Central Core, através de ferramentas de Sequenciamento de Nova Geração

Molecular characterization of brazilian patients with Central Core Disease using Next Generation Sequencing tools.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Genética, na área de Genética Humana.

Orientadora: Prof^a Dra. Mariz Vainzof

São Paulo

2020

Ficha Catalográfica

Galleni Leão da Silva, Leonardo
Caracterização molecular de
pacientes com Miopatia de Central Core,
através de ferramentas de sequenciamento
de nova geração
Número de páginas: 66

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Genética e Biologia
Evolutiva.

1. Miopatia de Central Core
2. Sequenciamento de Nova Geração
I. Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Genética e
Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a). Mariz Vainzof
Orientador(a)

Epígrafe

"Onde escorre lágrimas, existe vida, coração, me faz sentir sua batida
Viver não é tarde.
Covarde eu não vou ser é hora de mudar, de me cuidar
Melhor, me vencer e me violar. Pior não é morrer, é não viver e ter que respirar
Já que viver é transpirar, foda é viver sem ter nada para inspirar
Tá no mundo é se virar, sai do raso e vai pro fundo
Cuidado para não afundar, já que é preciso se aprofundar
Mesmo se tudo inundar, seu teto cair
Você tem que tá ali, sua casa para erguer
Seus irmãos para salvar, só depende de você
E de você, você não pode esquecer
Como esquece sempre, ao pensar que não merece
Não faz por merecer e desse jeito você não cresce
Morte interna, somada a mortes externas
Fraqueza nas pernas, dores eternas, a alma enferma
E a consciência quer que você se interna
Tá nem aí se você já sabe o que você tá fazendo aqui
Então decide.
Não há coincidência onde nada coincide
Vai buscar na sua essência e ver se nela você reside
Se agride, descobre, a verdade não se encobre
É do pobre todo ouro, e na sua mão só vejo cobre
Se cobre mais, viva mais, ore
Eleve a mente até seu coração, chore
Lave seu rosto, se eleve em coro
Perdão: seu ouro prometido
A cura pro seu couro ferido
Em conflito com seu espírito ungido
Loucura, murmura, é o grito da autocondenação
Bendito seja o Senhor que deseja que você seja o seu senhor
Então, almeja tudo de bom, tudo de ruim
Veja. Ao perceber, mude.
Radical e rude consigo mesmo
Sem pressa e sem essa de "não consigo mesmo"
A esmo, seria tudo, queria tudo, conseguiria.
Seria mudo, e de nada valeria
Então, sorria um pouco por você
Pelo outro, lute.
É parte de você.
Se escute"

Síntese - **Se escute**

2012, Leonardo Irian e Gestério Neto.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a professora Dra. Mariz Vainzof pela orientação nestes anos como aluno na Universidade de São Paulo, pela sua confiança, dedicação, compreensão e paciência. Este trabalho é reflexo do seu trabalho como orientadora, eu tenho enorme admiração por você e serei eternamente grato por tudo que aprendi no Genoma, levarei estes ensinamentos para a vida.

Agradeço do fundo do meu coração a todos aqueles que passaram pelo Labprot Antonio, Andre, Camila, Felipe, Leticia Nogueira, Leticia Yumi, Newton, Paula, Poliana, Renata, Ster e Sirlene, com certeza vocês têm papel fundamental não só na minha formação acadêmica como no crescimento pessoal. Gostaria de agradecer em especial a Camila, Leticia Nogueira e Ster, que me acompanharam desde o início da minha jornada, sempre me servindo de suporte, me dando conselhos, diversos puxões de orelha, rindo e fazendo piadas das minhas incontáveis pérolas, é como se eu tivesse três mães fora de casa, eu tenho respeito e enorme admiração por vocês e pelo trabalho de vocês e sempre as levarei como exemplo de dedicação integridade. Também gostaria de agradecer ao Antônio, que por muito tempo foi o único homem que eu podia conversar no meio de tantas mulheres, eu admiro muito seu trabalho e a forma como você segue provando que é extremamente capaz, tenho certeza que será um ótimo pai. Lucas e Yumi, meus parceiros de role, eu aprendi tanto com vocês, sobre respeito e diversidade, vocês não têm noção do enorme papel que tem na desconstrução do meu antigo eu, obrigado pelas risadas e histórias que sempre vou me recordar com muito carinho.

Agradeço a todos os trabalhadores do Centro de estudos do Genoma Humano que tem desempenham um trabalho tão bonito e necessário, com

tanta dedicação. Eu tenho orgulho de poder ter sido parte da história desse lugar que é referência nacional por um tempo.

Agradeço aos meus amigos/irmãos da vida Dioche, Thalisson e Raul, grande parte do que eu penso/sou hoje é devido a vocês, obrigado pelas inúmeras histórias, viagens, roles de skate e por serem minha válvula de escape da realidade, é de grande importância para mim saber que sempre posso contar com a compreensão e a companhia de vocês

Agradeço a minha família Andrea, Analu, Beatriz, Victória, minha mãe Conceição e meu pai José Carlos. Eu não seria nada do que sou hoje sem os ensinamentos e dedicação de vocês como família, vocês são minha base para tudo e eu não poderia escolher família melhor no mundo. Em especial meus pais, que sempre me encorajaram a estudar, a buscar uma vida melhor e me deram todo o suporte necessário para isso, vocês são meu exemplo, meu porto, meu tudo e eu não poderia desejar pais melhores porque eu já tenho isso. Obrigado por tudo, eu amo vocês.

Agradeço a Letícia Martins, minha namorada e futura esposa, aquela que sempre está aqui, sempre de prontidão não importa o momento e a circunstância. Meu amor, eu não tenho palavras para demonstrar a gratidão por ter você presente na minha vida, obrigado pelo suporte, inclusive neste trabalho. Eu tenho enorme admiração pela mulher que você é, e sou extremamente sortudo por ter me escolhido para dividir a jornada da vida com você. Eu te amo muito.

Meus sinceros agradecimentos as famílias dos pacientes presentes neste trabalho, sem vocês, este projeto não seria viável. Espero, que esse projeto seja mais um tijolo na ponte da ciência que visa compreender doenças para levar a uma melhor expectativa e qualidade de vida a estas pessoas.

Agradeço a todos os centros que colaboraram com este trabalho e em especial as doutoras Julia Filardi, Juliana Gurgel e Helga da Silva este trabalho não seria possível sem a colaboração de vocês. Tenho enorme admiração pelo trabalho científico de vocês.

Por fim, agradeço as agencias financiadoras CAPES, CNPQ e FAPESP-CEPID pelo apoio financeiro que foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Lista de Figuras

Figura 1: Organização da musculatura esquelética em diferentes níveis estruturais.

Figura 2: Organização estrutural e componentes do sarcômero.

Figura 3: Acoplamento de excitação e contração.

Figura 4: NADH corte transversal do reto femoral.

Figura 5: Reações histológicas de NADH-TR, aumento 40x. Pacientes P1, P3, P4, P5, P11, P12, P13 e P18

Figura 6: Reações histológicas do paciente P8, a esquerda NADH-TR e a direita Hematoxilina-Eosina, aumento 40x.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Dados das variantes filtradas pela análise do NGS.

Tabela 2: Padrão dos Cores na biópsia muscular dos pacientes avaliados.

Índice

I. Introdução	01
1. Músculo Estriado Esquelético / Miogênese	01
1.1. Organização	02
1.2. Acoplamento de Excitação-contração	04
2. Doenças Neuromusculares	07
2.1. Miopatias Congênitas	08
2.2. Características Clínicas	09
2.3. Miopatia NemaIínica	10
2.4. Miopatia Centronuclear	12
2.5. Miopatias com Cores	14
3. Miopatia de Central Core	16
4. Ryanodine Receptor 1 (RYR1)	17
5. Sequenciamento de Nova Geração (NGS)	19
II. Objetivos	23
1. Objetivos Específicos	23
III. Materiais e Métodos	24
1. Metodologia de Seleção de Pacientes	24
1.1. Critérios de Inclusão	24
2. Sequenciamento de DNA	25
3. Metodologia de Análise do Painel	25
3.1. Filtragem e Seleção de Variantes	26
4. Histologia	29
4.1. NADH	30
4.2. ATPase	30
IV. Resultados	32
1. Análise Molecular	32
2. Análise Histológica	35
V. Discussão	40
VI. Conclusões	56
VII. Referências	59

I. Introdução

1. Músculo Estriado Esquelético/ Miogênese

O desenvolvimento da musculatura esquelética estriada se dá no período embrionário, derivada dos somitos, precisamente dos miótomos, ou de diferenciações de células mesenquimais. As primeiras células miogênicas podem ser encontradas na parte anterior da linha primitiva e nas células mesodérmicas formadas na gastrulação. Estas células compõem a mesoderme paraxial que se desenvolve em somitos, dermomiótomos e, finalmente, em miótomos. As células que compõem o miótomo estão comprometidas com a miogênese, e são chamadas de mioblastos. Os mioblastos passam por intensa atividade proliferativa. Posteriormente, entram em processo de diferenciação, quando se fundem uns aos outros, formando os miotubos (células musculares sinciciais adultas e multinucleadas). Nesta fase, começam a expressar proteínas específicas das fibras musculares. Os núcleos dos miotubos recém formados se encontram em posição central, com o decorrer da síntese de miofibrilas, são gradualmente movidos em direção ao sarcolema da célula, em posição subsarcolemal (Tajbakhsh, 2009; Bentzinger *et al.*, 2012; Conboy and Rando, 2012).

1.1. Organização do Músculo

O tecido muscular esquelético representa cerca de 40% da massa corpórea humana e é responsável por praticamente todos os movimentos controlados voluntariamente. É composto por feixes de fibras multinucleadas originadas a partir da fusão de células mononucleadas, os mioblastos, formando um sincício. O músculo esquelético é envolto por um arcabouço de tecido conjuntivo que envolve cada fibra individualmente (endomísio), feixe de fibras (perimísio) e também o músculo inteiro (epimísio), formando uma macro-unidade contrátil (Fig. 1). Cerca de 80% do sarcoplasma das fibras musculares é preenchido por miofibrilas, organizadas em unidades denominadas sarcômeros (Stanfield, 2017) (Fig. 1).

Figura 2: Organização da musculatura esquelética em diferentes níveis estruturais (Stanfield 2017).

O sarcômero é a unidade contrátil do músculo, a contração e relaxamento do conjunto destas unidades leva ao movimento. Cada sarcômero é delimitado por duas bandas Z sucessivas e contém uma banda A separando duas semibandas I. No centro de cada banda A, existe ainda uma região chamada de banda H (Fig. 2). Ainda, no sarcômero, existem dois tipos de filamentos: os filamentos finos de actina, que partem da linha Z até a borda externa da linha H, e os filamentos grossos de miosina, que ocupam a parte central do sarcômero. Para que haja a contração do sarcômero, é necessária a interação entre os filamentos de actina e miosina. Este processo depende da disponibilidade de Adenosina Trifosfato (ATP) e da presença de íons Ca^{2+} , que atuam nas proteínas assessoras: troponina e tropomiosina (Fig. 2) (Sweeney and Hammers, 2018).

Figura 3: Organização estrutural e componentes do sarcômero. Acesso em: 03/08/18 Disponível em: <http://fisioexefi2013.blogspot.com>

1.2. Acoplamento de Excitação-contração

O cálcio Ca^{2+} desempenha papel essencial em diversas atividades desenvolvidas pela célula muscular, tais como: atua na fosforilação oxidativa, no auxílio à manutenção da integridade do sarcolema e, principalmente, na ativação das proteínas contráteis (Berchtold *et al.*, 2000). Estes íons ficam retidos no retículo sarcoplasmático, uma especialização do retículo endoplasmático nas células musculares, que envolve grupos de miofibrilas, separando-as em feixes cilíndricos (Fig. 2). O processo de contração muscular baseia-se na teoria do deslizamento dos filamentos do sarcômero, interação que depende de uma cascata de eventos como:

1. Repouso: neste momento a interação entre os filamentos de actina e miosina não acontece, pois o complexo ATP-ponte cruzada (responsável pela interação entre as moléculas de actina e miosina na presença de ATP) está inativo. O Ca^{2+} se encontra armazenado nas vesículas do retículo sarcoplasmático e tem papel essencial para que ocorra a mudança na conformação das moléculas de troponina/tropomiosina (em repouso, as duas estruturas inibem os sítios de ligação entre actina e miosina). O potencial da membrana da célula em repouso é relativamente constante. A bomba de sódio-potássio ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) é responsável pelo balanço iônico, no estado de repouso, o sódio é impedido de entrar na célula por meio da atividade da bomba, sendo bombeado ativamente para o meio extracelular; a concentração de potássio é mantida internamente pela atividade da bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ e pela atração elétrica a vários aníons orgânicos.

2. Excitação-junção: a ruptura da homeostase iônica através da membrana resulta em mudança do potencial de ação: por exemplo, o movimento de íons negativos para o exterior da membrana e positivos para o lado interno, produzirá um decréscimo no potencial da membrana

(despolarização), enquanto que o movimento de íons negativos internamente ou a deposição de íons positivos adicionais externamente, causa uma hiperpolarização da membrana. Quando o estímulo nervoso chega a junção neuromuscular, há a liberação de acetilcolina, tornando possível a transmissão do impulso neuronal através da fenda sináptica e também criando um potencial pós-sináptico excitatório na fibra muscular. O potencial de ação gerado sofre propagação pelo sarcolema e consequentemente pelos túbulos transversos (invaginações do sarcolema que permitem a propagação do potencial de ação até o interior da fibra muscular). A despolarização é detectada por moléculas de di-hidropiridina (DHPR), também conhecidas como sensores de voltagem, estes interagem diretamente com o receptor de rianodina 1 (RYR1), também conhecido como canal de liberação de cálcio no músculo esquelético, ou receptor de rianodina no músculo esquelético, codificado pelo gene *RYR1*. A despolarização por potencial de ação resulta em mudanças na conformação de DHPR, estas mudanças são transmitidas para RYR1, levando a sua abertura e subsequente liberação de íons Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático para o meio intracelular (Laver, 2018). O aumento na concentração interna celular de Ca^{2+} facilita a ligação com a troponina C. A ligação leva a uma mudança na conformação da proteína que faz com que a troponina I exponha o sítio de ligação miosina-actina, levando ao acoplamento entre actina e miosina.

Figura 4: Acoplamento de excitação e contração, modificado de Lawal (Lawal et al., 2018).

3. Contração: quando ocorre o acoplamento entre actina e miosina, a enzima ATPase dependente de Mg^{2+} é ativada e leva a hidrólise do ATP, que permite a desintegração de ATP em ADP e P_i . A hidrólise leva a liberação de energia e a mudança de angulação das pontes cruzadas, acarretando na sobreposição dos filamentos de actina aos de miosina e gerando a contração muscular.

4. Restauração: para que ocorra uma nova ligação entre actina e miosina é necessária nova síntese de ATP. A energia para a ocorrência desta síntese deriva da decomposição de glicose, glicogênio, ácidos graxos livres ou da combinação de ADP (adenosina difosfato) com grupos fosfato da fosfocreatina. A produção de alguns moles de ATP pode ser obtida através da via da glicólise anaeróbia que resulta na produção de ácido láctico.

5. Relaxamento: quando o impulso nervoso termina e, conseqüentemente a diminuição de estímulo sobre o nervo motor, os íons de Ca^{2+} ligados aos sítios da troponina são reabsorvidos de forma ativa pela SERCA (*sarco/endoplasmic reticulum* Ca^{2+} -ATPase) para o interior das cisternas do retículo sarcoplasmático. Isso leva a diminuição da concentração intracelular de Ca^{2+} , desativando o complexo ATP-ponte cruzada e fazendo com que os miofilamentos de actina retornem a posição inicial.

O mau funcionamento desses mecanismos pode ocorrer em decorrência de mutações nos genes que codificam proteínas, que desempenham funções importantes para manutenção da homeostase da fibra muscular. Estas mutações podem levar a doenças que variam em grau de severidade, dado o tipo de mutação e a importância do gene afetado no processo de contração e manutenção da integridade muscular (Geeves and Holmes, 1999).

2. Doenças Neuromusculares

As doenças neuromusculares formam um grande grupo de afecções que tem como consequência o mau funcionamento dos músculos, por causa de defeitos em proteínas do próprio músculo, ou indiretamente, quando afetam os nervos e junções neuromusculares. Alguns dos fatores que causam doenças neuromusculares incluem causas autoimunes, exposição a fatores ambientais, envenenamento e principalmente, de origem genética.

Em relação a doenças genéticas, existem genes que codificam proteínas musculares com funções distintas, sendo que algumas funcionam para manter a estrutura da célula muscular, já outras possuem atividade enzimática e participam de diversas atividades metabólicas do músculo. Mutações em um ou mais genes que codificam estas proteínas podem

resultar em doenças do músculo, sendo que algumas destas doenças já são bem conhecidas na comunidade acadêmica e médica, e outras na qual o processo ainda é estudado.

A classificação destas doenças segue as diretrizes da *World Muscle Society* - WMS, onde as doenças neuromusculares são classificadas em dezesseis categorias, como por exemplo, as distrofias musculares, distrofias musculares congênitas e Miopatias Congênitas, abrangendo até o momento 519 genes/loci.

As Distrofias Musculares Progressivas (DMP) compõem um grupo complexo e heterogêneo de doenças hereditárias, na qual observa-se uma degeneração progressiva e irreversível da musculatura esquelética (Vainzof *et al.*, 2003). O processo distrófico é caracterizado por ciclos de degeneração e regeneração das células musculares que culminam no esgotamento da capacidade de regeneração do tecido, resultando em maior degeneração. Nos últimos anos, foram identificados genes relacionados a mais de trinta tipos de distrofias musculares, que podem ter herança autossômica dominante, autossômica recessiva e ligada ao X. Atualmente, muitos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de identificar mutações em genes relacionados a essas patologias. Entretanto, apesar da identificação de mutações responsáveis pela grande maioria das formas de DMP, os processos moleculares subjacentes aos defeitos genéticos primários ainda precisam ser melhores esclarecidos (Almeida *et al.*, 2016).

2. 1 Miopatias Congênitas (*Congenital Myopathies* - CM)

O termo Miopatia se refere à um grupo de doenças com heterogeneidade clínica, genética e histológica que afetam principalmente a musculatura esquelética. A presença de achados histológicos característicos na biópsia muscular diferencia este grupo de outras doenças neuromusculares. As Miopatias Congênitas são causadas por alterações genéticas que levam a defeitos estruturais em proteínas musculares e são classificadas conforme seu impacto histológico e genético (North *et al.*, 2014).

A manifestação dos sintomas das formas de Miopatia Congênita geralmente ocorre no período neonatal. Embora a epidemiologia precisa da Miopatia Congênita seja desconhecida, a mesma tem incidência estimada em 1: 25.000 e foi reportada como responsável por 14% de todos os casos de hipotonia neonatal (Tubridy *et al.*, 2001). A classificação das Miopatias Congênitas está sob constante revisão a medida que mais genes e formas são identificados e associados a várias expressões fenotípicas e histológicas. Nas formas estruturais, a classificação é baseada principalmente nas características observadas em biópsia muscular, podendo ser divididas nas seguintes formas:

- a) Miopatia Nemalínica
- b) Miopatia Centronuclear
- c) Miopatias com “Cores”

2.2 Características Clínicas

O fenótipo clínico, isoladamente, não permite distinguir os diferentes tipos de Miopatias Congênitas, pois todas as formas geralmente apresentam hipotonia e fraqueza muscular (presentes no nascimento ou aparecendo na infância) com progressão clínica lenta ou estática. No entanto, o espectro clínico é reconhecido por variar desde formas neonatais graves que apresentam artrogripose congênita até formas leves com início na infância de hipotonia não progressiva e baixo tônus muscular (North *et al.*, 2014; Jungbluth and Voermans, 2016). Nos casos neonatais e de início muito precoce, os sintomas são geralmente mais evidentes e podem consistir em movimentos fetais reduzidos e subsequente desenvolvimento de artrogripose e pé torto. A hipotonia muscular grave está frequentemente presente no nascimento e nos primeiros meses de vida, juntamente com uma postura dos membros retraídos, bem como dificuldade em sucção e insuficiência respiratória. Outro sintoma típico no primeiro ano de vida é a displasia congênita do quadril e hipomímia (fácies miopática). A medida que a criança cresce, a hipotonia muscular permanece estável, enquanto os marcos do desenvolvimento motor são atrasados; podem aparecer deformidades ósseas e articulares, como contraturas articulares, lordose, escoliose ou coluna rígida. Uma perda significativa de massa muscular, baixo peso corporal e atrofia muscular difusa são outras características comuns em CM (Colombo *et al.*, 2015). Pacientes com Miopatia Congênita geralmente apresentam características faciais dismórficas secundárias à fraqueza muscular, associadas ao palato arqueado e micrognatia. Movimentos extrínsecos anormais dos olhos com ptose palpebral e estrabismo podem se desenvolver mais tarde. A oftalmoparesia é uma característica clínica frequente em algumas formas.

2.3. Miopatia Nemalínica (*Nemaline Myopathy - NM*)

A miopatia nemalínica é caracterizada pela presença de pequenas inclusões do tipo bastonete ou “rods” nas fibras musculares. Constituídas principalmente por alfa-actinina, actina e outras proteínas de filamentos da banda Z, essas inclusões são claramente visualizadas pela reação histoquímica tricrômico de Gomori (Romero and Clarke, 2013). A miopatia nemalínica tem uma incidência de 1: 50.000 em bebês nascidos vivos, embora possa ser mais comum em determinadas populações. O espectro clínico é bastante amplo, apresentando variações fenotípicas leves e graves (Wallgren-Pettersson and Laing, 2000). As crianças afetadas pela forma grave de início neonatal, representam cerca de 16% de todos os casos, são hipotônicas desde o nascimento e têm dificuldade em sugar e engolir. Elas podem apresentar artrogripose e cardiomiopatia dilatada. A morte por insuficiência respiratória ou por pneumonia por aspiração geralmente se dá nas primeiras semanas ou nos primeiros meses de vida.

A forma mais comum, no entanto, é menos grave, sendo caracterizada pela fraqueza dos membros, músculos do tronco e da face, com progressão clínica lenta ou até mesmo estacionária, apresentando padrões da forma clássica de miopatia. Embora as crianças afetadas por essa forma de miopatia desenvolvam contraturas musculares e pés arqueados, a maioria é capaz de andar. O envolvimento respiratório é o principal fator prognóstico (Ryan *et al.*, 2001).

As causas genéticas mais comuns da miopatia nemalínica são mutações autossômicas recessivas no gene *NEB* e mutações de novo autossômicas dominantes em *ACTA1* (Romero *et al.*, 2013). Embora a causa genética de aproximadamente 50% dos casos permaneça desconhecida, outros genes que codificam componentes do filamento fino

sarcômero como: *TPM2*, *TPM3*, *TNNT1*, *CFL2*, *LMOD3* e três genes adicionais, *KBTBD13*, *KLHL40* e *KLHL41*, estão envolvidos na via do proteassomo-ubiquitina foram descritos como relacionados (North and Ryan, 2015).

2.4. Miopatias Centronucleares (*Centro Nuclear Myopathies* - CNM)

As Miopatias Congênitas Centronucleares (CNM) são caracterizadas pela presença de grande quantidade de fibras musculares com os núcleos localizados em fileiras na parte central da fibra (Nance *et al.*, 2012). As primeiras descrições da doença foram feitas na década de 60 (Spiro *et al.*, 1966). Inicialmente, a doença foi denominada como miopatia miotubular, uma vez que as fibras dos pacientes se assemelhavam à forma imatura das miofibras, com núcleo grandes e em posição central, padrão presente nas fases iniciais do desenvolvimento. Logo, foi constatado que a doença era causada por problemas no desenvolvimento e maturação das fibras, fazendo com que as fibras ficassem estacionadas em estágios iniciais na formação dos miotubos. Porém, posteriormente, foi demonstrado que o aspecto miotubular era secundário em relação ao dano primário, que ocorria já nas fibras maduras. Desta forma, o nome miopatia centronuclear se tornou mais usado, enquanto que o nome miopatia miotubular foi designado para uma forma mais específica e mais grave da doença.

Três formas principais foram identificadas de acordo com o padrão de herança e a manifestação clínica, quais sejam: a forma recessiva ligada ao cromossomo X, causada por mutações no gene *MTM1* (miotubularina); a forma autossômica recessiva causada por mutações no gene *BIN1* (anfifisina 2); e a forma autossômica dominante causada por mutações no gene *DNM2* (CNM-AD) (dinamina 2) (Romero and Bitoun, 2011).

As mutações em heterozigose no gene *DNM2* são associadas com um amplo espectro clínico desde CNM com progressão lenta, início na infância e adolescência, até formas esporádicas mais graves que apresentam manifestação neonatal (Bitoun *et al.*, 2007). A forma CNM-AD é caracterizada por desenvolvimento motor atrasado, fraqueza facial e muscular, ptose e oftalmoplegia. Os aspectos histológicos mais significantes são a localização central dos núcleos, a predominância e hipotrofia de fibras musculares lentas e a distribuição radial de fileiras de sarcoplasma. Também há predominância de fibras do tipo I (Jungbluth and Voermans, 2016).

A forma ligada ao X da CNM tem uma incidência estimada em torno de 2:100.000 nascimentos do sexo masculino (Savarese *et al.*, 2016; Cassandrini *et al.*, 2017). Os primeiros sintomas podem até aparecer no útero, consistindo em polidrâmnio e movimentos fetais reduzidos. Os indivíduos afetados, geralmente do sexo masculino, apresentam hipotonia e insuficiência respiratória ao nascimento. Eles também podem ter artrogripose múltipla com deformidades da coluna vertebral e da caixa torácica. A disfagia é um problema grave e muitas vezes é necessária uma sonda nasogástrica para a alimentação. Movimentos oculares reduzidos e ptose palpebral são características comuns. Os pacientes geralmente são macrossômicos e podem ter outras malformações, como estenose pilórica, hérnia inguinal e criptorquidia. Eles geralmente morrem durante o primeiro ano de vida devido a insuficiência respiratória ou pneumonia por aspiração. Apenas uma pequena porcentagem de indivíduos afetados atinge a adolescência ou a idade adulta, e esses casos requerem ventilação mecânica assistida e gastrostomia para alimentação (Cassandrini *et al.*, 2017). A exploração do histórico médico pode revelar um histórico de abortos repetidos de fetos masculinos no lado da mãe da família. Não há relatos de cardiomiopatia, defeitos de condução cardíaca ou arritmias. As

portadoras do sexo feminino são geralmente assintomáticas ou podem ocasionalmente mostrar, na infância, fraqueza moderadamente progressiva da cintura e hipomímia (Cassandrini *et al.*, 2017).

2.5. Miopatias com Cores

A prevalência dessas formas é desconhecida e clinicamente, são altamente heterogêneas. Os dois principais subtipos são: *Central Core Disease* (CCD) e *Multiminicore Disease* (MmD), ambas têm como causa mutações no gene *RYR1* e são as formas mais comuns de Miopatia Congênita.

A principal característica deste grupo se dá pela deficiência de atividade enzimática, oxidativa e glicolítica no interior da fibra muscular, reflexo da ausência de mitocôndrias. Isto se evidencia em biópsia muscular, na reação histológica de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADH), onde podemos observar um padrão de “Core”, na qual a ausência de reação reflete a falta de atividade enzimática das mitocôndrias. Os Cores se localizam em posição central, podem ocasionalmente, serem múltiplos e de localização excêntrica (Fig. 4).

Figura 5: NADH corte transversal do reto femoral. Na reação, enzimas presentes na mitocôndria têm a propriedade de transferir hidrogênio do dinucleotídeo reduzido de nicotinamida adenina (NADH) para vários corantes.

A miopatia *multiminicore* (MmD) tem padrão de herança autossômico recessivo com penetrância variável. Clinicamente heterogênea, o início geralmente ocorre na infância ou no final da adolescência, mas também existem formas adultas. Quatro formas fenotípicas foram descritas, embora com considerável sobreposição de sintomas entre elas (Jungbluth, 2007b). Pacientes com o fenótipo mais comum (forma clássica) apresentam fraqueza muscular axial grave com escoliose ou rigidez da coluna, torcicolo e comprometimento respiratório (Jungbluth, 2007b). No entanto, o grau de fraqueza muscular nem sempre está correlacionado com a gravidade da insuficiência respiratória. A progressão dos sintomas é lenta e esses pacientes podem apresentar sobreposição clínica com distrofia muscular congênita de coluna rígida (RSM1) causada por mutações no gene SELENOPROTEIN-N (*SEPN1*) (Ferreiro *et al.*, 2002). Em um segundo grupo de pacientes, a oftalmoplegia externa, completa ou parcial, está presente além do envolvimento muscular (Jungbluth *et al.*, 2005). Um terceiro grupo pequeno de pacientes apresenta fraqueza proximal, tipicamente da pelve ou cintura escapular, associada à artrogripose. Por fim, alguns casos com apresentação neonatal grave foram descritos na literatura (Bharucha-Goebel *et al.*, 2013). Em todas essas formas de miopatia multi-minicore, as manifestações clínicas geralmente têm início precoce e os níveis de CK são normais ou apenas ligeiramente elevados. Alguns pacientes podem sentir dor muscular ao fazer esforço (Cassandrini *et al.*, 2017).

3. Miopatia Central Core (*Central Core Disease* - CCD)

A Miopatia Central Core (CCD) possui padrão de herança autossômico dominante ou autossômico recessivo com penetrância variável (Jungbluth, 2007a), sua gravidade clínica pode variar entre membros da mesma família e também com a idade. As formas autossômicas recessivas são clinicamente mais graves e existem descrições de pacientes com acinesia fetal e artrogripose congênita (Romero *et al.*, 2003). Com exceção de casos de início neonatal, a manifestação dos sintomas da miopatia tem início ao nascimento ou na primeira infância e tem progressão lenta. Os sintomas incluem: atraso no desenvolvimento motor, envolvimento ocasional dos músculos da face, movimentos oculares reduzidos, ptose palpebral, hipotonia, fraqueza da musculatura proximal e axial simétrica estável ou gradualmente progressiva e aumento dos níveis séricos de creatina quinase (CK) (Cotta *et al.*, 2017). A função respiratória é preservada. Há relatos raros de bebês que apresentam quadro clínico mais sério. Pacientes podem apresentar suscetibilidade à Hipertermia Maligna (*malignant hyperthermia susceptibility* - MHS), uma complicação frequente.

Hipertermia Maligna (HM) é o nome dado a uma resposta hipermetabólica causada pela exposição a anestésicos voláteis como halotano, que tem como consequência um aumento súbito na temperatura corporal, aumento de CO₂, taquicardia, arritmias, hipertensão arterial e contraturas musculares excessivas que levam a rabdomiólise e mioglobínúria, condições que podem levar o paciente a óbito. A suscetibilidade à HM é hereditária, autossômica dominante e tem como causa mutações no gene *RYR1*. O teste de contratura *in vitro* (IVCT) em resposta ao halotano e à cafeína é o indicado no diagnóstico da HM induzida por anestesia, este é frequentemente positivo em pacientes com CCD (Hopkins *et al.*, 2015). As co-morbidades físicas que são descritas

em pacientes suscetíveis à Hipotermia Maligna induzida por anestesia, são: criptorquidia, ptose, estrabismo, hérnia, fraqueza muscular, tônus muscular aumentado ou diminuído e cifoescoliose.

A CCD e a MHS são condições alélicas devido a mutações, predominantemente dominantes, no gene *RYR1*, que alteram excitabilidade e/ou a homeostase do Ca^{2+} nas células do músculo devido a alterações conformacionais que levam a um mal funcionamento da proteína RYR1.

O diagnóstico de CCD baseia-se na presença de quadro clínico sugestivo de uma Miopatia Congênita e pela presença de Cores na biópsia muscular (Fig. 3). A ressonância magnética muscular pode mostrar um padrão característico de comprometimento muscular e auxilia o diagnóstico nos casos de equívoco em achados histopatológico.

A análise de mutações no gene *RYR1* pode fornecer confirmação genética do diagnóstico. Porém, deve ser feita com muito cuidado, devido ao tamanho do gene (154 kb), a frequência de variantes sem significado clínico é alta.

4. Ryanodine Receptor 1 (RYR1)

Os receptores de ryanodina (RYRs) compõe uma família de canais de liberação de cálcio intracelular, RYR1 por exemplo, possui papel importante na homeostase do complexo de excitação-contração (E-C), regulando a difusão de íons Ca^{2+} das reservas no retículo sarcoplasmático para o citosol. Tipicamente em resposta a estímulo nervoso, que causa a liberação de acetilcolina na junção neuromuscular, resultando na despolarização do sarcolema das fibras musculares inervadas (Fig. 3).

Nos mamíferos, existem três genes RYR distintos (*RYR1*, *RYR2* e *RYR3*) que codificam três proteínas RYR expressas diferencialmente. RYR1 e RYR2 são expressas predominantemente em células esqueléticas

e cardíacas respectivamente, enquanto o RYR3 é encontrado em diversos tecidos em níveis relativamente baixos (Jungbluth, 2007a).

O gene RYR1 (OMIM * 180901) que fica localizado no braço longo do cromossomo dezanove (19q13.2), é composto por 106 exons, dos quais 2 sofrem *splicing* alternativo. Com tamanho estimado em aproximadamente 160 kb, codifica uma proteína que contem 560 kDa. RYR1 é o principal canal de liberação de Ca^{2+} no tecido muscular.

Até o momento, foram identificadas cerca de 466 mutações no gene RYR1 (HGDM), sendo 399 delas mutações de ponto (missense/nonsense), 23 mutações em sítios de *splicing*, 26 pequenas deleções, 9 pequenas inserções, 4 indels pequenas, 3 deleções grandes e 2 grandes inserções e duplicações. As mutações nesse gene estão associadas à suscetibilidade à Hipertermia Maligna (MHS), Miopatia Central Core (CCD) e Miopatia *Multiminicore* com oftalmoplegia externa (MmD).

Historicamente, as mutações dominantes em *RYR1* tem maior frequência em três regiões da proteína, conhecidas como *hotspots* (região 1, N-terminal: de HM / CCD, aminoácidos 35-614 (sarcoplasma); região 2, central: de HM / CCD, aminoácidos 2163-2458 (sarcoplasma); e região 3 C-terminal: HM / CCD, aminoácidos 4550-4940 (Formação de poros, lúmen RS e membrana)). As mutações nos domínios N-terminal e central estão frequentemente associadas ao fenótipo de susceptibilidade à HM e mutações na região C-terminal estão relacionadas ao fenótipo clássico de CCD. As mutações recessivas encontradas nas miopatias relacionadas ao gene *RYR1*, vem sendo reportadas como uniformemente distribuídas por toda a sequência do gene (Lawal *et al.*, 2018).

As variantes em *RYR1* com padrão de herança dominante vem sendo frequentemente reportadas relacionadas com à suscetibilidade a HM e CCD, enquanto que variantes que são herdadas de forma recessiva são prevalentes em indivíduos com MmD (Zhou *et al.*, 2007). Em ambos os

padrões de herança podemos observar pacientes com histopatologia de *Congenital Fibre Type Disproportion* (CFTD).

Se supõe que mutações que resultam em CCD levam a defeitos na abertura do poro do canal e mutações que resultam em HM levam ao vazamento de canais RYR1, já mutações para MmD levariam a uma diminuição na expressão da proteína (Lyfenko *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2008; Lawal *et al.*, 2018).

5. Sequenciamento de Nova Geração (*Next Generation Sequencing*-NGS)

O sequenciamento do DNA é essencial para o estudo e compreensão das informações que compõe cada gene e regiões reguladoras presentes na molécula de DNA, e esforços de biologia molecular para ler a sequência de bases (A, T, G e C) se tornaram relevantes a partir da década de 1950. Porém, pesquisas com o intuito de sequenciar o material genético só tiveram início na década de 1970, comandadas por Frederick Sanger. A equipe do Professor Sanger em 1977 publicou dois trabalhos importantes (Sanger *et al.*, 1977), descrevendo todos os procedimentos necessários para se chegar à leitura dos quatro nucleotídeos, que compõe o material genético de todos os organismos.

O processo de sequenciamento se dá por uma reação enzimática, onde há a interrupção da cadeia de sequenciamento pela adição de um dideoxynucleotídeo, que é um nucleotídeo com uma modificação química: não possui o grupo hidroxila (OH) 3', que não permite a ligação ao próximo nucleotídeo. Inicialmente, estes nucleotídeos eram marcados com P32, que permitia sua visualização através de raios-X. Então, após a síntese dos fragmentos, estes nucleotídeos eram submetidos a eletroforese e observados em filmes de raio-X, que possibilitava a identificação da sequência de bases do produto amplificado (Sanger *et al.*, 1977).

O sequenciamento por Sanger se tornou popular em laboratórios no ano de 1986, quando a empresa Applied Biosystems, Inc. (ABI) deu início a comercialização de um sequenciador de DNA com sistema de detecção baseado em fluorescência, que foi desenvolvido por Smith (Smith *et al.*, 1986). Neste aperfeiçoamento da técnica, a etapa de marcação do P32 foi removida, o que levou a retirada de várias etapas do processo, reduzindo o tempo de reação e aumentando acurácia, eliminando uma das fontes de erro. Também nesta época, a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi desenvolvida por Mullis (Mullis *et al.*, 1986).

Mesmo com aprimoramento da técnica, o método sequenciamento por Sanger tem suas limitações. Há a necessidade de desenhar os primers para cada região do gene a ser estudada, cada reação permite apenas a visualização de uma região do gene, ou seja, o estudo de genes maiores é mais complexo. Isto levou a busca de técnicas mais aprimoradas para melhor estudo da molécula de DNA.

Os primeiros sequenciadores com abordagem alternativa ao método de Sanger surgiram quase 30 anos após o desenvolvimento da técnica. Nestas plataformas, o DNA a ser sequenciado é usado para construir uma biblioteca de fragmentos onde DNAs sintéticos (adaptadores) são ligados covalentemente a eles. Estes adaptadores são sequências universais utilizadas pela polimerase para amplificar os fragmentos das bibliotecas. Este processo geralmente ocorre em uma superfície sólida, seja em vidro plano ou por volta de “beads” (microesferas magnéticas).

A primeira vantagem do Sequenciamento de Nova Geração em relação ao método de Sanger se dá pela amplificação dos nucleotídeos e a detecção dos mesmos (o sequenciamento em si), que acontece de forma simultânea na reação (Mardis, 2013). Além do baixo rendimento, o sequenciamento por Sanger, para obter bons resultados, necessita que o DNA amplificado esteja em alta concentração (Polz and Cavanaugh, 1998)

e fornece um único padrão de sinal, ou eletroferograma, para cada sequência gerada. Já a tecnologia de nova geração pode ser conduzida com baixas concentrações de DNA e produz milhões de sinais em paralelo de uma mesma sequência (Shokralla *et al.*, 2014).

Outra vantagem se dá em relação ao tamanho da sequência produzida. Enquanto o método Sanger produz fragmentos com aproximadamente 1000 pares de base (pb), os primeiros sequenciadores de nova geração produziam fragmentos com apenas 150-200 (pb). Atualmente, o Sequenciamento de Nova Geração já é capaz de produzir fragmentos com mais de 500 pb (Ward *et al.*, 2016). A taxa de erro do Sequenciamento de Nova Geração que era mais elevada que a do método Sanger, porém, foi sendo reduzida com o aprimoramento das plataformas e atualmente não pode ser apontada como crítica a essa tecnologia.

A tecnologia de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) analisa múltiplos genes simultaneamente e permite identificar mutações que causam doenças. A combinação da captura de genes direcionados com o NGS não apenas fornece alta cobertura (até 99%) e precisão do sequenciamento de DNA, mas também reduz o custo por nucleotídeo.

O custo de sequenciamento também é uma vantagem. Após o investimento inicial com um novo equipamento, o custo por megabase é inferior a \$ 0.10 com a possibilidade de sequenciamentos completos de genomas em um período inferior a uma semana (Ward *et al.*, 2016). Assim, os custos e prazos são apenas uma fração dos necessários para o sequenciamento via método Sanger.

Porém, a principal vantagem em relação a metodologia de Sanger é a possibilidade de sequenciamento de diversos genes (Painel), todas as regiões codificantes *Whole Exome Sequence* (WES) e até do genoma todo *Whole Genome Sequence* (WGS) em apenas uma reação.

Os painéis de genes direcionam o NGS para genes e regiões consideradas relevantes para diversas doenças. Estão disponíveis painéis personalizados que podem incluir várias centenas de genes de interesse e painéis prontos para uso com mais de 6.000 (seis mil) genes. Painéis prontos para uso, como os painéis Illumina *Trusight* oferecem triagem em larga escala de genes que são considerados importantes, como os do banco de dados do *Mendelian Inheritance in Man* (OMIM). Os painéis são um método de rastreamento relativamente barato para procurar variantes genéticas associadas a doenças neuromusculares específicas (Efthymiou *et al.*, 2016).

Considerando o grande tamanho do gene *RYR1*, o desenvolvimento das técnicas de NGS permitiram o estudo de variantes em toda sequência do gene de forma muito mais rápida e eficiente nos pacientes com suspeitas de miopatia relacionada ao RYR1.

II. Objetivos

Este projeto visa a caracterização molecular de pacientes com CCD. Os resultados são essenciais para a compreensão da natureza e causas de mutações no gene *RYR1* que induzem a doença, e certamente serão importantes na busca por terapias e tratamentos. Além disso, a classificação e caracterização molecular e etiológica são fundamentais para o aconselhamento genético da família e para prevenção da doença em diferentes populações.

1. Objetivos Específicos

- Realizar triagem e seleção de pacientes recebidos no CEGH-CELL diagnosticados com CCD, de acordo com a avaliação clínica e análise da biópsia muscular.
- Realizar o sequenciamento de DNA dos pacientes selecionados.
- Realizar análise molecular de dados obtidos através de NGS verificando a presença de variações no gene *RYR1* para classificação da mutação primária dos pacientes.
- Verificar a patogenicidade das variantes selecionadas com auxílio de ferramentas de bioinformática.
- Realizar sequenciamento Sanger para confirmação das variantes.
- Verificar as formas devidas a variantes monoalélicas e bialélicas nos pacientes brasileiros.
- Realizar análise histológica do músculo, e correlacionar as características histológicas com a mutação primária.

III. Materiais e Métodos

1. Seleção dos Pacientes

Os pacientes estudados neste projeto foram selecionados por diferentes profissionais que realizam consultas no ambulatório de doenças neuromusculares do Centro de Estudos do Genoma Humano, IB, USP-SP, durante os últimos 20 anos. Muitos pacientes foram também encaminhados por outros Centros, com diagnóstico histopatológico de CCD.

Os critérios de inclusão foram os seguintes: pacientes de qualquer idade e sexo que não tenham parentesco com os demais, com diagnóstico clínico de Miopatia Congênita e avaliação histológica da biópsia muscular mostrando a presença de Cores.

2. Sequenciamento de DNA

O DNA dos pacientes selecionados foi extraído de células de defesa do sistema sanguíneo a partir de 1 ml de sangue.

A investigação genética foi inicialmente realizada por NGS, onde utilizou-se um painel customizado que inclui 95 genes associados às doenças neuromusculares. Foram utilizados os kits de preparo de biblioteca *Sure Select QXT* e kit de captura *Sure Select Human all Exon V6* (Agilent, Estados Unidos), o sequenciamento foi realizado pelo equipamento HiSeq2500 (Illumina, Estados Unidos). Os dados foram alinhados de acordo com a versão de referência GRCh37/hg19 do genoma humano.

3. Metodologia de Análise do Painel de Sequenciamento

Uma mutação é definida como a mudança permanente na sequência de nucleotídeos. Enquanto que polimorfismos são variantes com frequência acima de 1%. Entretanto, os termos “mutação” e “polimorfismo” vem sendo utilizados amplamente e muitas vezes levam a confusão devido a suposições incorretas sobre os efeitos patogênicos e benignos, respectivamente. A ACMG (*American College of Medical Genetics and Genomics*) estabeleceu uma padronização da nomenclatura das variantes encontradas no DNA, esta classificação dá uma melhor noção do real significado destas, assim, recomendando a substituição dos termos “mutação” e “polimorfismo” pelo termo "variante" e pelos seguintes modificadores: (1-*pathogenic*) patogênica; (2-*likely pathogenic*) provavelmente patogênica; (3-*uncertain significance*) significado incerto; (4-*likely benign*) provável benigna; ou, (5-*benign*) benigna (Richards *et al.*, 2015). As variantes encontradas neste estudo seguem esta classificação.

3.1 Filtragem e Seleção de Variantes

Foi implementado um protocolo que consiste na compilação de dados e filtragem de propriedades das variantes para identificar quais estariam relacionadas ao fenótipo do paciente e determinar seu potencial impacto.

Em um primeiro momento, foram selecionadas as variantes presentes no gene *RYR1* (NM_000540). com frequência abaixo de 1% em bancos de dados de sequenciamento de pacientes normais (MAF 0,01). A frequência destas variantes foi determinada com base em bancos de genomas/exomas como:

- a) 1000 Genomes (internationalgenome.org/)
- b) *Exome Aggregation Consortium* (ExAC)
(exac.broadinstitute.org/)
- c) *Genome Aggregation Database* (gnomAD)
(gnomad.broadinstitute.org/)
- d) Arquivo Brasileiro Online de Mutações (ABraOM)
(abraom.ib.usp.br/)

Durante a análise, avaliamos a frequência das variantes em duas populações diferentes: primeiramente em relação a população geral, não sendo aplicado o filtro de idade ou doença, por exemplo. Nesta população, filtramos as variantes que apresentam frequência abaixo de 1%. Então, verificamos a frequência das variantes filtradas na segunda população, sendo esta composta por sequenciamentos realizados no CEGH de pacientes com idade acima de 60 (sessenta) anos (estes dados podem ser acessados em ABraOM).

A partir deste momento, o número de variantes a ser estudado cai drasticamente, uma vez que variações na sequência de DNA são relativamente comuns, principalmente em genes tão grandes como no caso de *RYR1*, isso levando em consideração que o sequenciamento realizado no estudo só captura variantes presentes nos exons e regiões reguladoras.

Com um número menor de variantes por paciente, podemos fazer uma análise mais aprofundada de cada uma. O primeiro item observado, foi o tipo de alteração na sequência de DNA, que pode ser a alteração de uma base nitrogenada, a inserção de uma ou mais bases ou deleção de uma ou mais bases na sequência de DNA.

Sabendo disso, as variantes seguem uma classificação que ajuda a determinar o seu impacto na proteína, seguindo as nomenclaturas:

- a) Sinônima: variante que altera uma base na sequência de DNA porém não altera no aminoácido na proteína final, o que não significa que a mesma não possui potencial patogênico, uma vez que pode se encontrar em algum sítio de *splicing* e pode remover um ou mais exons da informação que será traduzida.
- b) Não sinônima (missense): variante que altera uma base na sequência de DNA e por sua vez, leva a uma alteração no aminoácido da proteína.
- c) Nonsense: variante que altera uma base na sequência de DNA e por sua vez, leva a um códon de parada prematuro (*stopcodon*) que sinaliza o fim da síntese da proteína, resultando em uma proteína truncada.
- d) Frameshift: deleção ou inserção de uma ou mais bases na sequência de DNA que, por sua vez, leva a mudança no quadro de leitura da proteína.

Logo após a classificação, foi verificado se as variantes encontradas possuíam algum tipo de anotação em bancos de dados de mutação, como:

- a) Clinvar (ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/)
- b) *Human Genome Mutation Database* (HGMD)
(hgmd.cf.ac.uk/ac/search.php)
- c) *Leiden Open Variation Database* (LOVD)
(<https://www.lovd.nl>)

A anotação é de grande importância para acessar a patogenicidade da variante, uma vez que algum estudo ou laboratório já observou a mesma e, com base em diversas informações, realizou sua classificação.

Contudo, é importante ressaltar que nem sempre a classificação está correta, devido a diversos fatores como: a data em que aquela variante foi identificada; a tecnologia que foi utilizada para detecção da variante; e, a nomenclatura utilizada. Por estes e outros motivos, é indispensável cruzar as informações entre diferentes bancos de dados de mutação e checar a metodologia utilizada no estudo que reportou a variante para a classificação.

O possível impacto das variantes encontradas e não reportadas em bancos de dados foi verificado em programas de predição de patogenicidade, que são *softwares* desenvolvidos com a finalidade de determinar, através de algoritmos, o possível impacto que a alteração de um ou mais nucleotídeos pode gerar na proteína, tais como:

- a) *Mutation Taster* (mutationtaster.org/)
- b) *Predict SNP1* (loschmidt.chemi.muni.cz/predictsnp/)
- c) *Combined Annotation Dependent Depletion* (cadd.gs.washington.edu/)
- d) *Variant Effect Predictor* (VEP) (<https://www.ensembl.org/Tools/VEP>)
- e) *Sorting Intolerant from Tolerant* (SIFT) (sift.bii.a-star.edu.sg/)
- f) *Polifen2* (genetics.bwh.harvard.edu/pph2/)
- g) *Human Splicing Finder* HSF 3.0 (<http://umd.be/HSF3/>)

É importante ressaltar que cada software tem sua metodologia de predição uma vez que eles podem discordar do potencial impacto da variante, por exemplo, o HSF tem como finalidade verificar se a mutação altera sítios de *splicing*, o que pode incluir ou excluir um ou mais exons na síntese da proteína. O software *Mutation Taster* por sua vez, realiza uma bateria de testes *in silico* para estimar o impacto da variante no produto da proteína ou do gene, entre estes estão: análise do sítio de *splicing*, conservação de resíduos de aminoácidos entre as espécies, se a mesma já tem anotação em bancos de dados de mutações, a predição do tamanho do produto final da proteína com a alteração, entre outros parâmetros.

Por fim, para classificação das variantes, compilamos dados de predição por *softwares*, clínicos e histopatológicos de cada paciente, bem como, com o auxílio do *software* Intervar (<http://wintervar.wglab.org/>), que segue as diretrizes da ACMG para acessar o possível grau de patogenicidade das variantes.

4. Histologia

Os pacientes foram selecionados de acordo com seu diagnóstico clínico e, quando possível, a biópsia muscular foi solicitada. Estes pacientes atendidos pelo CEGH, possuíam biópsia muscular e lâminas com as reações histológicas já realizadas armazenadas no serviço de origem.

Para as reações, os músculos foram fixados com *TissueTek* O.C.T (Quiagen) em blocos de cortiça e envoltos por talco para crioproteção e congelados em nitrogênio líquido. O tecido congelado foi cortado em criostato (Microm HM 505E) a temperatura de -25°C, com cortes de 6µm de espessura, de modo que as fibras se apresentassem em disposição transversal na lâmina, que foi previamente preparada com polilisina. As lâminas foram mantidas em refrigeração a -70°C até o momento da sua utilização.

4.1 NADH-TR

Para início do procedimento, as lâminas a serem reagidas foram retiradas do freezer a -70°C e colocadas em temperatura ambiente por uma hora. Neste período, foi descongelada a solução NADH (Sigma N8129) (alíquota em tudo de 50ml) e 5 ml de solução NBT (Fisher A931-1) foi adicionada ao tubo. Então, as lâminas foram colocadas em cuba de vidro para coloração e incubadas por trinta minutos a 37°C . Logo após a incubação, as lâminas foram enxaguadas três vezes em H_2O deionizada. As lâminas foram desidratadas em solução de acetona de 30%, 60% e 90%, aumentando a concentração e depois diminuindo, deixando-as em acetona 90%, cobrindo as seções até que uma leve nuvem arroxeadas fosse vista sobre a seção. Finalmente, as lâminas foram novamente enxaguadas três vezes com H_2O deionizada e montadas em meio aquoso (ICN#960317 - 100 bloom 4 g).

4.2 ATPase

O ensaio histoquímico da atividade da ATPase miofibrilar é utilizado para distinguir fibras musculares de contração rápida e lenta. Como a atividade da miosina ATPase está positivamente correlacionada com a velocidade de contração muscular, as medidas da atividade da ATPase podem ser interpretadas em termos de velocidade de contração.

O primeiro passo deste ensaio foi uma pré-incubação com solução ácida pH 4.3 ou básica pH 9.4. As pré-incubações ácidas inibem a atividade da miosina ATPase nas fibras de contração rápida (tipo 2a, 2x e 2b), mas não as fibras de contrações lentas (tipo 1). Por outro lado, as pré-incubações básicas inibem a miosina ATPase apenas nos tipos de fibras lentas. As fibras musculares de contração rápida hidrolisam o ATP mais rapidamente do que as fibras de contração lenta. Quando dados tempos

equivalentes de incubação, as fibras de contração rápida apresentam cor escura em reação histológica e as fibras de contração lenta aparecem claras, em PH 4.3 e o inverso acontece em PH 9.4.

As lâminas a serem reagidas foram retiradas da temperatura de -70°C e deixadas em temperatura ambiente por uma hora e, então, foram incubadas na solução 4.3 por exatamente cinco minutos e na solução 9.4 por quinze minutos, ambas em temperatura ambiente. Após os períodos apropriados de pré-incubação, as lâminas foram enxaguadas uma vez com água deionizada.

A solução de ATP foi adicionada no frasco de coloração por vinte e cinco minutos para as reações com pH 4.3 ATP e quinze minutos para as reações com pH 9.4. Cada frasco de coloração foi lavado com três trocas de cloreto de cálcio a 1% por aproximadamente dez minutos. Foi adicionado 2% de cloreto de cobalto em cada frasco, por dez minutos. Então, as lâminas foram lavadas com 4 trocas de solução de Barbital de sódio 0,1M aproximadamente a 1:20 (~ 5 ml 0. Barbital de sódio 0,1 M + água deionizada ~ 100 ml) e em seguida foram enxaguadas 5 vezes com H₂O deionizada. Em capela, foi preparada a solução de sulfeto de amônio (0,2 ml de NH₄SO₂ + 9,8 ml de H₂O deionizada) 10 ml para cada frasco de coloração, que foram adicionados por trinta segundos na reação, em seguida as lâminas foram enxaguadas 5 vezes com H₂O deionizada. Então, as lâminas foram limpas e desidratadas em bateria de álcoois ascendentes (50%, 70%, 80%, 95% 2x e 100% 2x) e montadas com bálsamo do Canadá.

IV. Resultados

1. Análise Molecular

a) Caracterização dos Pacientes

Um total de 25 pacientes foram estudados, pertencentes a 21 famílias distintas, contendo pelo menos um paciente afetado por CCD.

Dentre estas famílias, 4 apresentavam mais de um paciente afetado, sendo 3 com padrão de herança autossômico dominante (P10, P17 e P19) e uma, autossômica recessiva (P2, dois irmãos afetados), e 18 eram casos isolados. Foi constatada a presença de consanguinidade nos genitores apenas na família de P12.

b) Descrição das Mutações

Para a triagem de mutações nas 21 famílias, foram aplicados diversos filtros, selecionando variantes no gene *RYR1* com frequência menor que 1% na população normal. Foram identificadas 24 variantes diferentes, sendo 23 delas de sentido trocado (*missense*), e uma deleção *frameshift*. No paciente P21, não foi encontrada alteração relevante no gene *RYR1*. Dentre as variantes, 21 não se repetiram entre os pacientes, enquanto que a variante p.R4861H foi encontrada nos pacientes P13 e P14 e a variante p.R4861C nos pacientes P8 e P15. Ainda, foram encontradas variantes diferentes em um mesmo códon, como: (p.R4861H (P13 e P14), p.R4861C (P8 e P15)) e (p.R4914M (P19), p.R4914T (P20)).

Entre as 24 variantes encontradas, 15 foram previamente descritas na literatura e 9 variantes estão sendo descritas pela primeira vez neste trabalho. Dentre as 15 variantes descritas, 11 foram previamente identificadas em pacientes com CCD e estão presentes nos pacientes P4,

P8, P9, P12, P13, P14, P16, P17, P18, P19 e P20. Duas variantes foram identificadas em pacientes com suspeita de HM (P2 e P6), sendo que no paciente P2, a variante p.R614C está na lista de mutações patogênicas da *Eropean Malignant Hypetermia Group* (www.emhg.org). Por fim as variantes p.F41S e p.Y1121C presentes no paciente P1 foram descritas em pacientes com Miopatia Congênita.

Dentre as 9 variantes novas encontradas neste estudo: 4 variantes foram classificadas como possivelmente patogênicas (P2, P10, P11 e P20); 4 variantes foram classificadas como variantes de significado incerto (VUS) (P4, P5, P7 e P8); e uma encontrada no paciente P3, foi classificada como provavelmente benigna. (Tabela 1).

Em 3 pacientes (P4, P8 e P19), estas variantes não classificadas estão presentes em heterozigose composta.

c) Distribuição das Variantes nos Domínios da Proteína RYR1

A distribuição das variantes em RYR1 mostrou que: 17 se encontram no domínio C-terminal da proteína (P2, P4, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19 e P20); 1 foi localizada no domínio N-terminal (P1); 1 foi encontrada na região central da proteína (P4); e, 7 estão distribuídas pela sequência de RYR1 (P1, P2, P3, P5, P6, P7 e P8) e não se encontram nos domínios tipicamente estudados.

d) Variantes Monoalélicas X Bialélicas

Dentre os 21 pacientes estudados, 7 pacientes apresentaram duas variantes, porém, em somente em 6 deles as duas variantes estavam em trans. Portanto, variantes bialélicas foram encontradas 6 das 21 famílias, ou com frequência de 28% de nossa amostra. O paciente P12 apresentou

variante em homozigose, já os outros 5 pacientes (P1, P2, P4, P8 e P9) apresentaram variantes distintas nos dois alelos, formando heterozigose composta, enquanto que os demais pacientes apresentaram variantes em somente um dos alelos (em heterozigose).

Na paciente, P19, e em sua mãe e irmão, as duas variantes patogênicas identificadas localizavam-se no exon 102. A análise de segregação mostrou que as duas variantes se encontravam em cis, no mesmo alelo, compatíveis com o padrão de herança AD observado na família.

Exceto no paciente P9, todos os pacientes que apresentaram heterozigose composta possuem ao menos uma variante que não se localiza na região C-terminal (Tabela 1).

Tabela 1: Dados das variantes filtradas pela análise do NGS. Transcrito de referência do gene *RYR1*: NM_000540. Abreviações: (F – caso Familiar), (I – caso Isolado), (AD – herança Autossômica Dominante), (AR – herança Autossômica Recessiva) e (-) variantes reportadas neste estudo. As variantes foram classificadas de acordo com as diretrizes da ACMG.

Paciente	I / F	Exon	Variante	Classificação	Descrição
P1	I	2	c.T122C:p.F41S	Likely pathogenic	Klein et al., 2011
		25	c.A3362G:p.Y1121C	Likely pathogenic	Wilmschurst et al., 2010
P2	I	17	c.C1840T:p.R614C	Likely pathogenic	Gillard et al., 1991
		104	c.14935_14936del:p.H4979fs	Pathogenic	-
P3		35	c.A5723G:p.K1908R	Likely benign	-
P4	I	46	c.C7433A:p.T2478N	Uncertain significance	-
		94	c.T13703C:p.L4568P	Pathogenic	Wu et al., 2006
P5	I	66	c.T9758C:p.I3253T	Uncertain significance	-
P6	I	73	c.G10747C:p.E3583Q	Uncertain significance	Fattori et al., 2015
P7	I	79	c.A11269G:p.M3757V	Uncertain significance	-
P8	I	79	c.C11321T:p.A3774V	Uncertain significance	-
		101	c.C14581T:p.R4861C	Likely pathogenic	Davis et al., 2003
P9	F - AR	94	c.G13673A:p.R4558Q	Likely pathogenic	Kossugue et al., 2007
		101	c.C14537T:p.A4846V	Likely pathogenic	Gambelli et al., 2007
P10	F - AD	95	c.A13952G:p.H4651R	Likely pathogenic	-
P11	I	100	c.A14411C:p.H4804P	Likely pathogenic	-
P12	I	101	c.G14545A:p.V4849I	Pathogenic	Jungbluth et al., 2002
		101	c.G14545A:p.V4849I	Pathogenic	Jungbluth et al., 2002
P13	I	101	c.G14582A:p.R4861H	Pathogenic	Monnier et al., 2001
P14	I	101	c.G14582A:p.R4861H	Pathogenic	Monnier et al., 2001
P15	I	101	c.C14581T:p.R4861C	Likely pathogenic	Davis et al., 2003
P16	I	101	c.C14677T:p.R4893W	Likely pathogenic	Monnier et al., 2001
P17	F - AD	102	c.G14690T:p.G4897V	Pathogenic	Kossugue et al., 2007
P18	I	102	c.T14693C:p.I4898T	Likely pathogenic	Broman et al., 2007
P19	F - AD	102	c.C14763G:p.F4921L	Pathogenic	Todd et al., 2018
		102	c.G14741T:p.R4914M	Likely pathogenic	-
P20	I	102	c.G14741C:p.R4914T	Likely pathogenic	Davis et al., 2003
P21			Não foi encontrada variante relevante no gene <i>RYR1</i>		-

2. Análise Histológica

Em relação a análise histológica, foi possível avaliar 9 biópsias dos pacientes que realizaram a biópsia em nosso Centro, sendo eles os pacientes P1, P3, P4, P5, P8, P11, P12, P13 e P18. As fibras musculares contendo Core foram observadas em todas as amostras, sendo que a maioria apresenta cerca de 99% de fibras acometidas (Tabela 2).

Tabela 2: Padrão dos Cores na biópsia muscular dos pacientes avaliados.

Paciente	Exon da variante	% fibras com Cores	Número Cores / fibra	Tamanho do Core / fibra	Posição	Formato do Core
P1	2/25	96	Vários	Pequenos	Central	Pouco estruturados
P3	35	86	Vários	Pequenos	Periferico	Pouco estruturados
P4	46/94	99	Único	Grande	Central	Bem estruturado
P5	66	52	Único	Grande	Central	Pouco estruturados
P8	19/101	99	Único	Grande	Central	Bem estruturado
P11	100	84	Único	Grande	Periferico	Estruturados
P12	101/101	41	Vários	Pequenos	Periferico	Pouco estruturados
P13	101	100	Único	Grande	Central	Bem estruturado
P18	102	100	Vários	Grandes	Periferico	Pouco estruturados

Quatro pacientes (P4, P8, P11 e P13) apresentaram Cores estruturados grandes e localizados na região central ou periférica da fibra, enquanto que 5 pacientes (P1, P3, P5, P12 e P18) apresentaram Cores não estruturados, grandes ou pequenos e em número variável no interior da fibra (Fig. 5 e 6).

Todos os pacientes com cores grandes únicos e estruturados apresentaram pelo menos uma mutação no domínio C-terminal da proteína.

Figura 5: Reações histológicas de NADH-TR aumento 40x. Pacientes P1, P3, P4, P5, P11, P12, P13 e P18.

Paciente 1 (P1)

Observou-se a predominância de fibras do tipo 1 e na reação de NADH a maioria das fibras apresentaram discreta deficiência de atividade oxidativa com áreas únicas ou múltiplas mais claras no interior de praticamente todas as fibras musculares (Fig. 5).

Paciente 3 (P3)

Observou-se a predominância parcial de fibras do tipo 1 e as poucas fibras do tipo 2 presentes apresentaram hipotrofia. Na reação de NADH, 86% das fibras apresentaram Cores, únicos ou múltiplos, com formato pouco estruturado, e pouco definidos, com posição tanto central como periférica (Fig. 5).

Paciente 4 (P4)

Este paciente apresentou o padrão histológico clássico de CCD, onde se observa predominância de fibras do tipo 1 e praticamente todas as fibras apresentam padrão de Core único, grande, bem estruturado e localizado no centro da fibra (Fig. 5).

Paciente 5 (P5)

Neste paciente, a qualidade do corte histológico do músculo para a análise não foi a ideal. Porém, ficou evidente a predominância de fibras do tipo 1. Na reação de NADH, 52% das fibras apresentaram discreta deficiência de atividade oxidativa em seu interior, com áreas mais claras, constituindo Cores grandes e não estruturados. (Fig. 5)

Paciente 8 (P8)

Neste paciente, a biópsia muscular mostrou a presença de Cores bem estruturados e em posição central em praticamente todas as fibras, associados a um padrão histopatológico atípico, com fibrose intensa e com alto grau de degeneração muscular, remetendo a um padrão distrófico. Além disso, observamos a predominância de fibras do tipo 1 (Fig. 6).

Figura 6: Reações histológicas do paciente P8, a esquerda NADH-TR e a direita Hematoxilina-Eosina, aumento 40x.

Paciente 11 (P11)

Neste paciente, observamos a predominância de fibras do tipo 1. Em NADH, 84% das fibras apresentaram Cores grandes, únicos e, na maioria, estruturados, e tanto em posição central como periférica.

Paciente 12 (P12)

Neste paciente, observamos a predominância de fibras do tipo 1 e, em NADH, 40% das fibras continham cores. Os Cores não estavam bem definidos e se encontravam tanto em posição central como periférica.

Paciente 13 (P13)

Observamos o padrão histológico clássico de CCD, apresentando clara predominância de fibras do tipo 1, onde praticamente todas as fibras apresentam Cores, únicos, grandes bem delimitados e localizados no centro da fibra.

Paciente 18 (P18)

A qualidade do corte histológico do músculo prejudicou a análise. Porém, estava evidente a predominância de fibras do tipo 1. Em NADH, a maioria das fibras apresentou Cores, sendo que estes se encontravam tanto em posição central como periférica, com algumas fibras apresentando mais de um Core.

V. Discussão

A Miopatia Central Core - CCD é a forma mais comum das Miopatias Congênitas, causada predominantemente por mutações no gene *RYR1*. Porém, mutações no mesmo gene podem levar a outros tipos de doenças como MHS e MmD.

O gene *RYR1* é composto por 106 exons e as mutações nos pacientes estão distribuídas ao longo de toda a sua sequência. Até o momento, foram identificadas 466 variantes patogênicas no gene *RYR1*(HGDM) associadas a diversos fenótipos relacionados. Dentre estas, 399 mutações de ponto (*missense/nonsense*); 23 mutações em sítios de *splicing*; 26 pequenas deleções; 9 pequenas inserções; 4 *indels* pequenas; 3 deleções grandes; e, 2 inserções e duplicações grandes. Destas variantes, 91 são relacionadas à CCD.

Em concordância, com estes dados, identificamos em nossos pacientes um predomínio de variantes de sentido trocado, constituindo 23 das 24 variantes encontradas nos pacientes brasileiros com CCD. Em estudo realizado por Wu (Wu *et al.*, 2006), variantes de sentido trocado foram encontradas em 25 dos 27 pacientes com CCD estudados.

Mutações de perda de função, que levam a ausência da expressão de *RYR1* no músculo são incompatíveis com a vida, como demonstrado por Takeshima em modelo murino *knockout* para o gene *RYR1* (Takeshima *et al.*, 1994). Na ausência da proteína, o camundongo apresenta morte perinatal com anomalias musculares grosseiras. Este estudo também mostrou que *RYR1* é essencial tanto para a maturação muscular quanto para que ocorra o acoplamento E-C uma vez que proteínas homólogas a *RYR1* como *RYR2*, que também é expresso no músculo, não possuem a capacidade de tamponar o efeito causado pela ausência da proteína,

levando a defeitos na liberação de íons Ca^{2+} intracelular. A função da proteína RYR1 seria, portanto essencial no músculo esquelético durante o acoplamento E-C e não poderia ser substituída por outros subtipos do receptor.

O grande número de variantes identificadas no gene RYR1 em pacientes com CCD tem mostrado a ocorrência de significativa variabilidade molecular, constituindo em sua grande maioria, mutações particulares para cada família, sendo que apenas 10% das variantes em RYR1 foram funcionalmente caracterizadas (Jungbluth, 2007a; Lawal *et al.*, 2018). Este fato também foi observado em nossos pacientes, comprovado pelo número de variantes distintas encontradas. É importante notar que dentre as 24 variantes que identificamos, nove não foram descritas previamente. Portanto, o número de variantes com possível significado clínico neste gene, possivelmente, pode aumentar com os novos estudos, utilizando novas tecnologias moleculares.

Por outro lado, algumas variantes têm sido descritas com maior frequência em diversas populações como as variantes p.R4861C (Davis *et al.*, 2003 - LOVD: 12 reports), p.R4861H (Monnier *et al.*, 2001 - LOVD: 16 reports), e p.R614C (Gillard *et al.*, 1991 - LOVD: 43 reports). Nos pacientes brasileiros, também identificamos estas variantes, que inclusive estavam presentes em mais de um paciente (não aparentado).

O diagnóstico de CCD baseia-se na presença de quadro clínico sugestivo de uma Miopatia Congênita, achados histológicos característicos, como a predominância de fibras do tipo 1 e pela presença de Cores na biópsia muscular. A ressonância magnética muscular pode mostrar um padrão característico de comprometimento muscular e auxilia no diagnóstico em casos de equívoco em achados histopatológico. No entanto, a identificação do defeito molecular primário é essencial para o estabelecimento definitivo do diagnóstico, principalmente porque de

acordo com a classificação mais recente de mutações em doenças neuromusculares (<http://muscle.genetable.fr/>), CCD aparentemente não é uma doença geneticamente heterogênea. Variantes patogênicas em RYR1 permitem, portanto, confirmar o diagnóstico clínico e realizar o aconselhamento genético da família (Wu *et al.*, 2006; Malicdan and Nishino, 2014).

Até recentemente, o diagnóstico genético era realizado através do sequenciamento por Sanger dos exons que apresentam maior frequência de mutação, localizados nas regiões N-terminal, central e C-terminal da proteína (Monnier *et al.*, 2001; Davis *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007). Entretanto, este método era muito trabalhoso e muitos pacientes tinham um diagnóstico inconclusivo. Neste cenário, as técnicas de Sequenciamento de Nova Geração, são ferramentas mais recentes e eficazes para o diagnóstico molecular, uma vez que a técnica de NSG permite sequenciar diversos genes em uma só reação, possibilitando que grande quantidade de informações sobre a composição genética de uma pessoa esteja disponível para análise de uma forma relativamente rápida. No caso do gene RYR1, a tecnologia permite sequenciar todos os exons de uma só vez, o que é essencial para uma análise mais robusta do gene, diferente das ferramentas de primeira geração. De fato, o uso desta nova metodologia nos possibilitou identificar variantes neste gene em 20 dos 21 pacientes avaliados.

a) Pacientes com Variantes Previamente Descritas

A Paciente P1, caso isolado na família, apresentou duas variantes previamente descritas como patogênicas, p.F41S e p.Y1121C, nos exons 2 e 25 do gene *RYR1*, envolvendo os dois alelos. Interessantemente, estas duas variantes já foram reportadas previamente por Klein (Klein *et al.*, 2011) e Wilmshurst (Wilmshurst *et al.*, 2010), causando o fenótipo de CCD também em heterozigose composta. A p.F41S estava combinada com uma outra variante p.T3933C (Klein *et al.*, 2011) e a variante p.Y1121C estava em combinação com a variante p.L2689A (Wilmshurst *et al.*, 2010). Estas duas variantes não estão no domínio C-terminal, geralmente envolvido em CCD, o que poderia explicar a necessidade das duas variantes para a ocorrência do fenótipo. Portanto, de acordo com os critérios utilizados, ambas variantes foram classificadas como de significado provavelmente patogênico.

A paciente P6, caso isolado na família, foi avaliada com 3 anos de idade apresentando um com quadro clínico leve e luxação do quadril esquerdo. Identificamos a variante p.E3583Q, no exon 73 do gene *RYR1*. Esta variante foi previamente reportada em um paciente com HM (Brandom *et al.*, 2013), e também foi encontrada em um paciente com CNM (Fattori *et al.*, 2015). Em outro trabalho (Loseth *et al.*, 2013), uma variante envolvendo o mesmo códon foi encontrada em paciente com quadro clínico de distrofia muscular axial, sugerindo que este códon pode ter um papel importante na função da proteína RYR1. Algoritmos desenvolvidos para prever o efeito de alterações missense na estrutura e função da proteína, indicam que a variante não causa impacto significativo na estrutura da proteína (PolyPhen-2:*possibly damaging*; Mutation taster: *polymorphism*). De acordo com os critérios utilizados esta variante foi classificada como de significado incerto (*VUS*).

A paciente P9, de 44 anos de idade, tem um irmão também afetado (42 anos), e os pais, não consanguíneos, são clinicamente normais, sugerindo um padrão de herança autossômico recessivo. Apresentam história de quedas frequentes e fraqueza muscular lentamente progressiva desde a infância. Nesta família, foram encontradas duas variantes patogênicas previamente descritas, envolvendo a região C-terminal do gene *RYR1*: p.R4558Q no exon 94 (Kossugue *et al.*, 2007) e p.A4846V no exon 101 (Gambelli *et al.*, 2007). Estes resultados corroboram o padrão bialélico recessivo nesta família. Portanto, de acordo com os critérios utilizados, ambas variantes foram classificadas como de significado provavelmente patogênico.

O paciente P12 é um caso isolado, com consanguinidade presente nos genitores. Em concordância com este achado, encontramos a variante p.V4849I no exon 101 do gene *RYR1*, em homozigose. Esta variante foi previamente descrita como patogênica por Jungbluth (Jungbluth *et al.*, 2002), também em homozigose, em uma família com diagnóstico de MmD. Foi considerada patogênica com base nos achados de segregação (pais não afetados), e significância da localização da variante, afetando o domínio C-terminal da proteína que é altamente conservado e funcionalmente importante (Jungbluth *et al.*, 2002). Algoritmos de predição apontam impacto deletério (PolyPhen-2: *Probably damaging*; Mutation taster: *Disease causing*). Portanto, de acordo com os critérios utilizados, a variante foi classificada como de significado patogênico.

Os pacientes P13 e P14 são ambos casos isolados e não relacionados. Em ambos foi identificada a mutação p.R4861H no exon 101 do gene *RYR1*. Esta mutação já foi descrita como patogênica em heterozigose em diversos trabalhos realizados em pacientes com CCD (Monnier *et al.*, 2001; Reddy *et al.*, 2016). O fato de ter sido encontrada em dois dentre os 21 casos aqui estudados confirma que esta variante é realmente mais

frequente, como podemos verificar no banco de dados LOVD onde a variante foi reportada por 16 estudos diferentes. Portanto, de acordo com os critérios utilizados, a variante foi classificada como de significado patogênico.

O paciente P15, caso isolado na família, apresentou a variante p.R4861C, no exon 101 do gene *RYR1*. Esta mutação foi também encontrada no paciente P8, em um dos alelos, e foi previamente descrita por Davis em heterozigose, em paciente com CCD (Davis *et al.*, 2003). Esta mutação faz parte do grupo restrito de variantes recorrentes em CCD, tendo sido reportada em 12 trabalhos, segundo o banco de dados LOVD. Portanto, de acordo com os critérios utilizados, a variante foi classificada como de significado patogênico.

Todos os demais pacientes com variantes descritas (P16, P17, P18 e P20) apresentaram mutações únicas no gene *RYR1*, previamente descritas como patogênicas, em pelo menos um paciente com CCD (Monnier *et al.*, 2001; Davis *et al.*, 2003; Broman *et al.*, 2007; Kossugue *et al.*, 2007).

b) Identificação De Novas Variantes

Neste estudo, identificamos em pacientes brasileiros variantes não reportadas previamente na literatura. Para obtenção da possível patogenicidade das variantes, utilizamos informações de dados de frequência da variante em banco de dados; algoritmos de predição de impacto na estrutura da proteína e no processo de *splicing*; padrão de herança e características histopatológicas das famílias estudadas. Neste sentido, 4 variantes foram classificadas como possivelmente patogênicas (P2, P10, P11 e P20), 4 variantes foram classificadas como variantes de significado incerto (VUS) (P4, P5, P7 e P8), e uma, encontrada no paciente

P3, foi classificada como provavelmente benigna. Estudos adicionais seriam necessários para confirmação da patogenicidade das variantes.

A paciente P2, é portadora de duas variantes distintas, onde a primeira variante, p.R614C, foi previamente descrita por Gillard (Gillard *et al.*, 1991), foi relacionada a HM e está na lista de mutações patogênicas frequentes da *European Malignant Hypertemia Group* (www.emhg.org). Já a segunda variante p.H4979fs, é uma deleção de duas bases (GAGACT[CA/-]CACGCT) *frameshift* no exon 104 na região C-terminal da proteína RYR1, e não possui anotação de frequência em bancos de dados (gnomAD). Os algoritmos de predição sugeriram um impacto deletério, já que a variante pode levar à uma proteína truncada (HSF3.0: *Potential alteration of splicing*; Mutation taster: *Disease causing*), além do fato da variante se encontrar em um sítio de ligação da molécula de ATP p.4980 – p.4986 (Uniprot). Em suma, é uma variante rara que tira a proteína do quadro de leitura na principal região *hotspot* relacionada a CCD. Portanto, de acordo com os critérios utilizados, a variante foi classificada como de significado patogênico.

Considerando estes achados, a paciente apresenta um quadro clínico grave de CCD, necessitando de suporte ventilatório ao nascimento, atraso no desenvolvimento neuro-psicomotor nos dois primeiros anos de vida e aquisição da marcha depois dos 2 anos de idade. Com 11 anos, apresenta facie miopática, hipotonia grave e escoliose. A variante patogênica p.H4979fs por si só poderia justificar um quadro clínico de CCD, por estar localizada na região C-terminal da proteína e tirar a mesma do quadro de leitura. Por outro lado, a variante p.R614C evidencia a susceptibilidade para HM. Porém, estudos complementares seriam necessários para avaliar se a combinação das duas variantes presentes na paciente teria um efeito aditivo e por sua vez, esclarecer a apresentação de um quadro clínico mais grave.

O P3 possui a variante p.K1908R em heterozigose, localizada entre o domínio N-terminal e o domínio central. Esta variante não possui anotação de frequência em bancos de dados (gnomAD). Algoritmos desenvolvidos para prever o efeito de alterações missense na estrutura e função da proteína, indicam que a variante não causa impacto significativo na estrutura da proteína, já que o resíduo de Lisina aparentemente não é conservado (PolyPhen-2: *Benign*; *Mutation taster: polymorphism*). Em resumo, essa variante de sentido trocado, apresentou baixa frequência nos bancos de dados de indivíduos normais, mas sem predição de impacto deletério na função da proteína. Logo, de acordo com os critérios utilizados, a variante foi classificada como provavelmente benigna.

A paciente P4 apresentou duas variantes p.T2478N e p.L4568P em heterozigose composta, sendo que a segunda variante já foi previamente descrita por Wu (Wu *et al.*, 2006) em paciente com CCD com padrão de herança autossômico dominante. A variante p.T2478N, por sua vez, se encontra no domínio central da proteína e leva a uma troca no resíduo de Treonina que é moderadamente conservado. Essa variante está presente em bancos de dados populacionais em frequência muito baixa (rs141298868, gnomAD MAF:0,00002), mas não foi encontrada na literatura em pacientes com doença relacionada ao gene *RYR1*. Algoritmos de predição não concordam com o impacto potencial dessa alteração: PolyPhen-2: *Benign*; *Mutation taster: Disease causing*. Em resumo, essa variante é uma variante de sentido trocado, com impacto incerto na função da proteína. No entanto, as evidências disponíveis atualmente são insuficientes para provar de forma conclusiva sua patogenicidade. Portanto, de acordo com os critérios utilizados, a variante foi classificada como de significado incerto (VUS). De toda forma, a variante descrita p.L4568P seria suficiente para justificar o fenótipo desta paciente. A comparação clínica entre o paciente descrito com a nossa paciente, portadora de variantes nos dois

alelos, mostrou que a presença da segunda variante não parece agravar muito seu quadro clínico, uma vez que, atualmente, aos 35 anos de idade, apesar da fraqueza com dificuldades para realizar tarefas como subir escadas, leva vida normal, com capacidade de dirigir um carro normal, por exemplo.

O paciente P5, atualmente com 36 anos, apresenta um quadro de fraqueza moderada, com ptose palpebral. Neste paciente, foi identificada a variante p.I3253T em heterozigose. Esta variante leva a uma troca no resíduo de Isoleucina que é altamente conservado por uma Treonina. Essa variante está presente em bancos de dados populacionais em baixa frequência (rs375626634, gnomAD MAF:0,00003), mas não foi encontrada na literatura em indivíduos com doença relacionada ao gene *RYR1*. Algoritmos de predição apontaram impacto deletério (PolyPhen-2: *Probably damaging*; *Mutation taster: Disease causing*). Na biópsia muscular deste paciente observamos a predominância de fibras do tipo um e discreta falha de atividade oxidativa no interior da fibra muscular. Em resumo, essa variante é uma *missense* com baixa frequência e predição de impacto deletério na função da proteína, porém mesmo com essas evidências de acordo com os critérios utilizados, a variante foi classificada como de significado incerto (VUS).

A paciente P7, caso isolado na família, possui a variante p.M3757V em heterozigose. Essa variante se localiza no exon 79, entre a região central e C-terminal da proteína RYR1 e leva a uma troca no resíduo de Metionina que é altamente conservado por Valina. Essa variante está presente em bancos de dados populacionais em baixa frequência (rs375626634, gnomAD MAF:0,00004), algoritmos de predição apontaram impacto deletério (PolyPhen-2: *Probably damaging*; *Mutation taster: Disease causing*). Porém, mesmo com estas evidências e de acordo

com os critérios utilizados, a variante foi classificada como de significado incerto (VUS). Por outro lado a paciente, encaminhada com diagnóstico de CCD, foi avaliada aos 23 anos de idade, apresentando um quadro clínico miopático, com início aos 6 anos de idade, e piora aos 12-13 anos, perdendo a capacidade de correr. Atualmente, apresenta facie miopática, amiotrofia difusa, ptose palpebral e fraqueza facial e cervical. Uma segunda biópsia muscular realizada em outro Centro indicou a presença de fibras com núcleos grandes centralizados e imagens em roda de carroça, o que pode ser sugestivo de associação do quadro clínico com o fenótipo de CNM. A análise dos genes associados a CNM (*DNM2*, *MTM1*, e *BIN1*) permitiu a identificação da variante patogênica p.R522H no gene da *DNM2*, esta, já havia sido previamente descrita por Susman relacionada à CNM, evidenciando o fenótipo observado (Susman *et al.*, 2010). Este achado ressalta a sobreposição clínica entre diferentes formas de CM, tendo em vista que o paciente foi incluído no trabalho pela presença de Cores na biópsia muscular, o que por sua vez não invalida a possibilidade da variante no gene *RYR1* ter algum impacto sobre o fenótipo da paciente.

O P8 possui duas variantes p.A3774V e p.R4861C, formando heterozigose composta, sendo que a segunda variante foi descrita por Davis (Davis *et al.*, 2003) relacionada a CCD em heterozigose. A variante p.A3774V se encontra entre a região central e C-terminal da proteína e leva a uma troca no resíduo de Alanina que é altamente conservado. Essa variante está presente em bancos de dados populacionais em baixa frequência (rs146361173, gnomAD MAF:0,00002), mas não foi encontrada na literatura em pacientes com doença relacionada ao gene *RYR1*. A variante possui frequência de 0,56% (ABraOM) em 1200 sequenciamentos de pacientes brasileiros acima de 60 anos. Algoritmos de predição apontaram impacto deletério (PolyPhen-2: *Probably damaging*; *Mutation taster: Disease causing*). Em síntese, essa variante é uma

missense com baixa frequência e predição impacto deletério na função da proteína e não se encontra nos *hotspots* tipicamente estudados. No entanto, as evidências disponíveis atualmente são insuficientes para provar sua patogenicidade de forma conclusiva. Portanto, de acordo com os critérios utilizados, a variante foi classificada como de significado incerto (VUS). A variante patogênica p.R4861C foi previamente descrita em paciente com CCD e quadro de hipotonia neonatal, lordose, fraqueza facial e esquelética e andar com muletas aos 11 anos de idade (Quinlivan et al, 2003) e seria suficiente para justificar o fenótipo da paciente aqui descrita. Entretanto, a paciente P8 apresenta um quadro clínico muito grave, não desenvolvendo a marcha pelo menos até os cinco anos de idade. Nasceu hipotônica, com luxação congênita do quadril, e apresentou deficiência respiratória grave no período neonatal. Além disso, apresentou achado histopatológico excepcional que consiste na associação de Cores a um quadro histopatológico altamente distrófico. A presença das duas mutações poderiam justificar este quadro clínico mais grave nesta paciente. Porém, estudos complementares seriam necessários para confirmação.

A paciente P10 pertence a uma família com vários afetados segregando em padrão de herança autossômico dominante, visto que a mãe e o irmão também são afetados por CCD. Aos 11 anos de idade, apresenta dificuldades para se levantar do chão e não pula. Ao nascimento apresentou problemas para se alimentar e ficou internada em UTI por dois meses, chegando a apresentar parada cardíaca. A mãe afetada apresenta fraqueza e dificuldades motoras para correr e se levantar do chão desde a infância. A variante identificada p.H4651R no exon 95 se localiza na região C-terminal da proteína, e não foi encontrada em 71702 genomas presentes em bancos de dados internacionais (gnomAD). Algoritmos de predição apontaram para um impacto deletério (PolyPhen-2: *Probably damaging*; Mutation taster: *Disease causing*). Uma variante envolvendo o

mesmo códon, p.H4651P foi previamente descrita por Davis (Davis *et al.*, 2003) em um paciente esporádico, com diagnóstico de CCD, sugerindo a importância da preservação deste aminoácido nesta posição da proteína. Portanto, de acordo com os critérios utilizados, a variante foi classificada como de significado possivelmente patogênico.

O paciente P11 apresentou quadro clínico moderado, com início da marcha aos 1,2 anos. A biópsia realizada aos 3 anos de idade (Fig. 5). Aos 9 anos de idade, apresentou fãcie com padrão levemente miopático, anda com dificuldade na ponta dos pés e calcanhares, não pula, tem frouxidão ligamentar, hipotonia global e hiperlordose lombar. Eleva os braços até o alto, mas tem fraqueza proximal dos membros superiores e fraqueza cervical. Levanta do chão com Gowers típico. Na biópsia muscular, observamos a predominância de fibras do tipo 1, em NADH, 84% das fibras apresentaram Cores grandes, únicos, na maioria, estruturados, e tanto em posição central como periférica. Neste paciente, identificamos a variante p.H4804P que se encontra em heterozigose no domínio C-terminal da proteína e não possui anotação de frequência em bancos de dados (gnomAD). Algoritmos de predição apontaram impacto deletério (PolyPhen-2: *Probably damaging*; Mutation taster: *Disease causing*). Em resumo, essa variante é uma missense com baixa frequência e predição de impacto deletério na função da proteína, com essas evidências e de acordo com os critérios utilizados, a variante foi classificada como de significado possivelmente patogênico.

A paciente P19, uma criança de cinco anos, que nasceu com luxação congênita do quadril, ficou imobilizada por longo período, e iniciou a marcha com 2,4 anos. Apresenta lordose lombar acentuada, dificuldades em correr, pular, subir escadas, andando com certa dificuldade. Além disso, a criança apresenta baixa estatura, escleróticas azuladas, discreto estrabismo e grande hiperextensibilidade articular. A mãe relata fraqueza

muscular desde a infância, porém com quadro mais leve do que na filha. Esta paciente, por sua vez, possui duas variantes p.F4921L e p.R4914M. Entretanto, o estudo de segregação mostrou que as duas variantes se encontram em cis. A primeira variante p.F4921L, foi recentemente descrita em heterozigose, em um paciente com CCD (Todd *et al.*, 2018). Uma variante envolvendo este mesmo códon já havia sido também descrita por Wu (Wu *et al.*, 2006) em paciente com e quadro clínico típico de CCD, apresentando os sintomas na primeira infância, atraso no desenvolvimento motor, fraqueza muscular proximal, lordose e histopatologia com presença de Cores em quase todas as fibras afetadas. Portanto, está variante por si só poderia justificar o quadro clínico observado na família. A segunda variante p.R4914M, não possui anotação de frequência em bancos de dados (gnomAD). Algoritmos de predição apontaram impacto deletério (PolyPhen-2: *Probably damaging*; Mutationtaster: *Disease causing*). Adicionalmente, duas variantes diferentes no mesmo códon já foram descritas em pacientes com CCD: p. R4914T e p.R4914G (Davis *et al.*, 2003). Em resumo, esta variante p.R4914M é uma variante missense com baixa frequência e provável impacto deletério na função da proteína e de acordo com os critérios utilizados, a variante foi classificada como de significado possivelmente patogênico, e, portanto, poderia contribuir para o quadro clínico dos pacientes desta família.

c) Pacientes não conclusivos

No paciente P3, foi encontrada a variante missense p.K1908R no exon 35, com baixa frequência na população normal, mas sem predição de impacto deletério na função da proteína. Logo, de acordo com os critérios utilizados, a variante foi classificada como provavelmente benigna. Porém, não poderia deixar de ser reportada, já que se trata de uma variante com

baixa frequência e os achados de biópsia muscular deste paciente são compatíveis com falhas de atividade oxidativa em algumas fibras (Fig. 5).

No paciente P21 não foi encontrada variante possivelmente patogênica no gene *RYR1*. Estudos complementares poderiam tentar identificar algum CNV no gene *RYR1* que justificariam fenótipo do paciente. Além disso, variantes em outros genes que resultam em Miopatias Congênitas foram verificadas. Dentre estes, o gene *SEPN1* que resulta em RSMD1 e tem sobreposição clínica com MmD, mesmo assim não foram encontradas variantes que justificassem o fenótipo observado. Este dado nos leva acreditar que possam existir mutações em outros genes ainda não identificados que podem levar a CCD ou alguma miopatia com sobreposição fenótipo (Ferreiro *et al.*, 2002).

d) Variantes Bialélicas

Considerando que 6 das 21 famílias aqui estudadas apresentaram variantes bialélicas, (cinco em heterozigose composta e uma em homozigose), a frequência dos casos de CCD com herança autossômica recessiva em nossa amostra foi estimada em cerca de 28%.

A forma clássica de CCD apresenta padrão de herança autossômico dominante, entretanto, há diversos relatos na literatura de pacientes com padrão de herança autossômico recessivo, que podem apresentar um fenótipo mais grave (Jungbluth *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2006; Kossugue *et al.*, 2007; Garibaldi *et al.*, 2019). Atualmente, com a introdução de técnicas moleculares mais precisas, é de se esperar que aumente a capacidade de identificação de variantes no gene *RYR1*, de modo geral, e de casos com variantes bialélicas, em particular. De fato, em trabalhos recentes que utilizam NSG para estudo do gene *RYR1*, como o de Todd e colaboradores

onde 25% dos pacientes apresentaram heterozigose composta neste gene (Todd *et al.*, 2018).

No presente estudo, dentre os seis pacientes que apresentaram heterozigose composta, cinco continham uma das variantes na região C-terminal do gene, compatíveis com o diagnóstico de CCD.

Estudos complementares são importantes para definir o impacto de uma segunda variante em casos em que a primeira foi previamente definida como patogênica quando identificada em heterozigose composta.

e) Efeito Das Variantes Nos Diferentes Domínios Da Proteína

Dentre as 24 variantes encontradas em nossos pacientes, pelo menos 17 estão localizadas no domínio C-terminal da proteína, o que é compatível com o descrito na literatura. Diversos trabalhos descreveram que variantes nesta região foram associadas com achados clínicos e patológicos mais graves, como hipotonia na infância, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, e fraqueza muscular. Além disso, nestes casos, a biópsia geralmente apresenta Cores grandes e estruturados em grande parte das fibras.

Por outro lado, pacientes com variantes em outros domínios da proteína geralmente apresentam quadro clínico mais leve. Isto pode ser devido ao modelo de funcionamento do canal de cálcio. Mutações nos domínios mais iniciais ou centrais da proteína teriam como efeito o vazamento de íons Ca^{2+} do SR, resultando na elevação destes íons cálcio citosólico em situações de repouso, levando ao esgotamento das reservas de Ca^{2+} no retículo. Entretanto, mutações no domínio C-terminal de RYR1 afetariam as propriedades de bloqueio do canal, resultando em defeitos na abertura do poro (Lynch *et al.*, 1999; Avila *et al.*, 2003; Lyfenko *et al.*,

2004). Isso pode explicar o motivo de mutações na região C-terminal estarem mais associadas ao fenotipo defraqueza muscular.

f) Achados Histopatológicos

Em relação as biópsias que tivemos acesso neste trabalho, podemos observar que ocorre uma certa variabilidade nos achados histopatológicos quanto ao padrão dos Cores, embora um padrão típico de Cores únicos e bem estruturados em praticamente todas as fibras tenham sido encontrado somente em pacientes com pelo menos uma mutação na região C-terminal da proteína (P4, P8, P11 e P13). Por outro lado, 2 pacientes com variantes nesta região apresentaram Cores variados e poucos estruturados (P12 e P18), sugerindo que não é um padrão único.

Em suma, os resultados obtidos neste estudo são de grande importância para identificar o padrão de herança de cada caso e realizar o aconselhamento genético da família de forma correta, uma vez que as mutações no gene *RYR1* estão relacionadas a suscetibilidade à Hipertermia Maligna, estas famílias precisam ser alertadas quanto ao uso de anestésicos voláteis como Halotano.

VI. Conclusões

Neste estudo, foram avaliadas 21 famílias de pacientes com diagnóstico de CCD, sendo que identificamos variantes no gene *RYR1* em 20 famílias, e conseguimos confirmar o defeito molecular em 16 delas.

A maioria destas variantes (23/24) são de sentido trocado, e únicas nas famílias. Duas variantes foram recorrentes em duas famílias.

Identificamos seis famílias (cinco não consanguíneas) com variantes bialélicas, resultando em 28% dos casos com possível padrão de herança AR.

Identificamos nove variantes não descritas na literatura, sendo cinco delas classificadas como possivelmente patogênicas.

Identificamos uma família com duas mutações no exon 102, segregando em cis, sugerindo um efeito aditivo de duas variantes patogênicas em um mesmo alelo.

Este trabalho ressalta a importância da utilização da tecnologia de Sequenciamento de Nova Geração para diagnóstico de doenças genéticas, e seu impacto na melhoria do aconselhamento genético adequado de famílias que possuem doenças genéticas raras e que ainda necessitam de estudos para serem melhor compreendidas.

Resumo

A miopatia de Central Core (CCD) é uma doença neuromuscular hereditária, caracterizada pela presença de “Cores” nas fibras musculares. Clinicamente, os o início dos sintomas nos pacientes é perinatal, com hipotonia, atrofia muscular, hiporreflexia e atraso no desenvolvimento motor. A CCD é causada predominantemente por mutações no gene *RYR1*. Este gene codifica o receptor de ryanodina, que é um canal de liberação de cálcio intracelular do retículo sarcoplasmático para o citosol, em resposta a despolarização da membrana plasmática. Mutações nesse gene estão também associadas a suscetibilidade a Hipertermia Maligna (MHS).

O objetivo deste trabalho consistiu em realizar estudo molecular para identificação de mutações primárias em pacientes com quadro clínico e histológico CCD, para diagnóstico e aconselhamento genético da família.

Foram avaliadas 21 famílias com pacientes CCD, e identificamos variantes no gene *RYR1* em 20 famílias. Foi possível confirmar a patogenicidade molecular em 16 delas. A maioria destas variantes (23/24) são de sentido trocado, e únicas nas famílias. Duas mutações foram recorrentes em duas famílias. Identificamos 6 famílias (5 não consanguíneas) com variantes bialelicas resultando em 28% dos casos com possível herança AR. Identificamos 9 variantes não descritas na literatura, sendo cinco delas de significado patogênico. Identificamos uma família com duas mutações no exon 102, segregando em cis, sugerindo um efeito aditivo de duas mutações em um mesmo alelo.

Este trabalho ressalta a importância da utilização da tecnologia de Sequenciamento de Nova Geração para o diagnóstico de doenças genéticas, e seu impacto na melhoria do aconselhamento genético adequado de famílias que possuem doenças genéticas raras e que ainda necessitam de estudos para serem melhor compreendidas

Abstract

Central Core myopathy is an inherited neuromuscular disease, characterized by the presence of Cores in muscle biopsy. The Clinical manifestation of symptoms is perinatal. Patients present hypotonia, muscle atrophy, hyporeflexia, and delayed motor development. CCD is predominantly caused by mutations in the *RYR1* gene. This gene encodes the ryanodine receptor 1, which is an intracellular calcium release channel from the sarcoplasmic reticulum to the cytosol, in response to depolarization of the plasma membrane. Mutations in this gene are also associated with Malignant Hyperthermia susceptibility (MHS).

The objective of this work was to carry out a molecular study to identify primary mutations in patients with clinical and histological characteristics of CCD, for diagnosis and genetic counseling of the family.

We evaluated 21 families with CCD patients and identified *RYR1* gene variants in 20 families. It was possible to confirm molecular pathogenicity in 16 of them. Most of these variants (23/24) are missenses and unique in families. Two variants were recurrent in two different families. We identified six families with biallelic mutations, five non-consanguineous, resulting in 28% of cases with possible AR inheritance. We identified nine variants not described in the literature, which five of them were classified as pathogenic. We identified a family with two mutations in exon 102, segregating in cis, suggesting an additive effect of two mutations in the same allele.

This work highlights the importance of using New Generation Sequencing technologies for the diagnosis of genetic diseases and their impact on improving adequate genetic counseling for families that have rare genetic diseases, and that still need studies complementary to elucidate them.

VII. Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, C. F.; MARTINS, P. C.; VAINZOF, M. Comparative transcriptome analysis of muscular dystrophy models Large(myd), Dmd(mdx)/Large(myd) and Dmd(mdx): what makes them different? **Eur J Hum Genet**, v. 24, n. 9, p. 1301-9, Aug 2016. ISSN 1018-4813. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2016.16> >.
- AVILA, G. et al. FKBP12 binding to RyR1 modulates excitation-contraction coupling in mouse skeletal myotubes. **J Biol Chem**, v. 278, n. 25, p. 22600-8, Jun 20 2003. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M205866200> >.
- BENTZINGER, C. F.; WANG, Y. X.; RUDNICKI, M. A. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 4, n. 2, Feb 1 2012. ISSN 1943-0264. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a008342> >.
- BERCHTOLD, M. W.; BRINKMEIER, H.; MUNTENER, M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. **Physiol Rev**, v. 80, n. 3, p. 1215-65, Jul 2000. ISSN 0031-9333 (Print)0031-9333. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.2000.80.3.1215> >.
- BHARUCHA-GOEBEL, D. X. et al. Severe congenital RYR1-associated myopathy: the expanding clinicopathologic and genetic spectrum. **Neurology**, v. 80, n. 17, p. 1584-9, Apr 23 2013. ISSN 0028-3878. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182900380> >.
- BITOUN, M. et al. Dynamin 2 mutations cause sporadic centronuclear myopathy with neonatal onset. **Ann Neurol**, v. 62, n. 6, p. 666-70, Dec 2007. ISSN 0364-5134. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1002/ana.21235> >.
- BRANDOM, B. W. et al. Ryanodine receptor type 1 gene variants in the malignant hyperthermia-susceptible population of the United States. **Anesth Analg**, v. 116, n. 5, p. 1078-86, May 2013. ISSN 0003-2999. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1213/ANE.0b013e31828a71ff> >.
- BROMAN, M. et al. Malignant hyperthermia and central core disease causative mutations in Swedish patients. **Acta Anaesthesiol Scand**, v. 51, n. 1, p. 50-3, Jan 2007. ISSN 0001-5172 (Print)0001-5172. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-6576.2006.01165.x> >.
- CASSANDRINI, D. et al. Congenital myopathies: clinical phenotypes and new diagnostic tools. **Ital J Pediatr**, v. 43, n. 1, p. 101, Nov 15 2017. ISSN 1720-8424. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1186/s13052-017-0419-z> >.

COLOMBO, I. et al. Congenital myopathies: Natural history of a large pediatric cohort. **Neurology**, v. 84, n. 1, p. 28-35, Jan 6 2015. ISSN 0028-3878. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1212/wnl.0000000000001110> >.

CONBOY, I. M.; RANDO, T. A. Heterochronic parabiosis for the study of the effects of aging on stem cells and their niches. **Cell Cycle**, v. 11, n. 12, p. 2260-7, Jun 15 2012. ISSN 1551-4005. Available at: < <http://dx.doi.org/10.4161/cc.20437> >.

COTTA, A. et al. Central core myopathy with autophagy. **Muscle Nerve**, v. 56, n. 2, p. E8-e9, Aug 2017. ISSN 0148-639x. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1002/mus.25594> >.

DAVIS, M. R. et al. Principal mutation hotspot for central core disease and related myopathies in the C-terminal transmembrane region of the RYR1 gene. **Neuromuscul Disord**, v. 13, n. 2, p. 151-7, Feb 2003. ISSN 0960-8966 (Print)0960-8966. Available at: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8966\(02\)00218-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8966(02)00218-3) >.

EFTHYMIOU, S.; MANOLE, A.; HOULDEN, H. Next-generation sequencing in neuromuscular diseases. **Curr Opin Neurol**, v. 29, n. 5, p. 527-36, Oct 2016. ISSN 1350-7540. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1097/wco.0000000000000374> >.

FATTORI, F. et al. Centronuclear myopathies: genotype-phenotype correlation and frequency of defined genetic forms in an Italian cohort. **J Neurol**, v. 262, n. 7, p. 1728-40, Jul 2015. ISSN 0340-5354. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00415-015-7757-9> >.

FERREIRO, A. et al. Mutations of the selenoprotein N gene, which is implicated in rigid spine muscular dystrophy, cause the classical phenotype of multimimicore disease: reassessing the nosology of early-onset myopathies. **Am J Hum Genet**, v. 71, n. 4, p. 739-49, Oct 2002. ISSN 0002-9297 (Print)0002-9297. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1086/342719> >.

GAMBELLI, S. et al. Inheritance of a novel RYR1 mutation in a family with myotonic dystrophy type 1. In: (Ed.). **Clin Genet**. Denmark, v.71, 2007. p.93-4. ISBN 0009-9163 (Print)0009-9163 (Linking).

GARIBALDI, M. et al. 'Dusty core disease' (DuCD): expanding morphological spectrum of RYR1 recessive myopathies. In: (Ed.). **Acta Neuropathol Commun**, v.7, 2019. ISBN 2051-5960 (Electronic).

GEEVES, M. A.; HOLMES, K. C. Structural mechanism of muscle contraction. **Annu Rev Biochem**, v. 68, p. 687-728, 1999. ISSN 0066-4154 (Print)0066-4154. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.687> >.

GILLARD, E. F. et al. A substitution of cysteine for arginine 614 in the ryanodine receptor is potentially causative of human malignant hyperthermia. **Genomics**, v. 11, n. 3, p. 751-5, Nov 1991. ISSN 0888-7543 (Print)0888-7543. Available at: < [http://dx.doi.org/10.1016/0888-7543\(91\)90084-r](http://dx.doi.org/10.1016/0888-7543(91)90084-r) >.

HOPKINS, P. M. et al. European Malignant Hyperthermia Group guidelines for investigation of malignant hyperthermia susceptibility. **Br J Anaesth**, v. 115, n. 4, p. 531-9, Oct 2015. ISSN 0007-0912. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1093/bja/aev225> >.

JUNGBLUTH, H. Central core disease. **Orphanet J Rare Dis**, v. 2, p. 25, May 15 2007a. ISSN 1750-1172. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1186/1750-1172-2-25> >.

_____. Multi-minicore Disease. **Orphanet J Rare Dis**, v. 2, p. 31, Jul 13 2007b. ISSN 1750-1172. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1186/1750-1172-2-31> >.

JUNGBLUTH, H. et al. Autosomal recessive inheritance of RYR1 mutations in a congenital myopathy with cores. **Neurology**, v. 59, n. 2, p. 284-7, Jul 23 2002. ISSN 0028-3878 (Print)0028-3878. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1212/wnl.59.2.284> >.

JUNGBLUTH, H.; VOERMANS, N. C. Congenital myopathies: not only a paediatric topic. **Curr Opin Neurol**, v. 29, n. 5, p. 642-50, Oct 2016. ISSN 1350-7540. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1097/wco.0000000000000372> >.

JUNGBLUTH, H. et al. Minicore myopathy with ophthalmoplegia caused by mutations in the ryanodine receptor type 1 gene. **Neurology**, v. 65, n. 12, p. 1930-5, Dec 27 2005. ISSN 0028-3878. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1212/01.wnl.0000188870.37076.f2> >.

KLEIN, A. et al. Muscle magnetic resonance imaging in congenital myopathies due to ryanodine receptor type 1 gene mutations. **Arch Neurol**, v. 68, n. 9, p. 1171-9, Sep 2011. ISSN 0003-9942. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1001/archneurol.2011.188> >.

KOSSUGUE, P. M. et al. Central core disease due to recessive mutations in RYR1 gene: is it more common than described? **Muscle Nerve**, v. 35, n. 5, p. 670-4, May 2007. ISSN 0148-639X (Print)0148-639x. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1002/mus.20715> >.

LAVER, D. R. Regulation of the RyR channel gating by Ca(2+) and Mg(2). **Biophys Rev**, v. 10, n. 4, p. 1087-1095, Aug 2018. ISSN 1867-2450 (Print)1867-2450. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12551-018-0433-4> >.

LAWAL, T. A.; TODD, J. J.; MEILLEUR, K. G. Ryanodine Receptor 1-Related Myopathies: Diagnostic and Therapeutic Approaches. **Neurotherapeutics**, v. 15, n. 4, p. 885-899, Oct 2018. ISSN 1878-7479. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1007/s13311-018-00677-1> >.

LOSETH, S. et al. A novel late-onset axial myopathy associated with mutations in the skeletal muscle ryanodine receptor (RYR1) gene. **J Neurol**, v. 260, n. 6, p. 1504-10, Jun 2013. ISSN 0340-5354. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00415-012-6817-7> >.

LYFENKO, A. D.; GOONASEKERA, S. A.; DIRKSEN, R. T. Dynamic alterations in myoplasmic Ca²⁺ in malignant hyperthermia and central core disease. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 322, n. 4, p. 1256-66, Oct 1 2004. ISSN 0006-291X (Print)0006-291x. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.031> >.

LYNCH, P. J. et al. A mutation in the transmembrane/luminal domain of the ryanodine receptor is associated with abnormal Ca²⁺ release channel function and severe central core disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 7, p. 4164-9, Mar 30 1999. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.7.4164> >.

MALICDAN, M. C. V.; NISHINO, I. Central Core Disease. 2014/12/04 2014. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> >.

MARDIS, E. R. Next-generation sequencing platforms. **Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)**, v. 6, p. 287-303, 2013. ISSN 1936-1327. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-anchem-062012-092628> >.

MONNIER, N. et al. Familial and sporadic forms of central core disease are associated with mutations in the C-terminal domain of the skeletal muscle ryanodine receptor. **Hum Mol Genet**, v. 10, n. 22, p. 2581-92, Oct 15 2001. ISSN 0964-6906 (Print)0964-6906. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/10.22.2581> >.

MULLIS, K. et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 51 Pt 1, p. 263-73, 1986. ISSN 0091-7451 (Print)0091-7451. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032> >.

NANCE, J. R. et al. Congenital Myopathies: An Update. **Curr Neurol Neurosci Rep**, v. 12, n. 2, p. 165-74, Apr 2012. ISSN 1528-4042 (Print)1534-6293 (Electronic). Available at: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11910-012-0255-x> >.

NORTH, K. N.; RYAN, M. M. Nemaline Myopathy. 2015/06/11 2015. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> >.

NORTH, K. N. et al. Approach to the diagnosis of congenital myopathies. **Neuromuscul Disord**, v. 24, n. 2, p. 97-116, Feb 2014. ISSN 0960-8966. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2013.11.003> >.

POLZ, M. F.; CAVANAUGH, C. M. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. **Appl Environ Microbiol**, v. 64, n. 10, p. 3724-30, Oct 1998. ISSN 0099-2240 (Print)0099-2240. Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

RICHARDS, S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genet Med**, v. 17, n. 5, p. 405-24, May 2015. ISSN 1098-3600. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1038/gim.2015.30> >.

ROMERO, N. B.; BITOUN, M. Centronuclear myopathies. **Semin Pediatr Neurol**, v. 18, n. 4, p. 250-6, Dec 2011. ISSN 1071-9091. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.spen.2011.10.006> >.

ROMERO, N. B.; CLARKE, N. F. Congenital myopathies. **Handb Clin Neurol**, v. 113, p. 1321-36, 2013. ISSN 0072-9752 (Print)0072-9752. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-444-59565-2.00004-6> >.

ROMERO, N. B. et al. Dominant and recessive central core disease associated with RYR1 mutations and fetal akinesia. **Brain**, v. 126, n. Pt 11, p. 2341-9, Nov 2003. ISSN 0006-8950 (Print)0006-8950. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awg244> >.

ROMERO, N. B.; SANDARADURA, S. A.; CLARKE, N. F. Recent advances in nemaline myopathy. **Curr Opin Neurol**, v. 26, n. 5, p. 519-26, Oct 2013. ISSN 1350-7540. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1097/WCO.0b013e328364d681> >.

RYAN, M. M. et al. Nemaline myopathy: a clinical study of 143 cases. **Ann Neurol**, v. 50, n. 3, p. 312-20, Sep 2001. ISSN 0364-5134 (Print)0364-5134. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1002/ana.1080> >.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 12, p. 5463-7, Dec 1977. ISSN 0027-8424 (Print)1091-6490 (Electronic). Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

SATO, I. et al. Congenital neuromuscular disease with uniform type 1 fiber and RYR1 mutation. **Neurology**, v. 70, n. 2, p. 114-22, Jan 8 2008. ISSN 0028-3878. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1212/01.wnl.0000269792.63927.86> >.

SAVARESE, M. et al. Novel findings associated with MTM1 suggest a higher number of female symptomatic carriers. **Neuromuscul Disord**, v. 26, n. 4-5, p. 292-9, Apr-May 2016. ISSN 0960-8966. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2016.02.004> >.

SHOKRALLA, S. et al. Next-generation DNA barcoding: using next-generation sequencing to enhance and accelerate DNA barcode capture from single specimens. **Mol Ecol Resour**, v. 14, n. 5, p. 892-901, Sep 2014. ISSN 1755-098X (Print)1755-0998 (Electronic). Available at: < <http://dx.doi.org/10.1111/1755-0998.12236> >.

SMITH, L. M. et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. **Nature**, v. 321, n. 6071, p. 674-9, Jun 12-18 1986. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1038/321674a0> >.

SPIRO, A. J.; SHY, G. M.; GONATAS, N. K. Myotubular myopathy. Persistence of fetal muscle in an adolescent boy. **Arch Neurol**, v. 14, n. 1, p. 1-14, Jan 1966. ISSN 0003-9942 (Print)0003-9942. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1001/archneur.1966.00470070005001> >.

STANFIELD, W. J. G. C. L. **Principles of Human Physiology**. 2017. Available at: <

https://books.google.com/books/about/Principles_of_Human_Physiology.html?hl=pt-BR&id=jDUEAAAACAAJ >.

SUSMAN, R. D. et al. Expanding the clinical, pathological and MRI phenotype of DNM2-related centronuclear myopathy. **Neuromuscul Disord**, v. 20, n. 4, p. 229-37, Apr 2010. ISSN 0960-8966. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2010.02.016> >.

SWEENEY, H. L.; HAMMERS, D. W. Muscle Contraction. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 10, n. 2, Feb 1 2018. ISSN 1943-0264. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a023200> >.

TAJBAKHS, S. Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis. **J Intern Med**, v. 266, n. 4, p. 372-89, Oct 2009. ISSN 0954-6820. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2796.2009.02158.x> >.

TAKESHIMA, H. et al. Excitation-contraction uncoupling and muscular degeneration in mice lacking functional skeletal muscle ryanodine-receptor gene. **Nature**, v. 369, n. 6481, p. 556-9, Jun 16 1994. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1038/369556a0> >.

TODD, J. J. et al. Correlation of phenotype with genotype and protein structure in RYR1-related disorders. **J Neurol**, v. 265, n. 11, p. 2506-2524, Nov 2018. ISSN 0340-5354. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00415-018-9033-2> >.

TUBRIDY, N.; FONTAINE, B.; EYMARD, B. Congenital myopathies and congenital muscular dystrophies. **Curr Opin Neurol**, v. 14, n. 5, p. 575-82, Oct 2001. ISSN 1350-7540 (Print)1350-7540. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1097/00019052-200110000-00005> >.

VAINZOF, M. et al. Protein defects in neuromuscular diseases. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 5, p. 543-555, 05/2003 2003. ISSN 0100-879X. Available at: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0100-879X2003000500001&lng=en&nrm=iso&tlng=en >. Available at: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2003000500001&lng=en&nrm=iso&tlng=en >. Available at: < <http://www.scielo.br/pdf/bjmr/v36n5/4779.pdf> >.

WALLGREN-PETTERSSON, C.; LAING, N. G. Report of the 70th ENMC International Workshop: nemaline myopathy, 11-13 June 1999, Naarden, The Netherlands. In: (Ed.). **Neuromuscul Disord**. England, v.10, 2000. p.299-306. ISBN 0960-8966 (Print)0960-8966 (Linking).

WARD, D. G. et al. Multiplex PCR and Next Generation Sequencing for the Non-Invasive Detection of Bladder Cancer. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0149756, 2016. ISSN 1932-6203. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0149756> >.

WILMSHURST, J. M. et al. RYR1 mutations are a common cause of congenital myopathies with central nuclei. **Ann Neurol**, v. 68, n. 5, p. 717-26, Nov 2010. ISSN 0364-5134. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1002/ana.22119> >.

WU, S. et al. Central core disease is due to RYR1 mutations in more than 90% of patients. **Brain**, v. 129, n. Pt 6, p. 1470-80, Jun 2006. ISSN 0006-8950. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awl077> >.

ZHOU, H. et al. Molecular mechanisms and phenotypic variation in RYR1-related congenital myopathies. **Brain**, v. 130, n. Pt 8, p. 2024-36, Aug 2007. ISSN 0006-8950. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awm096> >.

Biografia

Leonardo Galleni Leão da Silva, bacharel em Biomedicina pela Universidade Anhembi Morumbi (UAM). Atualmente cursando mestrando na área de Genética no Laboratório de Proteínas Musculares e Histopatologia Comparada do Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-tronco (CEGH-CEL) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP). Possui experiência na área de Genética, com ênfase em Estudo de Proteínas e Desenvolvimento Muscular, atuando principalmente nos seguintes temas: Distrofias Musculares Progressivas, Miopatias Congênitas e estudo do potencial miogênico de células tronco embrionárias e adultas em modelos murinos para doenças neuromusculares.

Lista de Trabalhos Publicados:

COTTA, A. et al. Central core myopathy with autophagy. **Muscle Nerve**, v. 56, n. 2, p. E8-e9, Aug 2017. ISSN 0148-639x. Available at: <<http://dx.doi.org/10.1002/mus.25594>>.

DUCCI, R. D. et al. Immune-mediated rippling muscle disease in a patient with treated hypothyroidism. **J Neurol Sci**, v. 383, p. 53-55, Dec 15 2017. ISSN 0022-510x. Available at: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2017.10.016>>.

SANTOS, J. M. et al. Idiopathic hyperCKemia and malignant hyperthermia susceptibility. **Can J Anaesth**, v. 64, n. 12, p. 1202-1210, Dec 2017. ISSN 0832-610x. Available at: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12630-017-0978-x>>.

GURGEL-GIANNETTI, J. et al. A novel complex neurological phenotype due to a homozygous mutation in FDX2. **Brain**, v. 141, n. 8, p. 2289-2298, 2019. ISSN 0006-8950. Available at: <<https://academic.oup.com/brain/article-pdf/141/8/2289/25219719/awy172.pdf>>.