Lucas Santos e Souza

**Miopatia miotubular: diagnóstico molecular e
aconselhamento genético em famílias Brasileiras**

Myotubular myopathy: molecular diagnosis and genetic counselling in
Brazilian families

São Paulo

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Lucas Santos e Souza

**Miopatia miotubular: diagnóstico molecular e
aconselhamento genético em famílias Brasileiras**

Myotubular myopathy: molecular diagnosis and genetic counselling in
Brazilian families

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Aconselhamento Genético e Genômica Humana do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mariz Vainzof

São Paulo
2018

Ficha Catalográfica

Santos e Souza, Lucas

Miopatia miotubular: diagnóstico molecular e aconselhamento genético em famílias brasileiras / Lucas Santos e Souza; orientadora Mariz Vainzof - São Paulo, 2018.

53 f.

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

1. Miopatia miotubular. 2. Heterozigotas manifestantes. 3. Sequenciamento de nova geração. 4. Aconselhamento genético.

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

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

Orientador(a)

Dedicatória

A meus pais, Gilséa e Agostinho

Agradecimentos

Agradeço enormemente à Prof^a Mariz Vainzof pela orientação e pela confiança depositados em mim desde o meu primeiro momento como aluno da Universidade de São Paulo. Todos os frutos que este trabalho tem me fornecido só foram possíveis graças aos conhecimentos da academia e da vida que tenho recebido de você!

Agradeço, com o peito cheio de carinho, aos meus amigos do LabProt, André, Antônio, Camis, Dani, Lê, Léo, Paula, Renata, Sir, Ster e Yumi, que se tornaram a minha família em São Paulo, e que foram essenciais para que esse trabalho fosse construído dia após dia. Agradeço especialmente a Lê, que me recebeu de braços abertos, e que com paciência e dedicação, me ajudou a dar os primeiros passos dentro do laboratório. E por todos os momentos de descontração, risadas, zoeiras, discussões sobre assuntos banais e companheirismo. Você é uma amiga demais; A Camis, responsável por me introduzir ao tema deste trabalho, e que foi (e é) como uma segunda orientadora dentro do laboratório. Agradeço pelas conversas, pelos abraços, pelos momentos de risada, e por me permitir que, do seu jeitinho, eu encontrasse uma amiga que adoro. Ao Léo, que dentro dessa família é como um irmão. Agradeço por toda ajuda nas coisas do laboratório e da academia, ajuda que sempre vem de prontidão, dedicação e carinho. Agradeço também por ser essa pessoa ótima, que todos nós adoramos ser amigos. A Ster, de quem morro de saudades, por toda a ajuda e orientação nos trabalhos do laboratório sempre que precisei. Poucos têm a honra de poder trabalhar com alguém tão inteligente e dedicada, e que nos contagia. Agradeço pelas conversas e companhia de cantoria de músicas ruins. A Yumi, que com sua pequena grande presença, fez os dias do laboratório serem sempre melhores e memoráveis com seu alto astral e humor. Agradeço, também pelos momentos fora do laboratório, e que foram loucamente divertidos. Ao Antônio, sempre disposto a ajudar a quem precisa, pela primeira companhia no bandeirão, e pelos cotidianos momentos de descontração e diversão. A Sir, que chegou de mansinho, mas que logo se mostrou uma verdadeira integrante da família LabProt. Agradeço pela ajuda no laboratório, e por ser a fonte de informação sobre o que/quem acontece na USP! Vocês são sensacionais!

Agradeço os professores e professoras do programa de aconselhamento genético e genômica humana, os responsáveis por transmitir o conhecimento que seria necessário para que estivesse preparado para apresentar e defender o meu trabalho. A dedicação e qualidade

do trabalho de vocês é inspirável. Em especial, agradeço ao Professor Paulo Otto, pela colaboração e orientação no estudo da penetrância, que muito enriqueceu este trabalho!

Agradeço a Sílvia, pela ajuda nas análises de inativação do X!

Agradeço aos profissionais do Centro de Pesquisas do Genoma Humano, sem os quais não teríamos esse ambiente ideal para fazermos os nossos trabalhos!

Agradeço aos pacientes e famílias do Genoma, que me permitiram estar presente em momentos em que sua intimidade estaria exposta, mas que seriam essenciais para que a minha formação em aconselhamento genético!

Agradeço a minha outra família, essa de Belo Horizonte, que está comigo desde 2011, me apoiando, incentivando, e sendo os melhores amigos que alguém poderia ter: Ari, Arthur, Brenda, Bruno, Fernanda, Humberto, Júlia, Lívia, Mari, Mateus, Paloma e Vanessa! Amo vocês!

Agradeço a minha família, que sempre me apoiou e me deu a inspiração para fazer o que faço hoje!

Agradeço, de forma que palavras não podem medir, a minha mãe, meu pai e meu irmão, por serem o meu núcleo e por serem as pessoas que mais me apoiam, incentivam e me fazem sentir orgulho do que faço e do que sou. Toda a dedicação e trabalho desprendidos desde o início só foi possível por causa da família que nós somos. Amo vocês!

Agradeço às agências financiadoras de pesquisa FAPESP-CEPID, CNPQ e FUSP pelo apoio financeiro, que foi essencial para o desenvolvimento do trabalho.

Muito obrigado!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Heredograma de família (1) afetada por miopatia miotubular

Figura 2. Heredograma de família (12) afetada por miopatia miotubular

Figura 3. Eletroferogramas gerados a partir da análise do perfil de inativação do cromossomo X em quatro mulheres heterozigotas da família 12

Figura 4. Curvas das funções P (azul), L (verde) e dL/dK (vermelho) indicando o valor máximo de K em aproximadamente 30%

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alterações identificadas nas famílias estudadas

Tabela 2. Estruturas genealógicas e respectivas fórmulas em função de K encontradas nas famílias estudadas

RESUMO

A miopatia miotubular é uma doença genética congênita que afeta a musculatura esquelética e respiratória, causada por mutações no gene *MTM1*. Apresenta padrão de herança recessivo ligado ao cromossomo X e frequência estimada de 1/50.000 meninos nascidos vivos. O diagnóstico é geralmente realizado através de biopsia muscular, com presença de fibras pequenas com núcleo central, predominância de fibras do tipo I, concentração de miofibrilas na periferia da fibra e região central ocupada por acúmulos de mitocôndrias e glicogênio. O quadro clínico é bastante grave, com manifestação clínica no período neonatal e óbito nos primeiros meses, ou ano de vida. Os pacientes apresentam hipotonia e fraqueza muscular generalizadas, dificuldade de alimentação, ptose palpebral, oftalmoplegia, hérnia inguinal e criptorquidia. Mulheres portadoras das mutações são geralmente assintomáticas, mas diversos casos de heterozigotas sintomáticas têm sido relatados. Pacientes com miopatias congênitas estruturais vem sendo estudados nos últimos 20 anos no Centro de Pesquisa do Genoma Humano e Células Tronco (CPGH-CEL) da Universidade de São Paulo (USP). Atualmente, em razão do avanço das tecnologias de análise molecular do DNA, como o sequenciamento de nova geração (NGS – *Next Generation Sequencing*), o diagnóstico tem se tornado cada vez mais preciso. No presente trabalho, pacientes de 12 famílias estudadas no CEGH-CEL foram submetidos à triagem mutacional, utilizando técnica de NGS. Onze mutações foram identificadas (c.109 C>T; c.139_142 delAAAG; c.706 A>T; c.1010 G>A, c.1181 A>G, c.1262 G>A, c.1354 -1 G>C, c.1465_1465delC, c.1467 +1 G>A, c.1528 A>T; c.1528 A>T); entre elas 5 já descritas como patogênicas e 6 são novas. Em duas famílias, foram identificadas 4/8 e 2/4 mulheres portadoras apresentando algum nível de manifestação clínica. A análise de desvio de inativação do X revelou desvio aleatório em pelo menos 4 das heterozigotas manifestantes. Além disso, adicionando os casos deste trabalho aos relatados na literatura, a taxa de penetrância da doença foi estimada em 30% em mulheres heterozigotas, o que é compatível com um padrão de penetrância incompleta e poderia explicar a alta frequência de mulheres manifestantes. Uma análise de exomas foi realizada a fim de identificar possíveis genes modificadores que explicassem a variabilidade clínica observada. Foi identificada uma região de 4,2 Mb contendo genes contíguos no cromossomo 19 que pode estar relacionado à modulação do fenótipo.

ABSTRACT

Myotubular myopathy is a rare congenital muscle genetic disease, caused by mutations in the *MTM1* gene. With a X-linked recessive inheritance, the disease affects 1/50.000 living born males. The clinical picture is characteristic and very severe, with manifestation in the neonatal period, including generalized hypotonia and muscle weakness, feeding difficulty, palpebral ptosis, ophthalmoplegia, inguinal hernia, and cryptorchidism. Most affected die in the first few months or year of life, and those who survive often depend on care and assistance to perform activities of daily living, as well as require mechanical ventilation and enteral nutrition. Females carrying the mutations are generally asymptomatic, but several cases of symptomatic heterozygotes have been reported, compared to the low frequency of manifesting carriers in other X-recessive diseases. Patients with structural congenital myopathies have been studied in the last 20 years at the Human Genome and Stem Cell Research Center (HUG-CELL) at the University of São Paulo (USP). The diagnosis of myotubular myopathy is usually made with muscle biopsy findings, with small fibers with central nuclei, the predominance of type I fibers, the concentration of myofibrils in the periphery of the fiber and central region occupied by accumulations of mitochondria and glycogen. More recently, with the advancement of DNA molecular analysis technologies, such as Next Generation Sequencing (NGS), the diagnosis has become increasingly accurate. In the present study, patients from 12 families studied in the HUG-CEL were submitted to mutation screening using NGS techniques. Eleven mutations were identified (c.109 C> T; c.139_142 delAAAG; c.706 A> T; c.1010 G> A, c.1181 A> G, c.1262 G> A, c.1354-1 G> C, c.1465_1465delC, c.1467 +1 G> A, c.1528 A> T; c.1528 A> T); among them 6 are novel. In two families, 4/8 and 2/4 female carriers were identified, presenting some level of clinical manifestation. Inactivation skewing analysis of the X chromosome revealed random inactivation in at least 4 of the manifesting carriers. In addition, joining the cases of this work to those reported in the literature, the disease penetrance rate was estimated to be 30% in heterozygous women, which is compatible with an incomplete penetrance pattern and could explain the high frequency of manifesting females. An exome analysis was performed to identify possible modifying genes that explain the observed clinical variability. A region of 4,2 Mb containing contiguous genes was identified on chromosome 19 that may be related to phenotype modulation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Músculo Esquelético

1.1.1. Miogênese

1.1.2. Organização

1.2. Doenças Neuromusculares

1.2.1. Classificação

1.2.2. Padrões de herança

1.3. Distrofias musculares

1.4. Miopatias congênitas estruturais

Miopatía central core

Miopatía nemalínica

1.5. Miopatía centronuclear

1.5.1. Definição e classificação

1.5.2. Forma autossômica dominante

1.5.3. Forma autossômica recessiva

1.5.4. Ligada ao X recessiva

1.5.5. Diagnóstico diferencial

1.6. Métodos de diagnóstico

1.7. Aconselhamento genético em doenças neuromusculares

2. OBJETIVOS

3. METODOLOGIA

3.1. Seleção e diagnóstico de famílias de interesse

3.2. Identificação de heterozigotas manifestantes

3.3. Estudo da inativação do cromossomo X

3.4. Investigação de variantes modificadoras do fenótipo nas heterozigotas manifestantes

3.5. Cálculo da penetrância da miopatía miotubular nas heterozigotas manifestantes

4. RESULTADOS

4.1. Pacientes diagnosticados

4.2. Mulheres heterozigotas e manifestantes

4.3. Inativação do X

4.4. Variantes modificadoras do fenótipo

4.5. Cálculo de penetrância

5. DISCUSSÃO

6. REFERÊNCIAS

1. INTRODUÇÃO

1.1. Músculo Esquelético

1.1.1. Miogênese

Durante a embriogênese, células originadas dos somitos migram para as regiões nas quais os músculos irão se desenvolver⁽¹⁾, e se tornam comprometidas com a miogênese, passando a ser chamadas de mioblastos. Os mioblastos passam por intensa atividade proliferativa. Gradualmente, perdem a capacidade de se multiplicar ao mesmo tempo em que aumentam a expressão de proteínas específicas do músculo, fundem-se umas às outras, diferenciam-se e formam os miotubos. Por fim, os miotubos em conjuntos formam o músculo maduro. Todo este processo é coordenado por fatores de transcrição que são necessários para que o músculo esquelético seja formado corretamente⁽²⁻⁴⁾. Um indicador de que o músculo está maduro é a posição periférica que os núcleos assumem na fibra muscular, o que pode ser observado nas fibras musculares de adultos.

1.1.2. Organização

Existem mais de 600 músculos esqueléticos no corpo humano, sendo este tecido o componente de cerca de 35 - 40% da massa corpórea. De maneira geral, o músculo é constituído por células alongadas e cilíndricas chamadas de fibra muscular, que em conjunto formam feixes revestidos por tecido conjuntivo, fibras reticulares e a lâmina basal, formando o endomísio. Os feixes musculares agrupados, também revestidos por uma camada de tecido conjuntivo chamada de epimísio, constituem o músculo em sua totalidade.

As fibras musculares são formadas pela fusão de várias células musculares, constituindo um sincício multinucleado, com os núcleos posicionados na periferia da fibra quando em sua forma madura. Essa organização permite, diferenciar o músculo esquelético do músculo cardíaco, uma vez que os núcleos nas células cardíacas se posicionam no centro da célula, e o sincício é apenas funcional. Além disso, as células musculares esqueléticas contêm grande quantidade de filamentos citoplasmáticos de proteínas contráteis denominados miofibrilas, estas sendo as responsáveis por gerar a força necessária para a contração muscular.

As miofibrilas são as responsáveis pelo aspecto estriado do músculo esquelético, e isso em função da repetição de unidades iguais chamadas sarcômeros. O sarcômero é a menor parte contrátil da miofibrila, e a contração e relaxamento do conjunto de sarcômeros das

fibras musculares leva à movimentação do músculo. Cada sarcômero é delimitado por duas bandas Z sucessivas e contém uma banda A separando duas semibandas I. No centro da banda A existe ainda uma região chamada de banda H. 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 necessário que os filamentos de actina e miosina, associados a outras proteínas, interajam um com o outro.

A contração do sarcômero é dependente de íons Ca^{2+} . Estes íons ficam armazenados no retículo sarcoplasmático que envolve grupos de miofibrilas separando-as em feixes cilíndricos. Quando a membrana do retículo sarcoplasmático é despolarizada pelo estímulo nervoso, os canais de Ca^{2+} se abrem e os íons se difundem passivamente, associando-se às proteínas que irão promover a interação entre os miofilamentos. Ao fim da despolarização da membrana, os íons Ca^{2+} são reabsorvidos de forma ativa para o interior das cisternas, cessando o mecanismo contrátil. Em fibras de calibre maior, a fim de evitar que a despolarização da membrana e consequente contração aconteça rapidamente na periferia e lentamente no interior da fibra, de maneira não uniforme, existe o sistema de túbulos transversais, ou túbulos T. Este sistema é constituído por uma rede de invaginações tubulares da membrana plasmática, ou sarcolema, que permite que a despolarização chegue até o interior da fibra muscular. Em cada lado de cada túbulo T, existe uma cisterna terminal do retículo sarcoplasmático, e este complexo formado por um túbulo T e duas cisternas do retículo sarcoplasmático é denominado de tríade. É na tríade que a despolarização da membrana chega até o retículo sarcoplasmático.

O tecido estriado esquelético, então, possui uma estrutura e funcionamento altamente complexos, que devem estar bem preservados para que a atividade muscular seja normal. Ocorrendo mutações em genes que codificam proteínas importantes para o bom funcionamento do músculo, ocorrem perturbações na sua homeostase, e as fibras podem entrar em processo de degeneração, levando ao aparecimento de doenças chamadas doenças neuromusculares.

1.2. Doenças Neuromusculares

1.2.1. Classificação

Doenças neuromusculares formam um grande grupo de doenças que ocorrem por causa do mal funcionamento dos músculos, ou diretamente, sendo patologias do músculo

voluntário, ou indiretamente sendo patologias dos nervos e junções neuromusculares. Algumas das causas são doenças autoimunes, exposição a fatores ambientais e envenenamento, e principalmente causas genéticas.

No âmbito das causas genéticas, existem genes que codificam para proteínas musculares⁽⁵⁾, algumas funcionando para manter a estrutura do músculo, outras possuindo atividade enzimática e que participam de uma série de atividades metabólicas no músculo. Mutações em um ou mais genes codificadores dessas proteínas podem levar ao aparecimento de muitas doenças do músculo, sendo algumas já bem conhecidas na comunidade acadêmica e médica, e outras nas quais o processo patológico ainda é estudado.

A classificação segue as diretrizes da “*World Muscle Society*”, na qual são incluídas 16 categorias de doenças neuromusculares, como as distrofias musculares, distrofias musculares congênitas e miopatias congênitas, compreendendo cerca de 519 genes/loci.

1.2.2. Padrões de herança

Sendo um grupo tão heterogêneo de doenças genéticas, é esperado que diferentes padrões de herança sejam encontrados nas variadas formas de apresentação das doenças. Existem doenças com padrão de herança ligado ao X, como as distrofias de Duchenne (DMD; OMIM 310200) e Becker (BMD; OMIM 300376) e a miopatia miotubular (CNMX; OMIM 310400); padrão de herança autossômico recessivo, como nas distrofias musculares das cinturas (LGMD2), na maioria das distrofias musculares congênitas e em algumas miopatias congênitas; e padrão de herança autossômico dominante, como em outras formas das distrofias musculares das cinturas (LGMD1), distrofia facioescapulohumeral (FSHD1; OMIM 158900), distrofia miotônica de Steinert (DM1; OMIM 160900) e outras miopatias congênitas.

1.3. Distrofias musculares

Um dos subgrupos de doenças neuromusculares são as chamadas distrofias musculares. É um grupo heterogêneo de doenças, compreendendo formas que comprometem diferentes músculos e que apresentam alta variabilidade clínica, desde a idade de início de manifestação dos sintomas até a gravidade dos mesmos. São doenças nas quais a evolução clínica é progressiva, ou seja, tendem a piorar com o passar do tempo. Pacientes afetados possuem nível sérico elevado da enzima creatina-cinase (CK), o que é um indicativo de danos às fibras musculares. Nas biopsias musculares pode ser observado um padrão histológico

degenerativo, com fibras musculares de diâmetro heterogêneo, infiltração de tecido conjuntivo e adiposo, fibras em degeneração e necrose, sinais de regeneração com a presença de fibras musculares imaturas, e fibrose, em oposição a um tecido normal, no qual as fibras musculares se encontram preservadas.

A regeneração muscular é um processo marcante que acontece nas distrofias musculares. Quando a fibra muscular sofre lesão, é iniciada uma cascata de eventos envolvendo o processo de inflamação e degeneração, que em paralelo, ativa também a via de regeneração muscular. Células-tronco musculares, que também se originam dos somitos, são ativadas e proliferam para gerar células musculares e promover a geração de novas fibras musculares. Essas células-tronco musculares recebem o nome de Células Satélite, e no músculo maduro são quiescentes, localizando-se entre a fibra muscular e a respectiva lâmina basal. No processo de regeneração, as células satélite são atraídas para o local da lesão, entram em proliferação e podem ou se fundir à fibra lesionada, ou fundir-se umas as outras para produzir novas miofibras. O resultado em ambos os casos é a regeneração da lesão e a presença de fibras imaturas, nas quais uma característica é a presença do núcleo internalizado ou centralizado. Posteriormente, esses núcleos migram para a periferia e a fibra muscular assume as características de uma fibra madura.

1.4. Miopatias congênitas estruturais

As miopatias congênitas são doenças que já estão presentes ao nascimento ou se manifestam na primeira infância. Os pacientes podem apresentar problemas respiratórios ou dificuldades para se alimentar, necessitando de suporte intensivo. Alguns não sobrevivem além da infância, sendo os problemas respiratórios a principal causa de morbidade e mortalidade. São doenças nas quais a história clínica é estável ou lentamente progressiva, e que podem causar uma fraqueza e hipotonia muscular leve, ou fraqueza muscular grave. Diferentemente das distrofias, os níveis de CK são normais ou pouco alterados, indicando que não há dano na integridade geral da fibra muscular, e sim alterações estruturais que podem ser visualizadas no padrão histológico do músculo.

As alterações estruturais no interior das fibras musculares são características das diversas formas de miopatias congênitas, sendo utilizadas como base para a sua classificação. As três maiores categorias de miopatias congênitas estruturais clássicas são as miopatias nemalínicas, miopatias com *cores* e miopatias centronucleares.

Fazer uma correlação entre cada miopatia congênita estrutural e seu componente genético pode ser uma tarefa complexa em virtude de algumas particularidades⁽⁶⁾:

- a. Há grande heterogeneidade genética de loco – muitas miopatias congênitas podem ser causadas por mutações em diferentes genes, como acontece na miopatia nemalínica, a qual já foram associados pelo menos oito genes;
- b. Mutações no mesmo gene podem levar a doenças distintas, como mutações no gene *ACTA1* que codifica a α -actina, podendo causar miopatia nemalínica^(7,8), miopatia com *rod* intranuclear⁽⁹⁾ e acúmulo de actina⁽¹⁰⁾. A mesma mutação pode causar características patológicas distintas nos membros de uma mesma família ou no mesmo indivíduo conforme a idade, como já foi observado em mutações no gene *RYR1*⁽¹¹⁾.

Com base nestes aspectos, é possível perceber que estabelecer um diagnóstico preciso dentro da gama de miopatias congênitas estruturais pode ser complexo.

Miopatia central core

A Miopatia central *core* é considerada a forma mais comum das miopatias congênitas⁽¹²⁾. É caracterizada pela presença de “*cores*” no interior das fibras musculares, que podem ser únicos e centrais, ou múltiplos e periféricos. Os “*cores*” são regiões nas quais não há atividade enzimática oxidativa e glicolítica, reflexo da ausência de mitocôndrias^(13,14). Nessa doença há fraqueza muscular neonatal com possível associação com anormalidades esqueléticas^(15–17). Mutações em dois genes são conhecidas por causar a doença: o gene *RYR1*⁽¹⁸⁾ em que há padrão de herança autossômico dominante e autossômico recessivo⁽¹⁶⁾, e o gene *SEPNI*⁽¹⁹⁾ com padrão de herança autossômico recessivo. Pacientes afetados por miopatia central *core* e portadores de mutações no gene *RYR1* também estão suscetíveis a desenvolver uma condição chamada hipertermia maligna quando expostos a anestésicos halogenados⁽²⁰⁾.

Miopatia nemalínica

A miopatia nemalínica é caracterizada pela presença de “*rods*”, que são aglomerados de proteínas originadas da banda Z do sarcômero. A sua frequência é estimada em 1:50000 nascidos vivos por ano. O fenótipo inclui fraqueza muscular, que é mais grave na face, músculos flexores do pescoço e músculos proximais das cinturas, hipotonia e distúrbios

faciais⁽²¹⁾. Há uma grande heterogeneidade de loco, de forma que pelo menos oito genes/loci já foram relacionados, incluindo o gene da α -actina *ACTA1*⁽⁸⁾; nebulina *NEB*⁽²²⁾; tropomiosina 3 *TPM3*⁽²³⁾; tropomiosina 2 *TPM2*⁽²⁴⁾; troponina T1 *TNNT1*⁽²⁵⁾; cofilina-2 *CLF2*⁽²⁶⁾; e um membro da família BTB/Kelch *KBTBD13*⁽²⁷⁾. Havendo diferentes genes envolvidos na manifestação da doença, também são observados diferentes padrões de herança, como autossômico dominante e recessivo nas formas causadas por mutações em *ACTA1* e autossômico recessivo nas formas causadas por mutações em *NEB*, por exemplo.

1.5. Miopatia centronuclear

1.5.1. Definição e classificação

A miopatia centronuclear (CNM) se caracteriza pela presença de fibras arredondadas, contendo núcleos situados na região central, organizados em fileira e por toda extensão da fibra. As primeiras descrições da doença foram feitas por Spiro *et al.*, 1966²⁸ e Sher *et al.*, 1967²⁹, na década de 60, que foram os primeiros a notar um padrão histológico que não havia sido relatado anteriormente nas fibras musculares de pacientes apresentando miopatia congênita. Inicialmente, a doença foi denominada Miopatia Miotubular, uma vez que as fibras dos pacientes se assemelhavam a forma imatura de miofibras, com localização central dos núcleos, em um padrão presente nas fases iniciais de desenvolvimento. Logo, postulou-se a hipótese de que a doença era causada por problemas no desenvolvimento e maturação das fibras musculares, com estagnação do desenvolvimento na fase de miotubos. Entretanto, houve bastantes críticas a esta hipótese, e mais tarde mostrou-se que o aspecto miotubular era secundário quanto ao dano primário, que ocorria já com as fibras maduras. Desta forma, o nome miopatia centronuclear tornou-se mais usado, enquanto o nome miopatia miotubular foi reservado para uma forma específica e mais grave da doença.

A apresentação clínica é bastante heterogênea, incluindo desde hipotonia grave em recém-nascidos, até aparecimento tardio de fraqueza muscular e envolvimento da musculatura extraocular em adolescentes e adultos.

A classificação das CNMs era baseada na idade de início da manifestação e severidade nos sintomas. Atualmente, além destes critérios, considera-se principalmente o padrão de herança. Assim, três formas são classicamente reconhecidas:

- a. Autossômica dominante, causada por mutações no gene *DNM2*;
- b. Autossômica recessiva, causada por mutações no gene *BINI*;

- c. Ligada ao X recessiva, causada por mutações no gene *MTM1*.

1.5.2. Forma autossômica dominante

A forma autossômica dominante é causada majoritariamente por mutações no gene da dinamina 2, correspondendo a 50% dos casos de CNM com este padrão de herança. A identificação do gene *DNM2* como responsável por esta miopatia, e as respectivas mutações foram descritas em 2005 por Bitoun *et al.*⁽³⁰⁾. O fenótipo é variável, com início dos sinais clínicos tanto em crianças como em adultos, sendo que em crianças a forma é grave, com fraqueza generalizada, hipotonia, grau variado de fraqueza facial, ptose e oftalmoplegia. Já nos adultos o fenótipo é mais leve, com desenvolvimento motor atrasado, fraqueza muscular moderada, ptose e oftalmoplegia. Aspectos histológicos marcantes desta miopatia são a centralização nuclear nas fibras musculares, com organização radial de faixas sarcoplasmáticas e heterogeneidade no diâmetro das fibras.

Sendo uma doença que apresenta um padrão de herança autossômico dominante, o que se observa é a presença de indivíduos afetados em gerações sucessivas e sem salto de geração, uma vez que a penetrância é completa.

1.5.3. Forma autossômica recessiva

A forma autossômica recessiva é causada por mutações no gene da anfifisina-1 - *BINI*, e poucos pacientes foram descritos com esta forma^(31,32). O fenótipo é intermediário entre as formas autossômica dominante e ligada ao X. O quadro clínico se caracteriza por atraso no desenvolvimento motor, atrofia muscular, fraqueza difusa, diplegia facial, ptose e graus variados de oftalmoplegia. Na histologia se observa numerosas fibras do tipo I hipotróficas, centralização e agrupamento nuclear.

Sendo uma doença que apresenta um padrão de herança autossômico recessivo, o que se observa é a presença de indivíduos afetados numa mesma irmandade, com pais normais, bem como casos isolados na família.

1.5.4. Ligada ao X recessiva

A forma recessiva ligada ao X, a miopatia miotubular, é a forma mais grave entre as CNMs, identificada e caracterizada pelo fenótipo dos pacientes. O quadro clínico clássico é caracterizado por movimentação fetal reduzida e polihidrânio no período antenatal⁽³³⁾; no período neonatal, hipotonia grave, fraqueza generalizada quase sempre associada à

insuficiência respiratória, dificuldade ou incapacidade de alimentação, ptose, oftalmoplegia, hérnia inguinal e criptorquidia, sendo que na maioria dos casos há óbito nos primeiros meses de vida⁽³⁴⁻⁴⁰⁾. Quando sobrevivem, as crianças necessitam de cuidado intensivo praticamente constante, e podem desenvolver peliose hepática^(41,42). A frequência estimada é de 1/50.000 nascidos vivos. Na histologia os achados são grande número de fibras de tamanho pequeno e com núcleos centrais, predominância de fibras do tipo I, concentração de miofibrilas na periferia da fibra e região central ocupada por acúmulos de mitocôndrias e glicogênio.

A miopatia miotubular é causada por mutações no gene *MTM1* que codifica para a enzima miotubularina. Esta descoberta foi feita por Laporte *et al.* em 1996⁽⁴³⁾, e desde então, mais de 300 mutações já foram identificadas neste gene⁽⁴⁴⁻⁴⁷⁾, sendo o único *locos* no qual foram encontradas mutações associadas à doença. O gene *MTM1* possui 15 exons, e a proteína codificada contém 603 aminoácidos. Mutações no gene levam à falta de expressão da miotubularina, bem como redução da sua atividade.

A miotubularina é uma fosfatase lipídica que possui similaridade na sequência às fosfatases tirosina (PTPs). Atua em vários processos fisiológicos como tráfico e remodelagem de membranas^(48,49), fagocitose^(50,51), regulação dos filamentos intermediários, organização mitocondrial⁽⁵²⁾, entre outros.

Heterozigotas para o gene *MTM1*

Sendo a miopatia miotubular uma doença que apresenta padrão de herança ligado ao X recessivo, tipicamente só homens são afetados, de forma que a detecção de mulheres heterozigotas geralmente acontece quando há afetado(s) na família. Atualmente, com o uso mais amplo de técnicas moleculares de sequenciamento de nova geração em amostras de pacientes com quadros mais variáveis, está se tornando cada vez mais frequente a identificação de pacientes com miopatia miotubular com fenótipo mais brando, especialmente mulheres heterozigotas que apresentam algum sinal de fraqueza muscular e que, seguindo o método de diagnóstico clássico através da análise de biópsias do músculo, não eram identificadas. A identificação destas mulheres, em uma frequência maior do que o esperado, tem gerado interesse na comunidade científica acerca da razão pela qual ocorre manifestação clínica em mulheres portadoras da mutação no gene.

Tipicamente, em doenças ligadas ao X recessivas, mulheres heterozigotas não têm manifestação clínica da doença.

Na Distrofia muscular de Duchenne, com incidência de 1/3000 nascimentos masculinos, e, portanto, muito mais frequente que a MTM1, a frequência de heterozigotas manifestantes é muito baixa, variando de 2,5 a 8%.

Entretanto, há diversos relatos na literatura científica e médica de mulheres portadoras manifestando algum sintoma, como fraqueza muscular, em portadoras de mutações no gene *MTM1*. Nesses estudos, foi investigada a existência de desvio de inativação do cromossomo X, o que explicaria o aparecimento da doença, o que de fato foi encontrado em parte dos casos descritos⁽⁵³⁻⁵⁷⁾. Por outro lado, em vários outros relatos, verificou-se que a inativação do cromossomo X era aleatória, de forma que não foi possível atribuir a este mecanismo o aparecimento de sintomas em mulheres⁽⁵⁶⁻⁶¹⁾. No trabalho publicado por Savarese *et al.*, 2016⁽⁶²⁾, é feito um levantamento de 24 mulheres sintomáticas, no qual é apontado aquelas que têm desvio de inativação do cromossomo X ou não, e ressaltando o alto número de heterozigotas sintomáticas que têm sido identificadas.

Uma outra hipótese que explicaria a existência de portadoras manifestantes é a presença de variantes modificadoras/protetoras do fenótipo, uma vez que existem doenças nas quais pacientes que possuem as mesmas mutações patogênicas apresentam quadro clínico variável⁽⁶³⁾. Essas variantes são raras, entretanto já foram identificadas influenciando em doenças neuromusculares como na distrofia muscular de Duchenne⁽⁶⁴⁻⁶⁹⁾.

Em um trabalho publicado por Dobyns *et al.*, 2006⁽⁷⁰⁾, foram estimadas as penetrâncias, em homens e mulheres, das principais doenças ligadas ao X. Foi observado que, enquanto para os homens a penetrância era quase sempre 100%, para as mulheres existia um *continuum*, que variava de 0% a 100% dependendo da doença. Em virtude do observado, os autores do trabalho defendem que as regras tradicionais utilizadas para classificar as doenças ligadas ao cromossomo X como dominantes e recessivas devem ser revistas, de forma a se incluir o conhecimento que vem sendo produzido pelos estudos moleculares das doenças, abrindo espaço para explicar o porquê da manifestação fenotípica em mulheres.

Em doenças em que há um alelo letal ligado ao cromossomo X, a taxa de mutação *de novo* e heterozigose nas mulheres é de 1/3 e 2/3 respectivamente. Entretanto, em estudos em que foram avaliadas 153 famílias nas quais havia somente um afetado por miopatia miotubular, Laporte *et al.*, 2000⁽⁴⁴⁾ e Herman *et al.*, 2002⁽⁴⁵⁾ identificaram uma frequência de mulheres heterozigotas de 80-90%, com mutações *de novo* compreendendo 10-20% dos

casos. Estes estudos poderiam indicar que mutações no gene *MTM1* não são tão letais como se acreditava, ao passo que as frequências observadas são concordantes com os cálculos empíricos de frequências em doenças recessivas ligadas ao X não-letais.

1.5.5. Diagnóstico diferencial

A miopatia miotubular é uma doença que tem alta sobreposição fenotípica com diversas outras doenças, e por isso é necessário que haja um diagnóstico diferencial para que possa se afirmar que é de fato a miopatia miotubular. Esse diagnóstico diferencial é feito levando em consideração dois critérios principais:

- a. Clínico, quando a discriminação com base na manifestação clínica não é clara;
- b. Histológico, quando os padrões observados nas biópsias musculares não permitem determinar precisamente a doença.

De acordo com o critério clínico, doenças que devem ser levadas em consideração no diagnóstico diferencial são:

1. Miopatias congênitas em geral⁽⁷¹⁾. Todas as miopatias congênitas têm características clínicas em comum: Fraqueza generalizada, hipotonia, hiporreflexia e pouca massa muscular. Devem ser consideradas outras miopatias congênitas, como a miopatia nemalínica (autossômico dominante e autossômico recessivo), uma vez que apresenta alta heterogeneidade de *locus*;
2. Distrofias musculares congênitas⁽⁷²⁾. Essas doenças são um grupo clinicamente e geneticamente heterogêneo de doenças musculares, que apresentam com hipotonia, fraqueza muscular progressiva, atraso no desenvolvimento motor, comprometimento respiratório, contraturas e deformidades na coluna. As biópsias musculares apresentam um padrão distrófico, o que permite as diferenciar da miopatia miotubular, bem como o padrão de herança que na maioria das formas é autossômico recessivo;
3. Atrofia muscular espinhal (SMA1; OMIM 253300). A doença é causada por mutações no gene *SMN1* seguindo um padrão de herança autossômico recessivo. Formas mais precoces são mais graves, apresentando fraqueza muscular, hipotonia, atrofia, comprometimento respiratório, contraturas e atraso no desenvolvimento motor.
4. Miastenia congênita⁽⁷³⁾. Compreende um grupo de doenças causadas por mutações em genes diversos, apresentando padrões de herança autossômico dominante e recessivo. Embora sejam doenças raras, devem ser consideradas, uma vez que portadores podem apresentar melhora no quadro clínico com intervenção medicamentosa;

5. Síndrome de Prader-Willi (PWS; OMIM 176270). Síndrome causada pela falta de expressão paterna de genes imprintados da região 15q11.2-q13, devido a deleção paterna, dissomia uniparental materna ou defeito em sítio de *imprinting*. O quadro clínico apresenta hipotonia grave e dificuldades para se alimentar na primeira infância (quadros que se alteram com o avançar da idade – aumento do tônus muscular e desenvolvimento de hiperfagia – o que leva a uma diferenciação da miopatia miotubular), além de atraso no desenvolvimento motor e da linguagem. Maior parte dos meninos têm criptorquidia, como pode acontecer na miopatia miotubular.

De acordo com o critério histológico, doenças que devem ser levadas em consideração no diagnóstico diferencial incluem o grupo das miopatias centronucleares^(74,75). Encontradas mutações em *DNM2* (autossômico dominante), *RYR1* (autossômico dominante e recessivo), *BIN1* e *TTN* (autossômico recessivo). A sintomatologia clínica é menos grave e os pacientes apresentam padrão histológico semelhante (núcleo central). Neste grupo de doenças, a diferenciação pode ser feita com base no padrão de herança e no quadro clínico.

Associando os critérios clínicos e histológicos, encontra-se a distrofia miotônica congênita I (DM1; OMIM 160900), que representa o principal diagnóstico diferencial de miopatia miotubular. Isso se dá pela clínica, que é muito semelhante, apresentando polihidrâmnio, movimento fetal reduzido, fraqueza muscular, hipotonia, face miopática e deficiência respiratória, também como pela similaridade de achados na biópsia muscular, de forma que as de neonatos são praticamente indistinguíveis daquelas de pacientes de miopatia miotubular. Nesta doença, o padrão de herança é autossômico dominante, causado por expansões CTG na região 3'UTR do gene *DMPK*. Esse padrão de herança pode ajudar na distinção entre as duas formas. Além disso, as formas congênitas geralmente são herdadas da mãe, que também é afetada⁽⁷⁶⁾.

1.6. Métodos de diagnóstico

Até recentemente, fazia-se o diagnóstico associando o quadro clínico à biópsia. Entretanto, em muitos casos, esse diagnóstico não era preciso e até mesmo não conclusivo, uma vez que as doenças neuromusculares têm sobreposição clínica e histológica, e a investigação era direcionada para um ou poucos genes que se correlacionam ao quadro clínico. O diagnóstico foi muito aprimorado quando foram implementados os estudos e triagem de mutações por técnicas de análise molecular, inicialmente com o sequenciamento

Sanger, e posteriormente o sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing - NGS*), que permite a análise de vários genes de interesse numa só reação. Com essa mudança, o diagnóstico pode se tornar mais preciso. Com relação às miopatias, o *NGS* expandiu a investigação a vários genes relacionados, o que acabou permitindo que pacientes antes não classificados na mesma doença em virtude de variações no fenótipo passassem a ser classificados na mesma doença. Também, atualmente observa-se a associação de novos fenótipos a genes já conhecidos.

1.7. Aconselhamento genético em doenças neuromusculares

O aconselhamento genético é uma prática realizada por profissionais capacitados e que possuem conhecimento acerca de genética e genômica humanas. Seu principal objetivo é transmitir às pessoas ou parentes de pessoas afetadas por doenças genéticas informações sobre os mecanismos da doença, suas bases genéticas, riscos de ocorrência e recorrência, bem como as possibilidades terapêuticas e planejamento familiar. Nos últimos anos, o desenvolvimento de ferramentas de biologia molecular e diagnóstico tem possibilitado que o aconselhamento genético ocorra de forma mais assertiva, especialmente para as doenças neuromusculares que apresentam uma alta variabilidade clínica. Nestas, ocorre uma grande heterogeneidade genética, correspondente à grande quantidade de genes relacionados ao desenvolvimento das doenças e seus diversos padrões de herança.

Apesar de ser uma possibilidade, os resultados obtidos pela triagem genética podem trazer à tona questões éticas e psicológicas que ainda são discutidas atualmente, uma vez que podem alterar significativamente o modo e qualidade de vida de uma família. Ao mesmo tempo, cria um substrato que contribui para o avanço das pesquisas em genética humana. Por isso, o aconselhamento genético se coloca em um cenário de importância, uma vez que oferece meios para ajudar pessoas que necessitam de informações e esclarecimento sobre o tema.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho visa o estudo genético de famílias com miopatia miotubular, incluindo a confirmação do diagnóstico molecular de pacientes com diagnóstico clínico e biopsia muscular e identificação de possíveis portadoras para fins de aconselhamento genético das famílias. Além disso, verificar a frequência de heterozigotas com manifestação clínica, e estimar a penetrância desta condição.

Objetivos específicos

1. Confirmação das mutações no gene *MTM1*, encontradas por sequenciamento *NGS* em famílias com afetados por miopatia miotubular, através de sequenciamento Sanger;
2. Triar e identificar mulheres heterozigotas nas respectivas famílias;
3. Avaliar clinicamente mulheres heterozigotas para identificação de manifestantes;
4. Estimar a frequência de heterozigotas manifestantes, e a penetrância da doença
5. Oferecer aconselhamento genético adequado para as famílias.

3. METODOLOGIA

3.1. Seleção e diagnóstico de famílias de interesse

As famílias estudadas neste trabalho foram selecionadas a partir de consultas no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do Centro de Pesquisas do Genoma Humano, nas quais houve avaliação do quadro clínico e das funções motoras e respiratórias. Todos os pacientes incluídos apresentaram biopsia muscular com achados específicos de *CNM*.

A investigação da etiologia genética da doença foi iniciada pelo sequenciamento de nova geração, utilizando um painel customizado, incluindo 88 genes associados a doenças neuromusculares. Foram utilizados os kits de preparo de biblioteca *SureSelectQXT* e kit de captura *SureSelect Human All Exon V6* (Agilent, Estados Unidos), e o sequenciamento foi realizado no equipamento HiSeq2500 (Illumina, Estados Unidos). O resultado foi comparado à versão de referência GRCh37/hg19 do genoma humano.

Mutações encontradas no gene *MTM1* pelo sequenciamento NGS foram confirmadas por meio do sequenciamento Sanger.

Para a reação em cadeia da polimerase (PCR), foram utilizados 5µL de DNA total a 30ng, 14,78µL de H₂O milliQ, 2,5µL de 10x High Fidelity PCR Buffer, 0,75µL de 50mM MgCl₂, 0,75µL de 10mM dNTP Mix, 0,5µL de 10µM forward primer, 0,5µL de 10µM reverse primer e 0,22µL de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) para um volume final de 25µL, seguindo as recomendações do fabricante. Num termociclador *DNA Engine* (BIO-RAD), o programa utilizado consistiu em desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento por 1 minuto em temperatura dependente da temperatura de *melting* de cada primer específico, extensão a 72°C por 1 minuto, extensão final a 72°C por 5 minutos e resfriamento a 10°C indefinidamente. Foram realizados de 35 a 40 ciclos.

A purificação do produto de *PCR* foi feita adicionando 3µL de produto a 17µL do reagente *ExoSAP-IT* (AppliedBiosystems). As amostras foram mantidas a 37°C por 1 hora, seguido de 80°C por 15 minutos e resfriadas a 10°C por tempo indeterminado.

Para a reação de sequenciamento, foram utilizados 6µL de produto de PCR purificado, acrescentados a uma solução contendo 2µL de Big Dye e 1µL de 5x Big Dye Buffer do kit *Big Dye Terminator v3.1* (AppliedBiosystems), mais 1µL de 5µM primer forward ou primer

reverse, um em cada solução, totalizando 10µL. O programa consistiu em desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto, desnaturação a 96°C por 10 segundos, anelamento a 50°C por 5 segundos, extensão a 60°C por 4 minutos e resfriamento a 4°C por tempo indeterminado. Foram realizados 25 ciclos.

A purificação dos produtos de sequenciamento foi realizada utilizando colunas de filtração do kit *illustra Auto Seq G-50* (GE Healthcare), seguindo instruções do fabricante.

Por fim, as amostras foram secadas a 94°C por 30 minutos e sequenciadas no equipamento *3730 DNA Analyzer*, da Applied Biosystems. Os cromatogramas originados foram visualizados e interpretados no *software Chromas* (Technelysium).

3.2. Identificação de heterozigotas manifestantes

Paralelamente ao estudo de pacientes do sexo masculino afetados por miopatia miotubular, também foi feita a triagem mutacional em mulheres das famílias com o objetivo de identificar possíveis portadoras das mutações. As portadoras identificadas, sempre que possível, foram avaliadas clinicamente por neurologista e uma avaliação funcional foi realizada por fisioterapeutas.

3.3. Estudo da inativação do cromossomo X

O perfil de inativação do cromossomo X foi feito nas nove mulheres heterozigotas das famílias das quais foram identificadas manifestantes. Para análise, foi utilizado um protocolo adaptado por Costa, S. S., da equipa da Dr^a. Vianna-Morgante, A. M., de Allen *et al.*, 1992⁽⁷⁷⁾, seguindo o princípio de digestão de região polimórfica e rica em repetições CAG do gene *AR* – receptor de andrógeno humano.

São preparadas duas reações para cada amostra de DNA: uma tratada com a enzima HpaII e outra sem enzima para fins de comparação. Em cada reação são usados 1µg de DNA em um volume máximo de 14µL, 2µL de BSA 10x, 2µL de Buffer 10x e H₂O para um volume final de 20µL. Na amostra a ser digerida também é adicionado 2µL de HpaII 20U. O período de incubação é de 12h a 37°C, seguido de uma incubação a 95°C para inativar a enzima, ou congelamento direto.

Após a digestão, é feita uma reação de PCR de acordo com o seguinte protocolo: 4µL de DNA, 3µL de Buffer 10X, 1,5µL de MgCl₂ 50mM, 3µL de Mix dNTPs 2,5mM, 1,5µL de Primer AR-F e 1,5µL de Primer AR-R 30µM, 3µL de DMSO 100%, 0,3µL de Taq 5U e

12,2µL de H₂O. O programa consistiu em desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e resfriamento a 4°C por tempo indeterminado. Foram realizados 28 ciclos.

Os produtos foram analisados em sequenciador *3730 DNA Analyzer*, da Applied Biosystems, e o padrão de desvio é calculado utilizando a fórmula proposta por Bittel *et al.*, 2007⁽⁷⁸⁾

$$\frac{(\text{phd1}/\text{phu1})}{(\text{phd1}/\text{phu1})+(\text{phd2}/\text{phu2})}$$

onde

phd1= altura máxima do pico do primeiro alelo digerido

phd2= altura máxima do pico do segundo alelo digerido

phu1= altura máxima do pico do primeiro alelo não-digerido

phu2= altura máxima do pico do segundo alelo não-digerido

3.4. Investigação de variantes modificadoras do fenótipo nas heterozigotas manifestantes

Em duas famílias com várias heterozigotas identificadas, realizou-se um teste de *NGS* compreendendo todo o exoma para investigar a possível existência de variantes modificadoras e moduladoras do fenótipo em mulheres heterozigotas com ou sem sinais clínicos.

Para tanto, foi verificada a segregação familiar das variantes em diferentes cenários:

1. Variantes em genes que escapam da inativação do cromossomo X;
2. Variantes em genes altamente expressos no músculo esquelético em geral;
3. Variantes presentes nas heterozigotas manifestantes e ausentes nas não manifestantes e vice-versa.

3.5. Cálculo da penetrância da miopatia miotubular nas heterozigotas manifestantes

No presente trabalho levantamos a hipótese de que a miopatia miotubular é uma doença genética com padrão de herança dominante ligada ao X com penetrância incompleta, ao contrário do tradicionalmente aceite padrão de herança é recessivo ligado ao X. Para verificar o valor da taxa de penetrância (K), foram utilizados dados de status de portadoras e de manifestação clínica de trabalhos referentes a famílias de mulheres

heterozigotas presentes na literatura científica internacional que continham o heredograma, ou que permitissem determinar as relações genealógicas. As informações obtidas foram adicionadas às das famílias atendidas no Centro de Pesquisas do Genoma Humano do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, IB USP.

Para realizar o cálculo de K , foram construídas as estruturas genealógicas das mulheres heterozigotas, incluindo sua descendência. A estimativa da penetrância foi realizada baseando-se em métodos padronizados da literatura⁽⁷⁹⁾, sob hipótese de que a taxa de penetrância é completa ($K_m = 1$) entre homens hemizigotos e incompleta ($K_f = K$) em mulheres heterozigotas quanto ao gene.

4. Resultados

4.1. Pacientes diagnosticados

Um total de treze famílias foram triadas para o diagnóstico da miopatiamiotubular. Destas famílias, foi possível identificar mutações no gene *MTM1* em doze delas através do sequenciamento de nova geração, confirmadas por sequenciamento Sanger, compreendendo doze pacientes afetados e dezesseis mulheres portadoras. Em um dos pacientes, não foi possível identificar mutações no gene *MTM1* e em outros genes relacionados a doenças neuromusculares. (Tabela 1).

Tabela 1. Alterações identificadas nas famílias estudadas

Família	Exon	Mutação	Proteína	Número de heterozigotas identificadas	Descrição
1	3	c.109 C>T	p.R37X	6	Laporte et al., 1997
2	4	c.139_142 delAAAG	?	1	Nova
3	9	c.706 A>T	p.K236X	0 (<i>de novo</i>)	Hedberg et al., 2016
4	10	c.1010 G>A	p.W337X	0 (<i>de novo</i>)	Nova
5	11	c.1181 A>G	p.D394G	3	Nova
6	12	c.1262 G>A	p.R421Q	-	de Gouyon et al., 1997
7	13	c.1354 -1 G>C	?	-	Grogan et al., 2005
8	13	c.1354 -1 G>C	?	-	Grogan et al., 2005
9	13	c.1465_1465delC	?	-	Nova
10	13	c.1467 +1 G>A	?	1	Herman et al., 2002
11	14	c.1528 A>T	p.K510X	-	Nova
12	14	c.1644 +1 G>A	?	5	Nova

Das mutações identificadas, cinco já foram descritas como patogênicas e estão depositadas em bancos de dados como HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php>) e em artigos do banco de dados do PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Até o atual conhecimento, as outras seis alterações identificadas ainda não foram descritas.

O estudo molecular para identificação de mutações nas mães dos pacientes foi possível nas famílias 2, 3, 4, 5, 10 e 12. Foram identificadas quatro mães portadoras, pertencentes às famílias 2, 5, 10 e 12, enquanto nas famílias 3 e 4 a mutação nova ocorreu no paciente. Mutações também foram identificadas na tia e avó maternas da família 5, e em várias mulheres das famílias 1 e 12.

A estas famílias, foi oferecido aconselhamento genético, em que foram discutidos o resultado do diagnóstico molecular e as suas implicações, como risco de recorrência, planejamento familiar, e a possibilidade de outras mulheres da família, ainda não

diagnosticadas, serem portadoras e estarem em risco de também ter um filho afetado por miopatia miotubular.

4.2. Mulheres heterozigotas e manifestantes

FAMÍLIA 1

A família 1 foi identificada em triagem diagnóstica para distrofias musculares, pois a família era composta por 3 irmãs afetadas. Foi identificada a mutação c.109C>T no gene *MTM1*, em heterozigose. Esta mutação já foi descrita como patogênica por Laporte *et al.*, 1997⁽⁸⁰⁾ e foi encontrada em heterozigose em 5 das 8 irmãs, sendo que 3 delas manifestam fenótipo. É uma mutação sem sentido que leva à parada prematura da tradução, possivelmente apresentando *nom mediated decay* do RNA mensageiro.

Figura 1. Heredograma de família (1) afetada por miopatia miotubular

Descrição das pacientes

II.3 – Consulente normal.

II.5 – Paciente faleceu aos 64 anos. Início dos sintomas aos 49 anos. Apresentava fraqueza muscular nos membros superiores e inferiores. Na última avaliação neurofuncional aos 60 anos, deambulava com auxílio de andador. Não conseguia mais se levantar da cadeira. Força muscular: cintura escapular = 50%, MMSS = 72,5%, cintura pélvica = 40%, MMII = 85%. Na última avaliação pneumofuncional na mesma idade, apresentava queixa de dispneia,

tosse pouco eficaz, espirometria com distúrbio ventilatório restritivo severo (espirometria: capacidade vital forçada: sentado 1,12L/41% do predito e supino 0,91L/33% do predito). Fazia uso do suporte ventilatório não-invasivo (BIPAP).

II.6 – Paciente com 63 anos. Início de aparecimento dos sintomas aos 48 anos. Levantava da cadeira e subia escadas sem compensações. Levantava do chão fazendo apoio no chão e em joelho direito. Apresentava dificuldade para ficar em apoio unipodal, andar em linha reta, andar nos calcanhares, pular em apoio unipodal e agachar, levantar e correr. Fraqueza muscular: cintura escapular = 63,3%, MMSS = 90%, cintura pélvica = 90%, MMII = 100%. Apresenta fraqueza muscular superior e inferior. Na última avaliação neurofuncional aos 61 anos, relatava dificuldade para elevar o braço esquerdo. Havia fraqueza abdominal importante (grau 1) além de atrofia de bíceps e tríceps braquial esquerdo e coxas e panturrilhas levemente aumentadas. Alterações posturais (cifoesciose torácica à esquerda).

II.7 – Paciente com 59 anos. Início de aparecimento dos sintomas aos 43 anos. Fazia compensações para levantar da cadeira, subir escadas e marcha. Não levantava do chão. Relatou queda em dezembro/2015 com fratura vertebral, desde então em uso de andador com rodinhas. Fraqueza muscular: cintura escapular = 46,7%, MMSS = 67,5%, cintura pélvica = 46,7%, MMII = 70%. Apresenta fraqueza muscular superior e inferior. Na última avaliação pneumofuncional aos 57 anos, apresentava fraqueza da musculatura intercostal, tosse pouco eficaz, espirometria com distúrbio ventilatório restritivo severo (espirometria: capacidade vital forçada: sentado 1,06L/36% do predito). Iniciou uso do suporte ventilatório não-invasivo (BIPAP) aos 56 anos. Na última avaliação neurofuncional na mesma época, apresentava hipertrofia de panturrilhas, atrofia de coxas, bíceps e tríceps braquiais. Fraqueza de cervical, abdominais e paravertebrais. Apresentava leve assimetria, sendo hemicorpo esquerdo melhor que direito.

II.8 – Consulente normal.

III.16 – Paciente com 30 anos. Levantava da cadeira e do chão (com dificuldade) sem apoios. Conseguia agachar e levantar com um pouco de dificuldades no movimento. Havia leve báscula de pelve para marcha. Não conseguia pular em apoio unipodal e correr. Fraqueza muscular: cintura escapular = 80%, MMSS = 100%, cintura pélvica = 73,3%, MMII = 100%. Na última avaliação neurofuncional aos 28 anos, apresentava sobrepeso, o qual sempre existiu, de acordo com a paciente. Realizou cirurgia bariátrica aos 26 anos e tratava de

adenoma hipofisário. Referiu a ocorrência de câimbras e fadiga muscular quando anda muito. Apresentava aumento de panturrilhas e leve hipotonia global.

FAMÍLIA 12

Na família número 12, a mutação c.1644G>A +1 no intron 14 foi identificada previamente no paciente afetados em outro centro de diagnóstico. A triagem para esta mutação por Sanger, realizadas neste trabalho, identificou a alteração na irmã (IV.2), mãe (III.2), tia (III.5), avó materna (II.2) e tia-avó materna (II.4) do propositus (IV.3), sendo que irmã e a tia manifestam sinais clínicos.

Figura 2. Heredograma de família (12) afetada por miopatia mitotubular

II.2 – Consulente referida como normal.

II.4 – Consulente referida como normal.

III.2 – Consulente normal em exame clínico

III.5 – Paciente com 33 anos. Levantava do chão sem apoio, porém com sinal de *trendelenburg* em quadril esquerdo (fraqueza de glúteo máximo). Levantava da cadeira sem apoio e subia escadas sem compensações. Marcha com báscula e rotação de quadril. Corria, pulava em apoio unipodal, pulava alto com os dois pés, andava nos calcanhares. Dificuldade para agachar e levantar. Fraqueza muscular: cintura escapular = 93,3%, MMSS = 97,5%, cintura pélvica = 90%, MMII = 100%. Na última avaliação pneumofuncional aos 32 anos, apresentou força da musculatura intercostal preservada, tosse eficaz, espirometria com valores dentro dos limites de normalidade (espirometria: capacidade vital forçada sentado 3,64L/96% do predito). Na última avaliação neurofuncional, negava queixas e dificuldades motoras,

fadiga muscular, quedas e tropeços. Apresentava sobrepeso. Força muscular preservada global (4/5), porém, com mais dificuldade para realização dos testes do quadril

IV.2 – Paciente com 9 anos. Levantava do chão e cadeira sem apoio, subia escadas sem compensações, marcha sem compensações. Corria, agachava, levantava e pulava em apoio unipodal, pulava alto com os dois pés, e andava nos calcanhares. Fraqueza muscular: cintura escapular = 100%, MMSS = 97,6%, cintura pélvica = 97,5%, MMII = 97,5%. Na última avaliação pneumofuncional aos 32 anos, apresentava força da musculatura intercostal preservada, tosse eficaz, espirometria com valores dentro dos limites de normalidade (espirometria: capacidade vital forçada sentado 1,92L/97% do predito). Na última avaliação neurofuncional aos 31 anos, negava dificuldades físicas, dores e fadiga muscular, tropeços e quedas. Apresentava face triangular, olhos afastados, leve ptose palpebral. Leve atrofia distal em região distal da coxa esquerda. Sem alteração de tônus muscular. Frouxidão ligamentar de membros superiores. Sem contraturas articulares. Alterações posturais inespecíficas: leve anteriorização do corpo e da cabeça, ombro direito levemente mais elevado que esquerdo.

4.3. Inativação do X

A análise de desvio de inativação do cromossomo X foi realizada em cinco mulheres heterozigotas identificadas nas famílias 1 (II.3, II.5-8), e em quatro mulheres identificadas na família 12 (II.2, III.1, III.5, IV.2).

A análise da família 1 foi feita previamente com a análise do gene AR por digestão enzimática, e não foi informativa. Neste caso, foi utilizada uma segunda metodologia com base na região repetitiva do gene *FMRI*. Constatou-se que não havia desvio de inativação em 4 das mulheres em que o teste foi informativo.

De quatro mulheres identificadas na família 12 (II.2, III.1, III.5, IV.2), três (II.2, III.1, IV.2) foram informativas para a análise por digestão do gene AR, e observou-se uma inativação aleatória do cromossomo X (Figura 3).

Figura 3. Eletroferogramas gerados a partir da análise do perfil de inativação do cromossomo X em quatro mulheres heterozigotas da família 12.

4.4. Variantes modificadoras do fenótipo

Os exomas completos de nove mulheres das famílias 1 e 12, das quais cinco apresentavam sinais clínicos, foram analisados com objetivo de se identificar variantes modificadoras do fenótipo.

Genes que escapam da inativação do X

Num primeiro momento, os exomas foram analisados após uma filtragem para genes que escapam da inativação do cromossomo X, o que correspondeu a 290 genes. Destes, quando comparados o grupo de manifestantes com não-manifestantes, não foram identificadas variáveis que poderiam justificar o fenótipo.

Genes altamente expressos em músculos esqueléticos

Em seguida, os exomas foram reanalisados após uma filtragem para genes altamente expressos nos músculos esqueléticos, o que correspondeu a 330 genes. Não foram encontradas variantes candidatas em ambas análises.

Comparação de variantes presentes em todas as manifestantes versus ausentes em todas as não-manifestantes.

Uma terceira análise dos exomas completos foi feita, na qual não houve filtragem e exclusão de nenhum gene. Na hipótese em que as mulheres normais apresentassem uma variante protetora do fenótipo, foi realizada uma seleção de filtros, para identificar todas as variantes presentes nas não-manifestantes e ausentes nas heterozigotas manifestantes. Foram obtidas 72 variantes. Na hipótese inversa, em que as mulheres afetadas possuísem uma variante indutora do fenótipo, 32 variantes foram identificadas após as filtrações. Entretanto, em nenhum dos dois cenários, foi possível identificar alguma variante candidata que pudesse ter alguma aparente influência na proteção ou indução do fenótipo.

Curiosamente, na hipótese da existência variantes protetoras, foi encontrado um bloco de 4,2 Mb do cromossomo 19 que estava presente em todas as mulheres normais em heterozigose, mas não nas mulheres manifestantes. O papel deste bloco de genes no fenótipo está em análise.

4.5. Cálculo de penetrância

Para a estimativa da penetrância K em mulheres portadoras, foram utilizadas as duas famílias de mulheres manifestantes do presente trabalho, além de oito famílias relatadas na literatura internacional^(37,54,56-61). As probabilidades das dez estruturas geneaógicas disponíveis, em função da taxa de penetrância, são mostradas na listagem do programa fonte Mathematica imediatamente abaixo e na Tabela 2 mais adiante. O valor estimado foi $K = 0.298239$ (Figura 4).

```
p01 = K^18
p02 = (1-K)^35
p03 = (2-K)^11;
p04 = 1/2 + (1-K)/4
p05 = (1/2 + (1-K)/8)^2
p06 = 1/2 + (1-K)*(2-K)/4
p07 = (1/2 + (1-K)*(2-K)/8)^2
p08 = 1/2 + (1-K)*(2-K)^2/8
p09 = 1/2 + (1-K)*(2-K)^2/16;
p10 = 1/2 + (1-K)*(2-K)/32;
P = p01*p02*p03*p04*p05*p06*p07*p08*p09*p10;
P1 = P*2.5*10^16;
L = Log[P];
dLdK = D[L,K];
Plot[{P1,L,dLdK},{K,0,1},PlotRange->{-200,200},
Frame->True]
FindRoot[dLdK==0,{K,0.5}]
```

Figura 4. Curvas das funções P (azul), L (verde) e dL/dK (vermelho) indicando o valor máximo de K em aproximadamente 30%.

Tabela 2. Estruturas genealógicas e respectivas fórmulas em função de K encontradas nas famílias estudadas

Probabilidade	Estruturas Genealógicas	Formula em função de K	Nº de observações
P01		K	18
P02		$1 - K$	35
P03		$\frac{2 - K}{2}$	11
P04		$\frac{1}{2} + \frac{1 - K}{4}$	1
P05		$\frac{1}{2} + \frac{1 - K}{8}$	2
P06		$\frac{1}{2} + \frac{(1 - K)(2 - K)}{4}$	1
P07		$\frac{1}{2} + \frac{(1 - K)(2 - K)}{8}$	2
P08		$\frac{1}{2} + \frac{(1 - K)(2 - K)^2}{8}$	1
P09		$\frac{1}{2} + \frac{(1 - K)(2 - K)^2}{16}$	1
P10		$\frac{1}{2} + \frac{(1 - K)(2 - K)}{32}$	1

5. DISCUSSÃO

A miopatia miotubular é uma doença neuromuscular grave que ocorre por causa de mutações no gene *MTM1* localizado em Xq28. É a forma mais grave das miopatias congênitas estruturais, manifestando-se em todos os pacientes do sexo masculino portadores de mutações, bem como em uma porcentagem de mulheres heterozigotas de forma mais branda.

Cerca de 300 mutações patogênicas já foram identificadas e descritas no gene *MTM1*. Deste total, as mutações são do tipo *missense/nonsense* (40%), pequenas deleções (18%), *splicing* (16%), pequenas inserções (11%), grandes deleções (10%), e outras alterações com menor frequência, conforme registrado no banco de dados HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>). A correlação genótipo-fenótipo é imprecisa. Entretanto, é observado que pacientes com mutações dos tipos *nonsense*, *splicing* e grandes deleções tendem a apresentar um quadro clínico mais grave.

Tradicionalmente, o diagnóstico da miopatia miotubular e das demais miopatias congênitas estruturais era realizado com base na análise dos achados histológicos de biópsias musculares dos pacientes, nas quais se identificava a existência de fibras pequenas com núcleo central, predominância de fibras do tipo I, concentração de miofibrilas na periferia da fibra e região central ocupada por acúmulos de mitocôndrias e glicogênio. Entretanto, em situações em que a qualidade da biópsia muscular não estava adequada para realização da análise, ou na ausência ou impossibilidade de se obter a biópsia muscular, o diagnóstico mantinha-se inconclusivo em muitos casos. Neste contexto, as técnicas de sequenciamento e sequenciamento de nova geração (*NGS – Next Generation Sequencing*), são ferramentas fundamentais para realização de diagnóstico molecular. Isso se deve ao fato de que o sequenciamento de nova geração tem a capacidade de sequenciar muitos genes (ou o genoma completo no extremo oposto, por exemplo), em uma só reação, o que permite que uma grande quantidade de informações sobre a composição genética de uma pessoa esteja disponível para análise ao mesmo tempo, diferentemente do que acontece nas técnicas de sequenciamento de primeira geração em que o sequenciamento é feito em pequenas partes, em genes únicos candidatos. Além disso, ao associar os achados do *NGS* com o fenótipo de um paciente, o que passou-se a observar é o aumento no espectro de variabilidade clínica que algumas doenças possuem, já que pacientes com quadros mais benignos ou graves, que em um primeiro momento não seriam classificados como afetados por essas doenças com base no exame clínico ou de biópsias, passam a ser incluídos no diagnóstico, pois possuem mutações

patogênicas em genes relacionadas a elas. Essa associação genótipo-fenótipo que foi possibilitada pelo *NGS* se mostra ainda mais relevante nas situações em que são permitidos os diagnósticos de doenças em indivíduos que tradicionalmente não seriam triados por estes genes, por apresentarem um fenótipo diverso do descrito para a doença. De fato, neste trabalho foi reportada uma família em que há somente mulheres com manifestação clínica, e portadoras de mutação previamente descrita como patogênica em um gene que está relacionado a uma doença manifestada por pacientes do sexo masculino, cujo diagnóstico só foi finalizado em virtude da investigação pelo sequenciamento de nova geração.

O Centro de Pesquisas do Genoma Humano e Células Tronco do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo é um centro de referência internacional sobre pesquisa e diagnóstico de doenças genéticas. Neste trabalho, foi feito o diagnóstico molecular de diversas famílias brasileiras que apresentavam suspeita clínica e/ou achados de biópsia muscular sugestivos de miopatia miotubular, e que seguiam/seguem em acompanhamento no centro.

Foram identificadas mutações patogênicas no gene *MTM1* em 12 das 13 famílias estudadas, todas com achados histopatológicos compatíveis com miopatia miotubular. Nas famílias 2 a 11, os probandos eram pacientes do sexo masculino que apresentavam o quadro clínico típico da miopatia miotubular, e cujas mutações foram identificadas por sequenciamento de nova geração e confirmadas por sequenciamento Sanger. Das mutações identificadas nestes probandos, quatro já haviam sido relatadas como patogênicas: c.706 A>T (p.K236X), descrita por Hedberg *et al.*, 2016⁽⁸¹⁾; c.1262 G>A (p.R421Q), descrita por de Gouyon *et al.*, 1997⁽⁸²⁾ em paciente com quadro clínico grave; c.1354 -1 G>C, identificada por Grogan *et al.*, 2005⁽⁵⁶⁾ em paciente do sexo feminino apresentando fenótipo de miopatia miotubular; c.1467 +1 G>A, identificada por Herman *et al.*, 1999⁽⁴¹⁾ em paciente com quadro clínico moderado de miopatia miotubular. Foram identificadas outras 5 diferentes mutações nos probandos das outras famílias: c.139_142 delAAAG, c.1010 G>A (p.W337X), c.1181 A>G (p.D394G), c.1465_1465delC e c.1528 A>T (p.K510X). Até o presente conhecimento, estas mutações não foram descritas previamente.

Através de ferramentas de predição de patogenicidade de mutações e seguindo os critérios de classificação de mutações do *American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)*, as alterações encontradas nos pacientes foram consideradas como causativas do fenótipo apresentado

Foi possível verificar a condição de portadora nas mulheres das famílias 2, 3, 4, 5 e 10, famílias nas quais o DNA estava disponível para análise, e verificou-se que as mulheres das famílias 3 e 4 não eram portadoras. Logo, as mutações nos probandos destas famílias são de *novo*.

A todas essas famílias, foi oferecido aconselhamento genético após a realização do diagnóstico molecular. Nas consultas, as famílias foram informadas sobre aspectos gerais da doença em si e sobre riscos de recorrência quando pertinente.

Já é bem estabelecido que a miopatia miotubular é uma doença que afeta indivíduos do sexo masculino que possuam mutação no gene da miotubularina 1. Neste trabalho, foram identificadas mulheres que apresentavam algum sinal clínico, como fraqueza muscular associada ou não à deficiência respiratória e assimetria. Estas mulheres pertencem a duas famílias diferentes e não relacionadas (1 e 12). A hipótese diagnóstica inicial para as mulheres da família 1 foi de uma distrofia muscular de cinturas recessiva (DMC). Porém, através do sequenciamento de nova geração, não foram identificadas mutações patogênicas em genes relacionados às DMC, mas sim a mutação c.109 C>T (p.R37X) no gene *MTM1* já descrita por Laporte *et al.*, 1997⁽⁸⁰⁾ como patogênica. Já com relação à família 12, já havia sido diagnosticada a mutação patogênica c.1644 +1 G>A, não descrita, no gene *MTM1* em paciente do sexo masculino, e ao fazer a triagem mutacional nas mulheres da família, verificou-se que algumas eram portadoras, e destas também foram identificadas aquelas com sinais clínicos.

Em doenças recessivas ligadas ao X, não é frequente encontrar mulheres heterozigotas com manifestação clínica, uma vez que a existência do alelo normal é suficiente para manter o fenótipo normal. Entretanto, já foram relatadas mulheres heterozigotas para mutações em genes do cromossomo X associados a doenças de padrão de herança recessivo que manifestam sinais clínicos. Um exemplo é a manifestação fenotípica em portadoras de mutações no gene *DMD*, gene que codifica a proteína distrofina, e que está associado a Distrofia Muscular de Duchenne e Becker e cardiomiopatia dilatada em pacientes do sexo masculino portadores de mutações patogênicas. Esta distrofia tem uma incidência bem mais alta, 1;3000 nascimentos masculinos, do que a MTM. Diversos estudos descreveram heterozigotas com manifestação clínica com frequência de 2,5% a 7,8%^(83,84), estendendo-se a 18% quando observado comprometimento cardíaco^(85,86).

Os relatos de mulheres portadoras de miopatia miotubular datam a partir de 1995⁽⁵³⁾, e desde então, pelo menos 26 casos foram identificados^(54–62,87–90). Soma-se a este número as seis mulheres descritas neste trabalho. A identificação de uma quantidade consideravelmente alta de manifestantes é algo que tem chamado atenção, quando se considera que a miopatia miotubular é uma doença rara. Além disso, este número pode ser subestimado, uma vez que é provável que mais casos podem ser subdiagnosticados, seja pela não-associação a um paciente do sexo masculino com quadro de miopatia miotubular típico, seja pela possível variabilidade de quadro clínico, mesmo em meninos afetados.

A principal causa proposta para justificar a manifestação fenotípica em portadoras na miopatia miotubular tem sido o desvio de inativação do cromossomo X. Este mecanismo também é considerado como o responsável pelo quadro clínico nas distrofinopatias, e em outras patologias ligadas ao cromossomo X, como síndrome α -talassemia/deficiência intelectual (ATR-X)⁽⁹¹⁾, disceratose congênita⁽⁹²⁾, síndrome de Barth⁽⁹³⁾, e síndrome de Wiskott-Aldrich⁽⁹⁴⁾. Entretanto, mesmo nas distrofinopatias, esta explicação é defendida por alguns autores que encontraram correlação entre desvio de inativação do X e manifestação clínica^(95–102), enquanto outros, não encontraram desvio de inativação do X em heterozigotas manifestantes MTM^(97,103–105). Uma das várias explicações para essa discordância é a de que a análise de inativação do X realizada em linfócitos sanguíneos não reflete o real estado de inativação presente em todo o organismo, nem qual seria o padrão nas células musculares. Todavia, há trabalhos que mostraram uma boa concordância entre o padrão de inativação entre células musculares e linfócitos sanguíneos por terem origem embrionária comum^(95,106), e que a manifestação de distrofinopatias em heterozigotas se correlaciona melhor com o padrão de inativação do X nas células sanguíneas do que musculares^(103,105,107,108), possivelmente pela existência de mecanismos de normalização bioquímica e genética nas células musculares⁽¹⁰⁸⁾. Além disso, a análise de inativação do X em um músculo não deve ser representativa para todos os músculos, uma vez que as mulheres são naturalmente um mosaico do cromossomo X.

Dos 25 casos de heterozigotas manifestantes de miopatia miotubular publicados, 17 foram informativos a respeito do padrão de inativação do cromossomo X. No total, a inativação foi considerada aleatória em 12 e com desvio em 6 casos. Deve-se considerar que em 16 casos, o teste foi realizado a partir dos linfócitos sanguíneos e 7, realizados no músculo, sendo que em 6 dos casos a análise foi feita tanto no sangue quanto no músculo, e

em um destes casos, houve diferença quando ao desvio no sangue (aleatório) e músculo (desvio).

Nas heterozigotas identificadas neste trabalho, a análise de inativação do X foi informativa em sete, e mostrou desvio aleatório em todas, o que não permitiu fazer uma correlação entre o padrão de inativação e o fenótipo, concordando com os casos que já foram relatados na literatura. Dessa forma, percebe-se que, embora o desvio de inativação do X possa justificar o aparecimento de manifestação clínica em alguns casos, não deve ser a única explicação.

Uma segunda hipótese para a manifestação clínica da miopatia miotubular em heterozigotas seria a interação entre diferentes genes secundários, com o defeito molecular primário, modulando a expressão fenotípica. Essa hipótese é plausível quando são identificadas doenças nas quais um mesmo genótipo está associado a uma variabilidade fenotípica⁽⁶³⁾ ou fenótipos diferentes. De fato, existem doenças nas quais a presença de variantes genômicas tem o efeito de alterar a sua expressão, como já foi reportado na distrofia muscular de Duchenne⁽⁶⁴⁻⁶⁹⁾. A identificação dessas variantes nas mulheres deste trabalho poderia justificar o quadro clínico das manifestantes. Por isso, foram analisados os exomas completos das nove mulheres heterozigotas pertencentes as 2 famílias não relacionadas, sendo 5 manifestantes e 4 não afetadas, buscando por variantes que estivessem presentes naquelas normais e ausentes nas afetadas e vice-versa. A seleção das variantes presentes em um grupo e ausente no outro não permitiu a identificação de uma única variante forte o suficiente para responder a essa questão. Porém, foi identificada uma região de cerca de 4,2 Mb no cromossomo 19 contendo um bloco de genes da família KIR (*killer cell immunoglobulin like receptor*), no qual todas as mulheres normais apresentavam as mesmas variantes, enquanto as mulheres afetadas não apresentavam, independentemente da família, podendo representar um haplótipo que confere proteção fenotípica a estas mulheres. Estes genes estão associados a resposta imunológica e acredita-se que atuem em doenças como artrite reumatoide e no controle da progressão da infecção do HIV. É uma região altamente polimórfica, resultando em uma alta diversidade genética, ao ponto de que a identificação de indivíduos não-aparentados apresentando as mesmas variantes é algo incomum⁽¹⁰⁹⁾, algo que destaca ainda mais a região em virtude do que foi identificado na comparação dos exomas das mulheres heterozigotas.

A identificação e estudo de mulheres heterozigotas manifestantes de fenótipos ligados ao cromossomo X, vem levantando dúvidas sobre a real classificação do fenótipo em recessivo ou dominante. Dobyns, 2006⁽⁷⁰⁾, argumenta sobre o assunto, ao afirmar que as regras modernas de classificação de herança ligada ao X não são capazes de explicar o número elevado de heterozigotas manifestantes de doenças recessivas ligadas ao X. No mesmo trabalho, o autor faz uma revisão de 32 doenças ligadas ao cromossomo X, estimando de forma mais ampla a taxa de penetrância em mulheres. Desta forma, consegue demonstrar que a penetrância é considerada alta em 9, intermediária em 10, e baixa em 13 das 32 doenças. Tal variabilidade na penetrância não poderia ser explicada sob os critérios tradicionais de classificação. Dessa forma, o autor defende que as regras de classificação de modelos de herança ligada ao cromossomo X sejam revistas.

Com relação à miopatia miotubular, foi feita uma revisão bibliográfica em busca de famílias com informações precisas sobre o diagnóstico da doença e a presença de mulheres afetadas. A estas, adicionamos as duas famílias apresentadas neste trabalho. Neste total de onze famílias, foi estimada a taxa de penetrância, obtendo-se um valor K de aproximadamente 30% ($K = 0,298239$). Este resultado está em acordância com o que foi argumentado por Dobyns, 2006⁽⁷⁰⁾, e é compatível com um padrão de penetrância incompleta, a qual poderia justificar perfeitamente a frequência elevada de mulheres afetadas por miopatia miotubular.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo de 12 famílias com miopatia miotubular, identificamos 16 heterozigotas do gene *MTM1*, e observamos uma alta frequência de heterozigotas manifestantes.

O desvio de inativação do X não explica a causa do fenótipo nas mulheres.

O estudo do exoma de 9 heterozigotas, comparando as 5 manifestantes com as 4 não manifestantes permitiu localizar um bloco de genes no cromossomo 19, segregando com o fenótipo, o que sugere um possível efeito protetor nas mulheres heterozigotas normais. Mais esforços são necessários para se determinar o real efeito da região na modulação fenotípica de miopatia miotubular em mulheres.

Calculamos a penetrância desta miopatia em mulheres portadoras em cerca de 30% a partir da análise das duas famílias e os casos descritos na literatura.

Este trabalho reforça a importância e aplicabilidade do uso das novas tecnologias de sequenciamento de nova geração no âmbito do diagnóstico de doenças genéticas, e da importância do aconselhamento genético adequado a famílias que possuam doenças genéticas raras e que ainda necessitam de estudos para serem melhor compreendidas.

REFERÊNCIAS

1. Buckingham, M. Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **16**, 525–532 (2006).
2. Parker, M. H., Seale, P. & Rudnicki, M. A. Looking back to the embryo: Defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 497–507 (2003).
3. Bryson-Richardson, R. J. & Currie, P. D. The genetics of vertebrate myogenesis. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 632–646 (2008).
4. Naya, F. J. & Olson, E. MEF2: A transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 683–688 (1999).
5. Vainzof, M. & Zatz, M. Protein defects in neuromuscular diseases. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **36**, 543–555 (2003).
6. North, K. N. *et al.* Approach to the diagnosis of congenital myopathies. *Neuromuscul. Disord.* **24**, 97–116 (2014).
7. Laing, N. G. & Wallgren-Pettersson, C. 161st ENMC International Workshop on nemaline myopathy and related disorders, Newcastle upon Tyne, 2008. *Neuromuscul. Disord.* **19**, 300–305 (2009).
8. Nowak, K. J. *et al.* Mutations in the skeletal muscle alpha-actin gene in patients with actin myopathy and nemaline myopathy. *Nat. Genet.* **23**, 208–12 (1999).
9. Goebel, H. H. *et al.* Infantile intranuclear rod myopathy. *J. Child Neurol.* **12**, 22–30 (1997).
10. Bornemann, A., Petersen, M. B. & Schmalbruch, H. Fatal congenital myopathy with actin filament deposits. *Acta Neuropathol.* **92**, 104–108 (1996).
11. Zvaritch, E. *et al.* Ca²⁺ dysregulation in Ryr1I4895T/wt mice causes congenital myopathy with progressive formation of minicores, cores, and nemaline rods. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 21813–21818 (2009).
12. Amburgey, K. *et al.* Prevalence of congenital myopathies in a representative pediatric united states population. *Ann. Neurol.* **70**, 662–665 (2011).

13. Dubowitz, V. & Everson Pearse, A. G. Oxidative Enzymes and Phosphorylase in Central-Core Disease of Muscle. *Lancet* **276**, 23–24 (1960).
14. Dubowitz, V. & Roy, S. Central core disease of muscle: Clinical, histochemical and electron microscopic studies of an affected mother and child. *Brain* **93**, 133–146 (1970).
15. Engel, W. K., Foster, J. B., Hughes, B. P., Huxley, H. E. & Mahler, R. Central core disease-an investigation of a rare muscle cell abnormality. *Brain* **84**, 167–185 (1961).
16. Jungbluth, H. Central core disease. *Orphanet J. Rare Dis.* **2**, (2007).
17. Gamble, J. G., Rinsky, L. A. & Lee, J. H. Orthopaedic aspects of central core disease. *J. Bone Jt. Surg. - Ser. A* **70**, 1061–1066 (1988).
18. Wu, S. *et al.* Central core disease is due to RYR1 mutations in more than 90% of patients. *Brain* **129**, 1470–1480 (2006).
19. Scoto, M. *et al.* SEPN1-related myopathies: Clinical course in a large cohort of patients. *Neurology* **76**, 2073–2078 (2011).
20. Sei, Y. *et al.* Malignant hyperthermia in North America: genetic screening of the three hot spots in the type I ryanodine receptor gene. *Anesthesiology* **101**, 824–830 (2004).
21. Ryan, M. M. *et al.* Nemaline myopathy: A clinical study of 143 cases. *Ann. Neurol.* **50**, 312–320 (2001).
22. Pelin, K. *et al.* Mutations in the nebulin gene associated with autosomal recessive nemaline myopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 2305–10 (1999).
23. Laing, N. G. *et al.* A mutation in the α tropomyosin gene TPM3 associated with autosomal dominant nemaline myopathy. *Nat. Genet.* **9**, 75–79 (1995).
24. Donner, K. *et al.* Mutations in the β -tropomyosin (TPM2) gene - A rare cause of nemaline myopathy. *Neuromuscul. Disord.* **12**, 151–158 (2002).
25. Johnston, J. J. *et al.* A Novel Nemaline Myopathy in the Amish Caused by a Mutation in Troponin T1. *Am. J. Hum. Genet.* **67**, 814–821 (2000).
26. Agrawal, P. B. *et al.* Nemaline Myopathy with Minicores Caused by Mutation of the CFL2 Gene Encoding the Skeletal Muscle Actin-Binding Protein, Cofilin-2. *Am. J.*

- Hum. Genet.* **80**, 162–167 (2007).
27. Sambuughin, N. *et al.* Dominant mutations in KBTBD13, a member of the BTB/Kelch family, cause nemaline myopathy with cores. *Am. J. Hum. Genet.* **87**, 842–847 (2010).
 28. Spiro, A. J., Shy, G. M. & Gonatas, N. K. Myotubular Myopathy: Persistence of Fetal Muscle in an Adolescent Boy. *Arch. Neurol.* **14**, 1–14 (1966).
 29. Sher, J. H., Rimalovski, A. B., Athanassiades, T. J. & Aronson, S. M. Familial centronuclear myopathy A clinical and pathological study. *Neurology* **17**, 727–727 (1967).
 30. Bitoun, M. *et al.* Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nat. Genet.* **37**, 1207–1209 (2005).
 31. Nicot, A. S. *et al.* Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nat. Genet.* **39**, 1134–1139 (2007).
 32. Claeys, K. G. & Bo, J. Clinical / Scientific Notes PHENOTYPE OF A PATIENT WITH RECESSIVE. *Neurology* 519–523 (2010).
 33. Teeuw, A. H., Barth, P. G., van Sonderen, L. & Zondervan, H. A. [3 examples of fetal genetic neuromuscular disorders which lead to hydramnion]. *Ned Tijdschr Geneeskde* (1993).
 34. Wijngaarden, G. K. Van, Fleury, P., Bethlem, J., Meijer, A. E. F. H. & Ph, D. Familial “myotubular” myopathy f. **19**, 901–908 (1969).
 35. Meyers, K. R., Golomb, H. M., Hansen, J. L. & McKusick, V. A. Familial neuromuscular disease with “myotubes“. *Clin. Genet.* **5**, 327–337 (1974).
 36. Amber, M. W. *et al.* X-linked recessive myotubular myopathy: I. Clinical and pathologic findings in a family. *Hum. Pathol.* **15**, 566–574 (1984).
 37. Heckmatt, J. Z., Sewry, C. A., Hodes, D. & Dubowitz, V. Congenital centronuclear (myotubular) myopathy: A clinical, pathological and genetic study in eight children. *Brain* (1985). doi:10.1093/brain/108.4.941
 38. Keppen, L. D., Husain, M. M. & Woody, R. C. X-linked myotubular myopathy: intrafamilial variability and normal muscle biopsy in a heterozygous female. *Clin.*

- Genet.* **32**, 95–99 (1987).
39. Oldfors, A., Kyllerman, M., Wahlström, J., Darnfors, C. & Henriksson, K. G. X-linked myotubular myopathy: clinical and pathological findings in a family. *Clin. Genet.* **36**, 5–14 (1989).
 40. Braga, S. E. *et al.* Severe neonatal asphyxia due to X-linked centronuclear myopathy. *Eur. J. Pediatr.* **150**, 132–135 (1990).
 41. Herman, G. E., Finegold, M., Zhao, W., De Gouyon, B. & Metzenberg, A. Medical complications in long-term survivors with X-linked myotubular myopathy. *J. Pediatr.* **134**, 206–214 (1999).
 42. Yu, S. *et al.* X-linked myotubular myopathy in a family with three adult survivors. *Clin. Genet.* **64**, 148–152 (2003).
 43. Laporte, J. *et al.* A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nat. Genet.* **13**, 175–182 (1996).
 44. Laporte, J. *et al.* MTM1 mutations in X-linked myotubular myopathy. *Hum. Mutat.* **15**, 393–409 (2000).
 45. Herman, G. E. *et al.* Characterization of mutations in fifty North American patients with X-linked myotubular myopathy. *Hum. Mutat.* **19**, 114–121 (2002).
 46. Biancalana, V. *et al.* Characterisation of mutations in 77 patients with X-linked myotubular myopathy, including a family with a very mild phenotype. *Hum Genet* **112**, 135–142 (2003).
 47. Tsai, T. C. *et al.* Characterization of MTM1 mutations in 31 Japanese families with myotubular myopathy, including a patient carrying 240 kb deletion in Xq28 without male hypogonadism. *Neuromuscul. Disord.* **15**, 245–252 (2005).
 48. Al-Qusairi, L. *et al.* T-tubule disorganization and defective excitation-contraction coupling in muscle fibers lacking myotubularin lipid phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 18763–18768 (2009).
 49. Dowling, J. J. *et al.* Loss of myotubularin function results in T-tubule disorganization in zebrafish and human myotubular myopathy. *PLoS Genet.* **5**, (2009).

50. Zou, W. *et al.* Caenorhabditis elegans myotubularin MTM-1 negatively regulates the engulfment of apoptotic cells. *PLoS Genet.* **5**, (2009).
51. Neukomm, L. J. *et al.* The phosphoinositide phosphatase MTM-1 regulates apoptotic cell corpse clearance through CED-5-CED-12 in C. elegans. *Development* **138**, 2003–2014 (2011).
52. Hnia, K. *et al.* Myotubularin controls desmin intermediate filament architecture and mitochondrial dynamics in human and mouse skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* **121**, 70–85 (2011).
53. Dahl, N. *et al.* Myotubular Myopathy in a Girl with a Deletion at Xq27-q28 and Unbalanced X Inactivation Assigns the MTM1 Gene to a 600kb Region. *Am. J. Hum. Genet.* **56**, 1108–1115 (1995).
54. Tanner, S. M. *et al.* Skewed X-inactivation in a manifesting carrier of X-linked myotubular myopathy and in her non-manifesting carrier mother. *Hum. Genet.* **104**, 249–253 (1999).
55. Jungbluth, H. *et al.* Early and severe presentation of X-linked myotubular myopathy in a girl with skewed X-inactivation. *Neuromuscul. Disord.* **13**, 55–59 (2003).
56. Grogan, P. M. *et al.* Myopathy with skeletal asymmetry and hemidiaphragm elevation is caused by myotubularin mutations. *Neurology* **64**, 1638–1640 (2005).
57. Drouet, A. *et al.* Expression hémicorporelle d’une myopathie myotubulaire liée à l’X (XLMTM) chez deux des trois femmes conductrices d’une même famille sans cas masculin. *Rev. Neurol. (Paris)*. **164**, 169–176 (2008).
58. Hammans, S. R. *et al.* A clinical and genetic study of a manifesting heterozygote with X-linked myotubular myopathy. *Neuromuscul. Disord.* **10**, 133–137 (2000).
59. Sutton, I. J., Winer, J. B., Norman, A. N., Liechti-Gallati, S. & MacDonald, F. Limb girdle and facial weakness in female carriers of x-linked myotubular myopathy mutations. *Neurology* **57**, 900–902 (2001).
60. Péniisson-Besnier, I., Biancalana, V., Reynier, P., Cossée, M. & Dubas, F. Diagnosis of myotubular myopathy in the oldest known manifesting female carrier: A clinical and genetic study. *Neuromuscul. Disord.* **17**, 180–185 (2007).

61. Hedberg, C., Lindberg, C., Máthé, G., Moslemi, A. R. & Oldfors, A. Myopathy in a woman and her daughter associated with a novel splice site MTM1 mutation. *Neuromuscul. Disord.* **22**, 244–251 (2012).
62. Savarese, M. *et al.* Novel findings associated with MTM1 suggest a higher number of female symptomatic carriers. *Neuromuscul. Disord.* **26**, 292–299 (2016).
63. Zatz, M. *et al.* Milder course in Duchenne patients with nonsense mutations and no muscle dystrophin. *Neuromuscul. Disord.* **24**, 986–989 (2014).
64. Pegoraro, E. *et al.* SPP1 genotype is a determinant of disease severity in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* **76**, 219–226 (2011).
65. Flanigan, K. M. *et al.* LTBP4 genotype predicts age of ambulatory loss in duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* **73**, 481–488 (2013).
66. Swaggart, K. A. *et al.* Annexin A6 modifies muscular dystrophy by mediating sarcolemmal repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 6004–6009 (2014).
67. Bello, L. *et al.* Genetic modifiers of ambulation in the cooperative international Neuromuscular research group Duchenne natural history study. *Ann. Neurol.* **77**, 684–696 (2015).
68. Van Den Bergen, J. C. *et al.* Validation of genetic modifiers for Duchenne muscular dystrophy: A multicentre study assessing SPP1 and LTBP4 variants. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **86**, 1060–1065 (2015).
69. Vieira, N. M. *et al.* Jagged 1 Rescues the Duchenne Muscular Dystrophy Phenotype. *Cell* **163**, 1204–1213 (2015).
70. Dobyns, W. B. The pattern of inheritance of X-linked traits is not dominant or recessive, just X-linked. *Acta Paediatr. Int. J. Paediatr.* **95**, 11–15 (2006).
71. Wang, C. H. *et al.* Consensus statement on standard of care for congenital myopathies. *J. Child Neurol.* **27**, 363–382 (2012).
72. Mercuri, E., Sewry, C., Brown, S. C. & Muntoni, F. Congenital muscular dystrophies. *Semin. Pediatr. Neurol.* **9**, 120–131 (2002).
73. Engel, A., Shen, X., Selcen, D. & Sine, S. Congenital myasthenic syndromes. *Lancet Neurol.* **14**, 420–434 (2015).

74. Jungbluth, H., Wallgren-Pettersson, C. & Laporte, J. Centronuclear (myotubular) myopathy. *Orphanet J. Rare Dis.* **3**, 1–13 (2008).
75. Romero, N. B. Centronuclear myopathies: A widening concept. *Neuromuscul. Disord.* **20**, 223–228 (2010).
76. Harper, P. S. Congenital myotonic dystrophy in Britain. *Arch. Dis. Child.* **50**, 505–513 (1975).
77. Allen, R. C., Zoghbi, H. Y., Moseley, I. A. B. & Rosenblatt, H. M. Methylation of HpaII and HhaI Sites Near the Polymorphic CAG Repeat in the Human Androgen-Receptor Gene Correlates with X Chromosome Inactivation. *Am. J. Hum. Genet.* **51**, 1229–1239 (1992).
78. Bittel, D. C. *et al.* Comparison of X-chromosome inactivation patterns in multiple tissues from human females. *J. Med. Genet.* **45**, 309–313 (2008).
79. Otto, P. A. & Horimoto, A. R. V. R. Penetrance rate estimation in autosomal dominant conditions. *Genet. Mol. Biol.* **35**, 583–588 (2012).
80. Laporte, J. *et al.* Mutations in the MTM1 gene implicated in X-linked myotubular myopathy. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 1505–1511 (1997).
81. Hedberg, M. L. *et al.* Genetic landscape of metastatic and recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *J. Clin. Invest.* **126**, 169–180 (2016).
82. De Gouyon, B. M. *et al.* Characterization of mutations in the myotubularin gene in twenty six patients with X-linked myotubular myopathy. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 1499–1504 (1997).
83. Moser, H., Emery, E. H. & Hospital, W. G. The manifesting carrier in Duchenne muscular dystrophy. *Clin. Genet.* **5**, 271–284 (1974).
84. Norman, A. & Harper, P. A survey of manifesting carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy in Wales. *Clin. Genet.* **6**, 31–37 (1989).
85. Hoogerwaard, E. M., Wouw, P. A. Van Der, Wilde, A. A. M., Bakker, E. & Ippel, P. F. Cardiac involvement in carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* **9**, 347–351 (1999).
86. Grain, L. *et al.* Cardiac abnormalities and skeletal muscle weakness in carriers of

- Duchenne and Becker muscular dystrophies and controls. *Neuromuscul. Disord.* **11**, 186–191 (2001).
87. Bevilacqua, J. A. *et al.* “Necklace” fibers, a new histological marker of late-onset MTM1-related centronuclear myopathy. *Acta Neuropathol.* **117**, 283–291 (2009).
 88. Fattori, F. *et al.* Centronuclear myopathies : genotype – phenotype correlation and frequency of defined genetic forms in an Italian cohort. (2015). doi:10.1007/s00415-015-7757-9
 89. Felice, K. J., Whitaker, C. H. & Wu, Q. Whole exome sequencing discloses a pathogenic MTM1 gene mutation and ends the diagnostic odyssey in an older woman with a progressive and seemingly sporadic myopathy : Case report and literature review of MTM1 manifesting female carriers. *Neuromuscul. Disord.* **28**, 339–345 (2018).
 90. Schara, U., Kress, W., Tücke, J. & Mortier, W. X-linked myotubular myopathy in a female infant caused by a new MTM1 gene mutation. *Neurology* **60**, 1363–1365 (2003).
 91. Gibbons, R. J., Suthers, G. K., Wilkie, A. O., Buckle, V. J. & Higgs, D. R. X-linked α -Thalassemia/Mental Retardation (ATR-X) Syndrome: Localization. *Am. J. Hum. Genet.* **51**, 1136–1149 (1992).
 92. Devriendt, K. *et al.* Skewed X-chromosome inactivation in female carriers of dyskeratosis congenita. *Am. J. Hum. Genet.* **60**, 581–587 (1997).
 93. Ørstavik, K. H. *et al.* X Chromosome Inactivation in Carriers of Barth Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **63**, 1457–1463 (1998).
 94. Fearon, E. R., Kohn, D. B., Winkelstein, J. A., Vogelstein, B. & Blaese, R. M. Carrier detection in the Wiskott Aldrich syndrome. *Blood* **72**, 1735–1739 (1988).
 95. Azofeifa, J., Voit, T., Hübner, C. & Cremer, M. X-chromosome methylation in manifesting and healthy carriers of dystrophinopathies: concordance of activation ratios among first degree female relatives and skewed inactivation as cause of the affected phenotypes. *Hum. Genet.* **96**, 167–176 (1995).
 96. Yoshioka, M., Yorifuji, T. & Mituyoshi, I. Skewed X inactivation in manifesting carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Clin. Genet.* **53**, 102–7 (1998).

97. Soltanzadeh, P. *et al.* Clinical and genetic characterization of manifesting carriers of DMD mutations. *Neuromuscul. Disord.* **20**, 499–504 (2010).
98. Seemann, N. *et al.* Symptomatic dystrophinopathies in female children. *Neuromuscul. Disord.* **21**, 172–177 (2011).
99. Juan-Mateu, J. *et al.* Prognostic value of X-chromosome inactivation in symptomatic female carriers of dystrophinopathy. *Orphanet J. Rare Dis.* **7**, 82 (2012).
100. Viggiano, E., Picillo, E., Cirillo, A. & Politano, L. Comparison of X-chromosome inactivation in Duchenne muscle/myocardium-manifesting carriers, non-manifesting carriers and related daughters. *Clin. Genet.* **84**, 265–270 (2013).
101. Viggiano, E., Ergoli, M., Picillo, E. & Politano, L. Determining the role of skewed X-chromosome inactivation in developing muscle symptoms in carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Genet.* **135**, 685–698 (2016).
102. Viggiano, E. *et al.* Skewed X-chromosome inactivation plays a crucial role in the onset of symptoms in carriers of Becker muscular dystrophy. *J. Gene Med.* **19**, e2952 (2017).
103. Bushby, K. M. D. *et al.* Variability in clinical, genetic and protein abnormalities in manifesting carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* **3**, 57–64 (1993).
104. Sumita, D. R. *et al.* Absence of correlation between skewed X inactivation in blood and serum creatine-kinase levels in Duchenne/Becker female carriers. *Am. J. Med. Genet.* **80**, 356–361 (1998).
105. Brioschi, S. *et al.* Genetic characterization in symptomatic female DMD carriers: lack of relationship between X-inactivation, transcriptional DMD allele balancing and phenotype. *BMC Med. Genet.* **13**, (2012).
106. Fialkow, P. J. Primordial cell pool size and lineage relationships of five human cell types. *Ann. Hum. Genet.* **37**, 39–48 (1973).
107. Matthews, P. M. *et al.* Muscle X-inactivation patterns and dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy carriers. *Neuromuscul. Disord.* **5**, 209–220 (1995).
108. Pegoraro, E. *et al.* Genetic and biochemical normalization in female carriers of Duchenne muscular dystrophy : **45**, 677–690 (1995).

109. Shilling, H. G. *et al.* Allelic Polymorphism Synergizes with Variable Gene Content to Individualize Human KIR Genotype. *J. Immunol.* **168**, 2307–2315 (2002).