Osório Lopes Abath Neto

**Estudo clínico, histológico e molecular da
miopatia centronuclear**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção de título de Doutor em Ciências

Programa de Neurologia

Orientador: Prof. Dr. Edmar Zanoteli

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Abath Neto, Osório Lopes

Estudo clínico, histológico e molecular da miopatia centronuclear / . --
São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Neurologia.

Orientador: Edmar Zanoteli.

Descritores: 1.Miopatias congênitas estruturais 2.Hipotonia muscular
3.Biópsia 4.Dinamina II 5.Canal de liberação de cálcio do receptor de
rianodina 6.Exoma 7.Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala

USP/FM/DBD-288/14

Dedicatória

Aos pacientes

Agradecimentos especiais

Ao Dr. Edmar, meu muito obrigado pela oportunidade concedida, confiança permanente, desprendimento intelectual e condução sempre lúcida e honesta dos meus passos neste trabalho, além da amizade construída nestes anos.

Ao Dr. Jocelyn, agradeço a experiência do contato com um instigante novo mundo, virgem de descobertas, e pelas lições sobre como desbravá-lo.

À CAPES, pelo apoio financeiro durante o período de Doutorado sanduíche no exterior, essencial para a condução tranquila das atividades.

Aos Drs. Ana Beatriz Perez, Chong Kim e Fernando Kok, pela disponibilidade e comentários que ajudaram a melhorar esta tese.

A Tici, meu amor e meu Yang, pela renúncia, e por ter tornado esses anos mais intensos e felizes.

Parafraseando minha irmã, Márcia, a meus pais, a quem devo “meu lado bom”. Também por todo o apoio material e espiritual, a despeito da distância e da saudade.

Agradeço ainda a todos aqueles que deram seu contributo para este trabalho, por diversas razões e em vários momentos: Dra. Umbertina, Dr. Acary, Dr. Gerson, Dr. João Bosco, Marlene, Thais, Cida, Eliene, Jessica, Marina, Thiago, Cristiane, Livia, Marco, Leo, Dra. Mary, Eduardo, Dra. Katia, Johann, Catherine, Christine, Olivier, Nicolas, Valérie, Jean.

*“Adormeci e sonhei que a vida era alegria;
Despertei e vi que a vida era serviço;
Servi e vi que o serviço era alegria”*

Rabindranath Tagore

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento dessa publicação:

Referências - adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos de periódicos de acordo com *List of Journals indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	3
1.1 MTM Ligada ao X.....	4
1.2. MCN de Herança Autossômica Dominante	6
1.3. MCN de Herança Autossômica Recessiva	9
1.4. Outras Formas de MCN	10
1.5 Considerações sobre os mecanismos moleculares da MCN	11
1.5. Justificativa	15
2 OBJETIVOS.....	19
3 PACIENTES E MÉTODOS	23
3.1 Pacientes	25
3.2 Métodos	26
3.2.1 Análise histológica.....	26
3.2.2 Avaliação clínica.....	27
3.2.3 Extração de DNA.....	28
3.2.4 Sequenciamento do gene <i>MTM1</i>	28
3.2.5 Sequenciamento do gene <i>DNM2</i>	30
3.2.6 Sequenciamento do gene <i>BIN1</i>	32
3.2.7 MLPA.....	33
3.2.8 Estudo de inativação do X.....	35
3.2.9 Sequenciamento de exoma.....	35
3.2.10 Confirmação de variantes detectadas na análise de exoma.....	41
4 RESULTADOS.....	45
4.1 Famílias com mutação no gene <i>MTM1</i>	49

4.1.1 Família 1.1.....	50
4.1.2 Família 1.2.....	51
4.1.3 Família 1.3.....	52
4.1.4 Família 1.4.....	54
4.1.5 Família 1.5.....	55
4.1.6 Família 1.6.....	56
4.1.7 Família 1.7.....	57
4.2 Famílias com mutação no gene <i>DNM2</i>	64
4.2.1 Família 2.1.....	64
4.2.2 Família 2.2.....	66
4.3 Famílias com mutação no gene <i>RYS1</i>	69
4.3.1 Família 3.1.....	70
4.3.2 Família 3.2.....	71
4.3.3 Família 3.3.....	73
4.3.4 Família 3.4.....	75
4.3.5 Família 3.5.....	76
4.3.6 Família 3.6.....	77
4.3.7 Família 3.7.....	79
4.4 Famílias com outros diagnósticos moleculares.....	82
4.4.1 Família 4.1.....	83
4.4.2 Família 4.2.....	84
4.4.3 Família 4.3.....	85
4.4.4 Família 4.4.....	86
4.4.5 Família 4.5.....	87
5 DISCUSSÃO	91
6 CONCLUSÕES	103
ANEXOS	107
ANEXO A - Aprovação da comissão de ética.....	107
ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido	108
REFERÊNCIAS.....	117

LISTA DE SIGLAS

ATPase	Adenosina trifosfatase
BAM	Do inglês, binary alignment map
BiPAP	Do inglês, bilevel positive airway pressure
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CNG	Do francês, Centre National de Génotypage
COX	Citocromo oxidase
CPK	Creatina fosfoquinase
CVF	Capacidade vital forçada
DM	Distrofia miotônica
DM1	Distrofia miotônica tipo 1
DNA	Do inglês, deoxyribonucleic acid
DNPM	Desenvolvimento neuropsicomotor
dNTP	Deoxinucleotídeo trifosfato
ENMG	Eletroneuromiografia
EVS	Do inglês, Exome Variant Server
FMUSP	Faculdade de Medicina da USP
GO	Tricrômico de Gömöri
GTPase	Guanina trifosfatase
HE	Hematoxilina e eosina
HGMD	Do inglês, Human Genome Mutation Database
HLA	Do inglês, human leukocyte antigen
IGBMC	Do francês, Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire
IOT	Intubação orotraqueal
LIM	Laboratório de Investigações Médicas
LOVD	Do inglês, Leiden Open Variation Database
MCN	Miopatia centronuclear
MIM	Do inglês, Mendelian Inheritance in Men
MLPA	Do inglês, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MRC	Do inglês, Medical Research Council

MTM	Miopatia miotubular
NADH-TR	Nicotinamida adenina trinucleotídeo tetrazolium redutase
NHC	Do francês, Nouvel Hôpital Civil
NHLBI	Do inglês, National Heart, Lung and Blood Institute
OMIM	Do inglês, Online Mendelian Inheritance in Men
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORO	Do inglês, Oil Red O
PAS	Do inglês, periodic acid Schiff
PCR	Do inglês, polymerase chain reaction
RNAm	Do inglês, messenger ribonucleic acid
SDH	Succinato desidrogenase
SQL	Do inglês, Standard Query Language
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
UTI	Unidade de terapia intensiva
VCF	Do inglês, Variant Call Format

LISTA DE ABREVIATURAS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
pmol	Picomolar
U	Unidade de medida

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Domínios da proteína dinamina-2	7
Figura 2. Representação simplificada do acoplamento excitação-contração ..	12
Figura 3. Modelo de interação entre as principais proteínas envolvidas na MCN	14
Figura 4. Sequência de etapas da metodologia empregada neste estudo	24
Figura 5. Heredogramas das famílias com mutações no gene <i>MTM1</i>	49
Figura 6. Características clínicas dos pacientes com MTM	59
Figura 7. Aspectos faciais dos pacientes com MTM	60
Figura 8. Histologia da MTM	61
Figura 9. Histologia da MTM na reação oxidativa NADH-TR	62
Figura 10. Probando da família 1.7, portadora manifestante com macrodeleção no gene <i>MTM1</i>	63
Figura 11. Heredogramas das famílias com mutações no gene <i>DNM2</i>	64
Figura 12. Pacientes com miopatia centronuclear e mutações no gene <i>DNM2</i>	67
Figura 13. Histologia da MCN por mutações no gene <i>DNM2</i>	68
Figura 14. Heredogramas das famílias com mutações no gene <i>RYR1</i>	69
Figura 15. Alterações esqueléticas em pacientes com mutações no gene <i>RYR1</i>	80
Figura 16. Histologia da MCN por mutações no gene <i>RYR1</i>	81
Figura 17. Heredograma das famílias com mutações em outros genes ou sem diagnóstico molecular	82
Figura 18. Modelagem tridimensional da dinamina-2	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de oligonucleotídeos usados para amplificação dos 15 exons do gene <i>MTM1</i>	29
Tabela 2. Lista de oligonucleotídeos para amplificação dos 5 exons do gene <i>DNM2</i>	31
Tabela 3. Lista de oligonucleotídeos para amplificação de 15 exons do gene <i>BIN1</i>	32
Tabela 4. Aspectos clínicos das famílias com MCN	46
Tabela 5. Resultados da análise histológica dos pacientes com MCN	47
Tabela 6. Mutações encontradas nas famílias com MCN	48

RESUMO

Abath Neto O. **Estudo clínico, histológico e molecular da miopatia centronuclear** [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Introdução: A miopatia centronuclear é uma doença muscular congênita com apresentação clínica heterogênea, caracterizada histologicamente pela proeminência de fibras musculares com núcleos centralizados. Três formas são reconhecidas: neonatal grave, com herança ligada ao X e envolvimento do gene *MTM1*; autossômica dominante, com início geralmente tardio e curso mais leve, associada a mutações no gene *DNM2*; e autossômica recessiva, com gravidade intermediária entre as outras formas e envolvimento dos genes *BIN1*, *RYR1* ou *TTN*. Apesar da identificação dos principais genes responsáveis pela doença, os métodos usuais de diagnóstico genético não encontram mutações em cerca da metade dos casos. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi a caracterização clínica, histológica e molecular de pacientes brasileiros portadores de miopatia centronuclear. **Métodos:** Laudos de dois bancos de biópsia muscular foram usados para identificar pacientes com diagnóstico de miopatia centronuclear nos últimos dez anos. As lâminas das biópsias foram revisadas e analisadas, e as famílias correspondentes convocadas para aplicação de protocolo clínico e coleta de sangue periférico para extração de DNA genômico. As famílias foram estudadas para os genes conhecidos por sequenciamento Sanger, MLPA, painel de genes implicados em doenças neuromusculares ou sequenciamento de exoma. **Resultados:** Foram convocados 24 pacientes provenientes de 21 famílias, em 16 das quais foi possível estabelecer o diagnóstico molecular. As 7 famílias com a forma neonatal grave constituíam um grupo homogêneo clínica e histologicamente, e mutações novas e conhecidas foram encontradas no gene *MTM1* em 6 destas. Dois meninos deste grupo, com evolução estável, tiveram óbito súbito por choque hipovolêmico subsequente a rompimento de cisto hepático. O gene *MTM1* também foi implicado em uma menina portadora manifestante, com quadro mais leve, na forma de uma macrodeleção em heterozigose, detectada por MPLA. Duas famílias em cuja histologia foram encontradas fibras com aspecto em “roda de carroça” apresentaram mutações no gene *DNM2*, uma das quais, p.Phe372Cys, nunca havia sido descrita. Em 7 famílias, o gene *RYR1* foi o responsável, em todas sob a forma de heterozigose composta, com 14 mutações, das quais 13 novas, encontradas ao longo de todo o gene. Este grupo, apesar de heterogêneo clinicamente, apresentou em comum a presença de falhas focais na atividade oxidativa das fibras musculares na maioria dos indivíduos. O gene *TTN* está provavelmente implicado em uma família com um único afetado, no qual o sequenciamento de exoma mostrou mutação nula em heterozigose composta. Nesta coorte de pacientes brasileiros, não houve famílias com alterações no gene *BIN1*, e três famílias seguem sem diagnóstico molecular, com prováveis novos genes implicados. **Conclusões:** Os achados clínicos e histológicos de pacientes brasileiros com miopatia centronuclear seguem os padrões descritos na literatura, e em conjunto podem direcionar o estudo molecular adequado. Nesta coorte de pacientes, o gene *RYR1*, estudado por sequenciamento de alto débito de exoma, foi o mais frequentemente acometido, sugerindo que sua implicação na miopatia centronuclear vem sendo subestimada. Novas mutações encontradas nos genes *MTM1*, *DNM2* e *RYR1* contribuíram para confirmar regiões de patogenicidade e ampliar o espectro de alterações nestes genes.

Descritores: 1. Miopatia Centronuclear; 2. Hipotonia Muscular; 3. Biópsia; 4. Dinamina II; 5. Canal de liberação de cálcio do receptor de rianodina; 6. Exoma; 7. Sequenciamento de Nucleotídeos em Larga Escala.

ABSTRACT

Abath Neto O. **A clinical, histological and molecular study of centronuclear myopathy** [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014".

Introduction: Centronuclear myopathy is a heterogeneous congenital muscle disease, characterized by the prominence of centralized nuclei in muscle fibers. Three disease forms are recognized: a severe neonatal, X-linked form caused by mutations in the *MTM1* gene; an autosomal dominant, late-onset milder form, associated to the *DNM2* gene; and an autosomal recessive form, with intermediate severity, so far with the *BIN1*, *RYR1* or *TTN* genes implicated. In spite of the identification of these genes, usual molecular diagnostic methods don't yield a molecular diagnosis in about half of cases. **Objectives:** The aim of this work was to study clinical, histological, and molecular aspects of centronuclear myopathy Brazilian patients. **Methods:** Reports taken from two muscle biopsy banks were used to identify centronuclear myopathy patients in the last ten years. Biopsy slides were reviewed and analyzed, and corresponding families recruited to apply a clinical protocol and to draw peripheral blood to extract genomic DNA. Families were studied for known genes via Sanger sequencing, MLPA, panel of genes implicated in neuromuscular diseases, or exome sequencing. **Results:** Twenty-four patients out of 21 families were recruited, and in 16 families molecular diagnosis was established. The 7 families with the severe neonatal form amounted to a clinically and histologically homogeneous group, and mutations, both known and novel, were found in the *MTM1* gene in 6 of these. Two boys of this group, with a stable course, died suddenly of hypovolemic shock due to a hepatic cyst rupture. The *MTM1* gene was also implicated in the case of a mild manifesting carrier girl with a heterozygous macrodeletion detected via MLPA. Two families whose histology contained fibers with a "spoke of wheels" aspect had mutations in the *DNM2* gene, one of which, p.Phe372Cys, had never been described. In 7 families, the *RYR1* gene was the culprit, in all of them in a compound heterozygous state, with 14 mutations, 13 of which novel, found throughout the length of the gene. This group, despite clinically heterogeneous, had in common the presence of focal disruptions in the oxidative activity of muscle fibers in the majority of individuals. The *TTN* gene is probably implicated in a family with a single affected, whose exome sequencing showed compound heterozygous null mutations. In this cohort of Brazilian patients, no family was found to have alterations in the *BIN1* gene, and three families remain without molecular diagnosis, with probable new implicated genes. **Conclusions:** Clinical and histological findings of Brazilian patients with centronuclear myopathy follow patterns already described in the literature, and taken as a whole can direct the adequate molecular study. In this patient cohort, the *RYR1* gene, sequenced through high-throughput techniques, was the most frequently involved, suggesting that its implication in centronuclear myopathy is underestimated. Novel mutations found in the *MTM1*, *DNM2* and *RYR1* genes contributed to confirm pathogenic regions and expand the spectrum of alterations in these genes.

Descriptors: 1. Myopathies, structural, congenital; 2. Muscle hypotonia; 3. Biopsy; 4. Dynamin II; 4. Ryanodine receptor calcium release channel; 6. Exome; 7. High-throughput nucleotide sequencing

1 INTRODUÇÃO

A miopatia centronuclear (MCN) faz parte do grupo das miopatias congênitas estruturais, um conjunto heterogêneo de doenças musculares hereditárias que se caracterizam por envolvimento muscular desde o nascimento, com tendência a estabilidade, e alterações histológicas específicas na biópsia muscular. Além da MCN, as miopatias congênitas incluem as miopatias com central core e multi-mini core, a miopatia nemalínica e a miopatia com desproporção congênita de fibras, entre outras.

Como grupo, as miopatias congênitas diferenciam-se das distrofias musculares congênitas por apresentarem quadro clínico de uma forma geral mais branda, com evolução lenta, muitas vezes não progressiva, além de um aspecto histológico muscular com um padrão não distrófico, isto é, onde não predominam aspectos como necrose e regeneração de fibras ou substituição conjuntivo-gordurosa no tecido muscular. Nas duas últimas décadas, houve a identificação de muitos genes responsáveis pelas miopatias congênitas, e observou-se que há considerável heterogeneidade genotípica, bem como sobreposição de fenótipos das miopatias congênitas entre si e com outros grupos de miopatias.

O nome MCN advém de sua característica principal na análise de biópsia muscular: a presença de núcleos centralizados na maioria das fibras musculares. Os primeiros pacientes descritos eram meninos com uma forma neonatal grave, com padrão de herança ligada ao X, que se caracterizava por hipotonia profunda, artrogripose, insuficiência respiratória e morte no primeiro ano de vida. Nas primeiras análises histológicas da patologia, acreditava-se que os núcleos centralizados, grandes e arredondados, representavam miotubos fetais não desenvolvidos, motivo pelo qual a condição originalmente recebeu o nome de miopatia miotubular (MTM). Tal associação etiopatogênica, entretanto, nunca pôde ser comprovada. À medida que foram sendo descritos casos de herança autossômica, mais leves, com acometimento muscular

lentamente progressivo, cuja morfologia histológica incluía núcleos centralizados, porém sem aspecto de miotubos, preferiu-se adotar o termo MCN, mais descritivo e menos sugestivo de mecanismo etiológico, reservando a designação MTM para a forma neonatal grave ligada ao X em particular.

A partir da identificação do gene da miotubularina (*MTM1*) como responsável pela MTM, em 1996, já foram identificados os genes *DNM2*, codificador da dinamina 2, e *BIN1*, codificador da anifisina 2, como causadores de formas autossômicas de MCN. Em alguns, até pouco tempo, raros casos com sobreposição clínica com a miopatia do tipo central core foram encontradas mutações no gene que codifica o receptor da rianodina (*RYR1*). Nos últimos dois anos, a associação dos genes *TTN*, *CCDC78* e *SPEG* expandiu ainda mais o espectro de genes implicados nesta patologia.

Atualmente três formas de MCN estão bem definidas e serão discutidas a seguir: MTM ligada ao X, a qual se associa a mutações no gene *MTM1*; MCN de herança autossômica dominante, causada por mutações no gene *DNM2* ou *CCDC78*; e MCN autossômica recessiva, relacionada a mutações no gene *BIN1*, *RYR1*, *TTN* ou *SPEG*. Em grande parte dos pacientes, no entanto, a patologia se origina de forma esporádica, o que dificulta esta subclassificação, que acaba sendo feita por características clínicas e histopatológicas. Além disso, muitos casos de MCN seguem sem diagnóstico genético.

1.1 MTM Ligada ao X

A MTM (MIM #310400) foi inicialmente descrita clínica e histologicamente na década de 1960^{1, 2}. A partir da segunda metade da década de 1990, foram descobertos o locus gênico responsável pela doença, situado em Xq28, e subsequentemente mutações no gene *MTM1* (MIM *300415) como causadoras da patologia³. O gene *MTM1* codifica a miotubularina, uma fosfatase da tirosina que se sugere esteja relacionada com a diferenciação normal das fibras

musculares⁴. O gene *MTM1* possui 15 exons e mais de 200 mutações já foram descritas em pacientes com MTM⁵. Mais de 70% destas mutações se concentram especialmente nos exons 3, 4, 8, 9, 11 e 12. As mutações podem ser nonsense, missense, pequenas ou grandes deleções e inserções determinando “frameshift”, ou ainda perturbações em regiões de splicing; cada subtipo de mutação responde por aproximadamente 25% dos casos⁶⁻⁸.

A MTM caracteriza-se clinicamente por hipotonia muscular generalizada profunda, de início perinatal. No espectro mais grave, além de alta incidência de abortamentos e natimortos masculinos na família, há pobreza ou ausência de movimentos fetais, poliídrarnia, artrogripose, oftalmoplegia externa, e insuficiência respiratória ao nascer, com morte no primeiro ano de vida por complicações respiratórias. Neonatos com MTM são frequentemente macrossômicos e têm idade óssea e perímetro cefálico acima do percentil 90 para a idade⁹. Apesar de avanços nos cuidados intensivos neonatais, a taxa de mortalidade em 18 meses destes pacientes é de 46%, além do que 75% dos sobreviventes necessitam de suporte ventilatório¹⁰. Do outro extremo do espectro, há relatos de casos de MTM com fenótipo leve que sobreviveram até a idade adulta e com força muscular relativamente preservada^{11, 12}. Há ainda relatos de portadoras sintomáticas, com fraqueza e hipotonia em níveis variados, com idade de até 77 anos¹³. O mecanismo etiopatogênico proposto para a presença de sintomas em portadoras seria a inativação desbalanceada do cromossomo X¹⁴⁻¹⁶.

À análise histológica, observam-se núcleos centralizados grandes com aparência similar aos miotubos fetais, os quais se dispõem em fileiras ao longo do maior eixo das fibras musculares. A centralização nuclear ocorre tanto em fibras tipo 1 quanto tipo 2. A proporção de fibras com núcleo centralizado varia de acordo com o nível em que o corte foi feito e com o músculo de onde o fragmento foi retirado¹⁷. Ao redor de cada núcleo, ocorre uma zona central que não se cora com os métodos histoquímicos devido a ausência de miofibrilas; porém, como é rica em mitocôndrias e glicogênio, cora-se fortemente com PAS e reações de enzimas oxidativas. Outra característica típica é a hipotrofia e

predominância de fibras do tipo 1. Recentemente, foi descrita uma alteração histológica que aparentemente seria específica de casos leves de início tardio relacionados a mutações da *MTM1*: a presença de "fibras em colar", caracterizadas por um depósito anelar basofílico contornando a sua periferia, o qual pode ser visto nas colorações de rotina, ocorre ao longo de toda sua extensão e corresponde ultraestruturalmente ao local de alinhamento de núcleos internalizados¹². No entanto, um paciente com a forma clássica neonatal grave e com mutação no gene *MTM1*, recentemente estudado por nós, apresentava o aspecto de fibras em colar em 100% das fibras, sugerindo que tal alteração, embora possa ser realmente específica da MTM, não é exclusiva dos casos mais leves da doença¹⁸.

O principal diagnóstico diferencial da MTM é a distrofia miotônica (DM) de Steinert, em sua forma congênita, que tem fenótipo semelhante à MTM nos primeiros meses de vida e aspecto histológico indistinguível. Ajudam na diferenciação uma história familiar detalhada e exame clínico da mãe e demais familiares à procura de sinais clínicos sugestivos de DM, como a presença de fenômeno miotônico, fácies típica com atrofia de musculatura temporal, calvície frontal e fraqueza periorbitária, presença de cataratas ou distúrbios endocrinológicos⁷.

1.2. MCN de Herança Autossômica Dominante

A forma autossômica dominante da MCN (MIM #160150) é mais frequentemente causada por mutações no gene *DNM2* (MIM *602378), localizado no locus 19p13.2, que codifica a dinamina 2, uma GTPase envolvida no tráfego de vesículas intracelulares que é também responsável por formas axonais da doença de Charcot-Marie-Tooth (CMT), uma neuropatia periférica (MIM #606482)¹⁹. Os casos clássicos têm início no final da infância, adolescência ou idade adulta, e apresentam um quadro clínico e curso evolutivo mais leve que as outras formas de MCN, uma característica geral das

formas dominantes de patologia muscular. Clinicamente, há um padrão de fraqueza muscular com distribuição predominantemente proximal, ptose e oftalmoplegia externa, além de hipertrofia importante de panturrilhas em alguns casos²⁰. Raramente se associa com cardiomiopatia²¹. No entanto, há relato de casos esporádicos com apresentação grave de início precoce²², bem como casos intermediários entre a apresentação grave e a típica²³.

A gravidade da apresentação parece depender da porção da proteína afetada²⁴. A dinamina-2 é composta de um domínio N-terminal com função de GTPase, um domínio intermediário, um domínio de homologia da pleckstrina (PH), um domínio efetor da GTPase (GED), e um domínio C-terminal rico em prolina e arginina (Figura 1)²⁵.

Figura 1. Domínios da proteína dinamina-2. Estão indicadas as posições de aminoácidos envolvidos na MCN (losangos vermelhos) e CMT (losangos azuis)

As mutações que originam um fenótipo de MCN se concentram nos domínios intermediário e PH. Mutações que envolvem o domínio intermediário (correspondente ao exon 8) estão associadas a um quadro leve, de início na adolescência, lentamente progressivo e sem perda de deambulação antes da sexta década. O primeiro sintoma pode ser mialgia após exercício. Ptose e envolvimento ocular estão invariavelmente presentes, e pode haver envolvimento de musculatura distal precedendo a fraqueza muscular proximal. Já as apresentações graves de início neonatal são atribuídas a mutações *de novo* afetando o domínio de homologia da pleckstrina da dinamina 2

(correspondente ao exon 16), que também está alterado na CMT²⁶. Apesar da gravidade desta apresentação, há estabilização da função motora ao longo da vida. Não há mutações descritas causando tanto MCN quanto CMT, apesar de os mesmos domínios e às vezes aminoácidos adjacentes estarem envolvidos. Não obstante serem doenças clinicamente distintas, há evidências de neuropatia periférica leve em alguns pacientes com MCN²⁵.

Há um total de 18 diferentes mutações do gene *DNM2* descritas em casos de MCN, a maioria das quais envolve os exons 8 e 16 (7 mutações cada), além de uma mutação nos exons 11, 14 e 15 e uma em região intrônica²⁴.

Histologicamente, a forma autossômica dominante da MCN associada a *DNM2* apresenta uma tríade de características peculiares que ajudam a diferenciá-la das outras formas. Primeiramente, a quantidade de fibras com núcleos centralizados é consistentemente maior que a de núcleos internalizados, isto é, deslocados da periferia, porém sem atingir o centro exato da fibra. Há predomínio de fibras tipo 1, as quais apresentam diâmetro reduzido. Finalmente, as reações que envolvem enzimas oxidativas (NADH-TR, SDH e COX) mostram fibras que possuem um aspecto típico de "roda de carroça", em que fitas sarcoplasmáticas com distribuição radiada partem do centro da fibra em várias direções. Esta alteração corresponde à redução progressiva do diâmetro das miofibrilas desde a periferia até o centro da fibra muscular, que pode ser observada à microscopia eletrônica. A tríade de achados tem boa correlação com esta forma particular de MCN, para a qual até agora é específica, apesar de não estar presente em todos os casos, particularmente em crianças com menos de 5 anos de idade²⁷. Eventualmente, alterações mitocondriais podem ser observadas nas biópsias destes pacientes²⁸.

Em uma família com herança autossômica dominante e biópsia muscular apresentando núcleos centralizados e áreas semelhantes a cores, uma mutação em heterozigose em sítio de splicing foi identificada no gene *CCDC78* (MIM *614666) após análise de ligação e sequenciamento de alto débito²⁹. A

proteína CCDC78, codificada pelo gene de mesmo nome, localiza-se preferencialmente na região perinuclear e nas tríades, estruturas musculares alteradas nas outras formas de MCN, em cuja função está provavelmente envolvida.

Recentemente, algumas mutações em heterozigose no gene *BIN1*, que causa formas recessivas da miopatia centronuclear, foram implicadas em famílias com herança autossômica dominante da MCN, através de um mecanismo de ganho de função demonstrado em análise funcional (Johann Bohm, comunicação pessoal, trabalho submetido para publicação).

A forma autossômica dominante da MCN faz diagnóstico diferencial com as distrofias musculares autossômicas dominantes, que podem apresentar aspecto histológico com múltiplas centralizações nucleares. A histologia da MCN pode eventualmente evidenciar aumento do tecido conjuntivo, o que introduz um outro elemento de confusão. Em particular, antes do advento dos testes moleculares, muitos casos de distrofia miotônica recebiam o diagnóstico de MCN, e vice-versa. Ajudam na diferenciação características clínicas como a presença do fenômeno miotônico e catarata, no caso das distrofias miotônicas, e uma distribuição de fraqueza assimétrica envolvendo face e musculatura proximal, sugerindo distrofia facio-escápulo-humeral⁷.

1.3. MCN de Herança Autossômica Recessiva

Embora a maioria dos casos de MCN seja esporádica, alguns pacientes apresentam histórias familiares compatíveis com uma transmissão autossômica recessiva. Nos casos esporádicos e naqueles com herança autossômica recessiva, foram identificadas algumas mutações no gene *BIN1* (MIM *601248), localizado no locus 2q14, codificador da anfisina 2^{30, 31}. Acredita-se que a anfisina 2 tenha um papel importante no remodelamento de membranas e na organização do sistema de excitação-contração do músculo esquelético³².

O gene *BIN1* é extenso, formado por 19 exons. Apenas cinco mutações no gene *BIN1* em pacientes com MCN foram descritas até o momento: K35N, D151N, D154Q, Q573X e K575X^{30, 31, 33, 34}. Clinicamente, esta forma de MCN apresenta gravidade intermediária entre a forma autossômica dominante típica e a MTM. Entre as características descritas nos casos relatados estão fraqueza facial com acometimento grave da musculatura mastigatória, ptose e oftalmoplegia externa, fraqueza proximal com possível envolvimento distal em membros inferiores, deformidades dos pés, deformidades esqueléticas, envolvimento respiratório e cardiomiopatia^{20, 35-38}.

As características histológicas incluem uma maioria de fibras arredondadas com centralização nuclear mais proeminente que internalização, algumas fibras com agrupamentos de núcleos centralizados, além de aumento do tecido conjuntivo endomisial, porém sem necrose ou regeneração. No centro de algumas fibras, há a presença de uma zona central clara com borda escurecida na reação NADH-TR, que à microscopia eletrônica corresponde a um ou mais núcleos circundados por material amorfo, que contém mitocôndrias e partículas de glicogênio^{27, 37}.

1.4. Outras Formas de MCN

Inicialmente, alguns casos esporádicos de MCN com gravidade intermediária entre as formas autossômica dominante e neonatal grave foram encontradas mutações no gene que codifica o receptor do canal da rianodina (*RYR1*, MIM *180901), também responsável pela miopatia do tipo central core e hipertermia maligna, condições nas quais o mecanismo de herança pode ser autossômico recessivo ou dominante. Além de um primeiro caso descrito que tinha sobreposição clínica com outras miopatias congênitas³⁹, outros casos se seguiram, em particular dentro de uma coorte que incluiu 12 pacientes sul-africanos cuja mutação se deve provavelmente a um efeito fundador⁴⁰. Com o

advento do sequenciamento de alto débito, mutações no gene *RYR1* e *TTN* (MIM *188840), muito grandes para o sequenciamento tradicional, passaram a ser encontradas em maior frequência nas coortes de pacientes com MCN, tanto em casos esporádicos como familiares, com herança autossômica recessiva^{41, 42}.

Histologicamente, estes pacientes apresentam uma quantidade de centralizações nucleares menor que as outras formas, com predominância de internalizações, além de zonas com desorganização estrutural e ausência de uniformidade de atividade oxidativa²⁷.

Em um trabalho recente, os autores identificaram, através de um estudo de hibridização em leveduras, que a proteína quinase preferencialmente expressa no músculo estriado (SPEG), produto do gene *SPEG*, interage diretamente com a miotubularina. Modelos murinos knockout para o gene *SPEG* originam miocardiopatia dilatada grave, o que corrobora o achado de dois casos com miocardiopatia dilatada documentada em uma série de três pacientes com fenótipo de CNM e mutações recessivas neste gene⁴³.

Em dois pacientes brasileiros foram descritas mutações no gene *pJUNK*. No entanto, as mutações descritas nestes pacientes não foram ainda confirmadas como sendo patogênicas ou causadoras da doença, especialmente porque em um dos casos foram detectadas também mutações no gene *DNM2*⁴⁴.

1.5 Considerações sobre os mecanismos moleculares da MCN

As bases moleculares das diferentes formas MCN não estão completamente esclarecidas, mas o mecanismo comum aponta para o acometimento estrutural das tríades, unidades morfológicas presentes no músculo esquelético necessárias para o acoplamento excitação-contração. As

tríades são formadas por um túbulo T conectado a cisternas terminais de cada lado, as quais consistem em prolongamentos do retículo sarcoplasmático. Os túbulos T correm perpendicularmente ao eixo longitudinal das fibras musculares, levando o estímulo elétrico proveniente da junção neuromuscular à profundidade das fibras e ativando receptores diidropiridínicos. Estes, através da interação mecânica direta com receptores de rianodina presentes na membrana das cisternas terminais adjacentes, levam à liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, o que inicia uma cascata de eventos que levam à contração muscular (Figura 2).

Figura 2. Representação simplificada do acoplamento excitação-contracção

O gene *MTM1*, o primeiro identificado em associação com a MCN, codifica a proteína MTM1, uma fosfatase de expressão sistêmica que regula, no tecido muscular especificamente, o nível de fosfoinosítídeos no retículo sarcoplasmático das tríades⁴⁵⁻⁴⁷. Mutações que levam a sua perda de função dão origem a um fenótipo de MTM.

As dinaminas são mecanoenzimas GTPases que têm um papel importante no tráfego de membranas e endocitose, bem como na montagem do citoesqueleto de actina^{48, 49}. Podem formar anéis polimerizados ao redor de

túbulos de membranas e estão envolvidas em eventos de fissão das membranas. Três dinaminas foram identificadas em seres humanos: a dinamina 1 tem expressão neuronal, a dinamina 3 é encontrada no SNC e testículos, e a dinamina 2 é onipresente.

Mutações dominantes no gene *DNM2* causam MCN em humanos e em modelos de camundongo. Testes bioquímicos com a mutação mais comum no gene *DNM2* em um modelo de camundongo mostraram que este efeito dominante se deve a ganho de função, e não haploinsuficiência. Foram observados um aumento da estabilidade de oligômeros de dinamina e um aumento da atividade de GTPase desta proteína no músculo⁵⁰. Além disso, o aumento da expressão da dinamina em camundongos saudáveis levam a defeitos de centralização nuclear no músculo do camundongo⁵¹.

Além da forma dominante, a implicação da *DNM2* também foi estudada na MTM. Em um trabalho recente, os autores mostraram que a expressão de *DNM2* está aumentada tanto em pacientes portadores de MTM quanto em modelos animais knockout para *MTM1*, e que a redução de níveis de *DNM2* em modelos knockout para *MTM1* aumenta a sobrevivência e o desempenho muscular destes animais⁵². Em conjunto, estes achados confirmam que *DNM2* e *MTM1* fazem parte de uma via comum, corroboram com a hipótese de que os níveis de *DNM2* são pelo menos parcialmente responsáveis pelos fenótipos de MCN e MTM, e abrem uma avenida importante para pesquisas terapêuticas.

A proteína anfisina 2 (*BIN1*), expressa em todos os tecidos, porém com maior expressão no músculo esquelético e cérebro, é uma reguladora importante de diferentes funções celulares, incluindo endocitose, reciclagem de membranas, citoesqueleto, reparo do DNA, apoptose e progressão do ciclo celular. Além de sua implicação na MCN, já foi associada a insuficiência cardíaca, progressão de câncer, e doença de Alzheimer de início tardio. Tem interação direta com as proteínas *MTM1* na função de remodelamento de membranas⁵³ e com a dinamina 2 no processo de endocitose⁵⁴. Sua expressão durante a embriogênese é importante para a tubulação, fusão e diferenciação

de mioblastos^{55, 56}, e no músculo desenvolvido localiza-se nos túbulos T⁵⁷. Modelos animais com mutações no gene *BIN1* apresentam defeitos graves na organização dos túbulos T e no acoplamento excitação-contração, sugerindo que se trata de uma proteína essencial para o posicionamento de estruturas intracelulares. Especula-se que a proteína atue como sensora de curvatura de membranas (Laporte J, comunicação pessoal).

A figura 3 resume um modelo de envolvimento destas proteínas na MCN. A MTM1 regula negativamente a DNM2, responsável pela tubulação e endocitose de membranas. O aumento da função de tubulação leva a rompimento de posicionamento de estruturas intracelulares, especialmente túbulos T. A anfifisina-2, sensora de curvatura de membranas, interage diretamente com a dinamina-2.

Figura 3. Modelo de interação entre as principais proteínas envolvidas na MCN

O gene *RYR1*, codificador do receptor do canal da rianodina, também implicado na MCN em mutações recessivas, é um componente central do mecanismo de acoplamento excitação-contração. Ainda faltam estudos de fisiopatologia especificamente na MCN para identificar de que forma as mutações descritas levam a uma estrutura muscular com centralizações nucleares proeminentes, em oposição ao típico padrão de cores centrais classicamente descrito na miopatia por central core. A proteína SPEG, recentemente descrita em associação a formas recessivas da MCN, interage

diretamente com a MTM1, e localiza-se nas linhas Z, em alinhamento perfeito com as cisternas terminais, sugerindo portanto ligação com as tríades. Já a proteína CCDC78, responsável por formas dominantes da MCN em algumas famílias, localiza-se diretamente nas tríades.

A única proteína implicada na MCN que não faz parte diretamente do mecanismo de excitação-contração é a titina, proteína sarcomérica gigante que forma o suporte estrutural miofibrilar para os componentes da maquinaria contrátil do músculo. Apesar de o impacto da proteína truncada ter sido claramente demonstrado nas famílias descritas⁴², faltam estudos enfocando os mecanismos que levam a uma patologia de MCN.

1.5. Justificativa

A evolução das técnicas de análise de DNA e proteínas nas duas últimas décadas possibilitou a descoberta de um grande número de alterações genéticas nas doenças musculares, no que tem sido chamado de “era molecular da miologia”⁵⁸. A MCN, que já possui sete genes confirmados como causadores de doença (*MTM1*, *DNM2*, *BIN1*, *RYR1*, *TTN*, *CCDC78* e *SPEG*), segue com um grande número de casos ainda sem diagnóstico genético determinado. Neste trabalho, descrevemos as características clínicas e histopatológicas de pacientes portadores de MCN na população brasileira e pesquisamos mutações nos genes conhecidos, através de diversas técnicas. Com isso, tivemos a possibilidade de encontrar novas mutações nesses genes, confirmar mutações descritas em outros países na população brasileira, além de correlacionar as mutações com os achados clínicos e histológicos. A concentração de casos de MCN nas duas instituições onde este estudo foi realizado permitiu que tivéssemos um número adequado de pacientes para dar uma contribuição significativa ao conhecimento existente sobre esta patologia.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Foram objetivos deste estudo:

1. Definir o diagnóstico molecular das diversas formas de MCN em pacientes brasileiros, de modo a identificar a distribuição dos genes acometidos em nossa população e estabelecer correlações genotípico-fenotípicas.
2. Descrever o quadro clínico das diversas formas de MCN em pacientes brasileiros.
3. Descrever a histologia muscular das diversas formas de MCN em pacientes brasileiros.

3 PACIENTES E MÉTODOS

3 PACIENTES E MÉTODOS

Para este trabalho, inicialmente estabelecemos uma casuística de famílias acometidas por MCN. Considerando que o diagnóstico da MCN é sugerido por características clínicas, mas confirmado apenas por exame de biópsia muscular ou pesquisa genética, optamos por identificar pacientes através de triagem em dois bancos de biópsia muscular da cidade de São Paulo: o banco de biópsias do LIM15 da Faculdade de Medicina da USP e o banco de biópsias do Setor de Doenças Neuromusculares da UNIFESP. Buscamos laudos de biópsia dos últimos 10 anos com diagnóstico de MCN, MTM, ou cuja descrição mencionasse centralizações ou internalizações nucleares como principal característica, desde que o restante do laudo não sugerisse uma distrofia muscular. Em outras palavras, buscamos identificar centralizações ou internalizações que representassem um processo estrutural anormal do músculo, e não regeneração secundária a destruição de miofibras.

Procedemos então à revisão das lâminas das biópsias, em conjunto com Dr. Edmar Zanoteli, orientador deste trabalho, para confirmar os laudos e detalhar a análise histológica, conforme descrito na seção 3.2.

Os pacientes foram então recrutados para atendimento no Prédio dos Ambulatórios do HC-FMUSP, no 6º andar, Setor da Neurologia, onde foram submetidos a anamnese, exame físico e análise de exames complementares, segundo protocolo clínico. Na ocasião do atendimento, os pacientes, seus pais e eventuais outros familiares receberam pedidos de coleta de sangue periférico, para extração de DNA, após assinatura de consentimento informado.

Novos pacientes com diagnóstico de MCN, atendidos no ambulatório de doenças neuromusculares da infância do HC-FMUSP durante o período deste trabalho, foram também recrutados seguindo o mesmo protocolo.

Para o estudo molecular, optamos por uma abordagem diagnóstica sequencial, com exames sucessivamente mais complexos à medida que os resultados anteriores fossem negativos. Assim, inicialmente fizemos o sequenciamento dos exons mais frequentemente acometidos dos genes *MTM1*, em cooperação com o Dr. João Bosco Pesquero, do Departamento de Biofísica da UNIFESP, e *DNM2*, no LIM45 e LIM25 da FMUSP. Em seguida, o gene *MTM1* foi sequenciado em sua totalidade, juntamente com o gene *BIN1*, acometido de forma infrequente na MCN, mas com extensão relativamente pequena, no Laboratório de Diagnóstico Genético do Nouvel Hôpital Civil (NHC), em Estrasburgo, França, e no Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Illkirch, França. Adicionalmente, o gene *MTM1* foi estudado, ainda no NHC, pela técnica MLPA para detecção de variações de número de cópias, e em um caso de portadora manifestante em quem encontramos uma macrodeleção, foi feito estudo de inativação do X para avaliar desbalanço.

Figura 4. Sequência de etapas da metodologia empregada neste estudo. À esquerda, em azul, etapa da metodologia. À direita, em vermelho, local onde a etapa foi realizada.

O DNA dos casos ainda sem diagnóstico após o estudo dos genes *MTM1*, *DNM2* e *BIN1* foram enviados para sequenciamento de exoma, a partir do IGBMC em cooperação com o Centro Nacional de Genotipagem da França, ou foram incluídos em baterias de sequenciamento de painéis de genes, em cooperação com Dr. Carsten Bönenmann, do National Institutes of Health (NIH), Bethesda, EUA. Para os casos que permanecem indefinidos após o sequenciamento de exoma, aguardamos o sequenciamento do exoma de familiares para ajudar na filtragem de variantes, a inclusão de material genético dos probandos para possível sequenciamento de genoma, e avaliamos periodicamente a cobertura de eventuais novos genes candidatos para MCN, realizando o sequenciamento Sanger de exons potencialmente não cobertos.

A figura 4 resume esquematicamente a sequência de métodos empregados neste trabalho.

3.1 Pacientes

Foram incluídos neste estudo pacientes com diagnóstico clínico e/ou histológico de MCN/MTM, em acompanhamento médico regular no Ambulatório de Doenças Neuromusculares da Infância da Disciplina de Neurologia Infantil do Departamento de Neurologia da FMUSP ou no Setor de Doenças Neuromusculares da UNIFESP. Foram coletadas amostras de sangue periférico dos pacientes e seus familiares, após leitura e assinatura de termo de consentimento informado. O projeto foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética do HC-FMUSP e ratificado pelo Comitê de Ética da UNIFESP, sob o número do protocolo de pesquisa CAPPesq 0734/11 (Anexo I).

3.2 Métodos

3.2.1 Análise histológica

Quase a totalidade dos pacientes já possuíam fragmentos musculares estocados a -80°C , uma vez que o diagnóstico de MCN/MTM foi feito através de biópsia realizada previamente. Em apenas um caso, referenciado ao ambulatório de Doenças Neuromusculares da Infância do FMUSP para triagem, cujas características clínicas sugeriam fortemente MTM, optou-se por realizar diretamente o sequenciamento do gene *MTM1*, onde foi encontrada mutação patogênica já descrita na literatura. Neste caso específico, considerando que foi estabelecido diagnóstico molecular diretamente, optamos por não solicitar a realização de biópsia muscular, obedecendo compromisso estabelecido no projeto de pesquisa aprovado pelo CAPPesq, em que afirmamos que não solicitaríamos exames invasivos sem finalidade diagnóstica.

Os procedimentos padronizados para processamento da biópsia muscular nos dois locais onde o estudo foi realizado são semelhantes. De forma resumida, consistem em suas etapas fundamentais nos seguintes passos: imediatamente após sua remoção, os fragmentos musculares são montados em cortiça usando *tissuetek*, e rapidamente congelados em nitrogênio líquido. Em seguida, os fragmentos são submetidos a cortes coronais ou longitudinais sequenciais em criostato, a uma temperatura de -25°C , com uma espessura de 6 a 8 micra, e as lâminas resultantes são estocadas em freezer a -80°C , para processamento posterior. As lâminas são submetidas às colorações histológicas hematoxilina & eosina (HE), tricrômico de Gömöri modificado (GO), ácido periódico de Schiff (PAS) e “oil red” O (ORO). Estas colorações são úteis para avaliar o aspecto global da morfologia muscular, a presença de infiltrado conjuntivo-gorduroso, necrose muscular e presença de depósito de material PAS positivo e de gordura. As reações histoquímicas NADH-tetrazolium

redutase (NADH-TR), citocromo-oxidase (COX), succinatodesidrogenase (SDH) e adenosina trifosfatase (ATPase), em diferentes pHs (9.3, 4.6 e 4.3), são realizadas para avaliar o aspecto geral da arquitetura interna das fibras, a atividade oxidativa, e a distribuição dos diferentes tipos de fibras.

As biópsias musculares de todos os pacientes, exceto o caso que não foi submetido ao procedimento, foram revisados pelo autor deste trabalho juntamente com o Prof. Dr. Edmar Zanoteli. Os seguintes aspectos histológicos das biópsias musculares dos pacientes foram avaliados: variabilidade de tamanho entre as fibras musculares e aumento do tecido conjuntivo endomisial e perimisial - aspectos avaliados em graus leve (+), moderado (++), forte (+++), ou ausente; proporção de fibras com centralizações nucleares e relação quantitativa entre fibras tipo 1 e 2 - aspectos que foram avaliados sob a forma porcentual. As biópsias foram avaliadas ainda quanto à presença ou ausência dos seguintes achados: fibras "em colar", fibras com estrias sarcoplasmáticas radiadas (aspecto em "roda de carroça") e fibras com aumento da atividade oxidativa central.

3.2.2 Avaliação clínica

Os pacientes foram avaliados pelo autor do trabalho segundo protocolo clínico e neurológico, subdividido em história clínica (gestacional, neonatal, de desenvolvimento neuropsicomotor e evolução), história familiar, exame físico geral e neurológico, o qual incluiu avaliação de função motora e graduação de força muscular segundo a escala MRC (Medical Research Council). Foram obtidas informações relativas aos exames subsidiários já realizados, como o nível sérico da CPK, exames de imagem do sistema nervoso central, eletroneuromiografia, provas de função pulmonar, polissonografia, ecocardiograma e eletrocardiograma, entre outros.

3.2.3 Extração de DNA

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, foi coletada uma amostra de 5 a 10 ml de sangue periférico dos pacientes e dos familiares no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP. Este material foi enviado para o LIM45 (Disciplina de Neurologia Experimental-FMUSP), onde foi realizada a extração de DNA linfocitário usando protocolo descrito por Miller et al.⁵⁹

3.2.4 Sequenciamento do gene *MTM1*

Os 15 exons do gene *MTM1* foram sequenciados em todos os pacientes usando uma abordagem escalonada. A busca por mutações neste gene foi iniciada pelos exons mais frequentemente acometidos ("hot spots"), segundo descrições da literatura, a saber: exons 3, 4, 8, 9, 11 e 12. Os pacientes em cujos exons desta lista não foram encontradas mutações foram eventualmente sequenciados para todos os exons do gene *MTM1*.

Inicialmente, os exons escolhidos foram amplificados em termocicladora da marca Eppendorf, utilizando-se pares de oligonucleotídeos (tabela 1) e método descritos por Laporte et al.⁶⁰, o qual, resumidamente, submete uma solução com volume final de 25 µL, cerca de 100 ng de DNA, 10 mM de Tris-HCl com pH de 8.3 como tampão de reação, 200 µM de dNTP, 1.5 a 2.0 mM MgCl₂, 10 pmol de cada primer e 1 U de Taq polimerase, a um protocolo de PCR que consiste nas seguintes etapas: inicialização a 95°C por 5 minutos, 28 ciclos de desnaturação (95°C por 15 segundos) seguida de anelamento na temperatura indicada na tabela 1 por 15 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, e finalmente uma etapa de extensão a 72°C por 7 minutos. A

qualidade do produto de PCR foi verificada através de corrida em gel de agarose a 2% por 40 minutos.

Tabela 1. Lista de oligonucleotídeos usados para amplificação dos 15 exons do gene *MTM1*⁶⁰.

Exon	Forward primer 5' - 3'	Reverse primer 5' - 3'	Anel. (°C)
1	GGCGCCAGTCCAACTTC	CCAAGGAGTCCCAACTTC	52
2	AGAACCTGTAAAGTAGTACC	TAGGCCAGCCCAAATGAC	52
3	AACAGTGTGTAAATGTAACGTC	AGACTTCTCCTCAAGTTATGC	55
4	AGTGCCATTGTTGTGTATC	TGACCCACAGTCAATCTTGC	55
5	TAATTATACTGACAGAAATACTG	TCCACATTAATTGTCTACTATC	55
6	TTGAAGACTGAACTGTCATAC	AACCTTCCACGCTGAGG	55
7	AGATGTACTATAATAGTAGAC	AGGTTTCATCACATACCAGAC	52
8	TCCAGAGATGAGGTCAAGC	GGTGCTCTTCAAGAGAAACG	55
9	TTGATAGCTTAACTTTCTGAC	TCCAGCACATCATTAAAGTCC	55
10	CTGATTGTTGTATTTTCATG	TATATACACAAATATTTTCAC	52
11	AACTCCCTACTGACTCAGG	AATCCTGAATGGTAGTGATCT	55
12	ATGCTTTCTCAGTTTGTACC	TAAACAATGAGTTGAATGTA	52
13	TTATAAAGTTTCAGTCCCAG	TTGGCAAGCCTAATGTATC	52
14	TTTTACTTAGGCTCTCCAC	CTATCTTTTAACAGTGCTAC	52
15	AGTGTAACCTCAAGTCTCTCTGG	AAATGAAAGTCAGCTATCGC	52

O sequenciamento dos fragmentos amplificados foi realizado usando os mesmos pares de oligonucleotídeos das reações de PCR. Os exons que incluíam “hot spots” foram sequenciados em um aparelho 3130 Genetic Analyzer da Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA), no Laboratório do Departamento de Biofísica da UNIFESP, em colaboração com o Dr. João Bosco Pesquero. Os demais exons foram sequenciados também em um aparelho 3130 Genetic Analyzer da Applied Biosystems, mas no Laboratório de Diagnóstico Genético do Nouvel Hôpital Civil (NHC) de Estrasburgo, França, sob supervisão da Dra. Valérie Biancalana. As sequências obtidas foram analisadas no programa *Mutation Surveyor Demo V 3.20* em comparação com a sequência “wild type” do gene *MTM1* (RefSeq versão NM_000252.2). A nomenclatura das mutações seguiu as recomendações publicadas por den Dunnen et al.⁶¹, e as variantes encontradas foram comparadas com o banco de mutações e variantes do gene *MTM1* curados no sistema Leiden Open Variation Database (LOVD), disponível online no endereço <http://www.dmd.nl/>,

além do banco de mutações do Human Gene Mutation Database (HGMD), cuja versão pública está disponível em <http://www.hgmd.org/>⁶². As mutações encontradas foram ainda sequenciadas nos pais de cada caso índice, de modo a confirmar herança ligada ao X e descartar polimorfismos ou erros de sequenciamento.

3.2.5 Sequenciamento do gene *DNM2*

Os exons 8, 11, 14, 15 e 16 do gene *DNM2* foram sequenciados em todos os pacientes. Optou-se por limitar o sequenciamento apenas a estes exons porque, no momento da concepção do projeto, tratava-se dos únicos exons deste gene onde haviam sido encontradas mutações patogênicas causadoras de miopatia centronuclear até então. Os casos sem diagnóstico após sequenciamento Sanger foram eventualmente cobertos para este gene em sua totalidade através do sequenciamento de exoma.

O protocolo de análise do gene *DNM2* se iniciou com a amplificação por PCR, em uma termocicladora Eppendorf, dos exons supracitados, utilizando os pares de oligonucleotídeos listados na tabela 2. Uma solução com volume final de 50 µL, contendo 50 ng de DNA, 10 mM de Tris-HCl com pH de 8.3 como tampão de reação, 200 µM de dNTP, 1.5 a 2.0 mM MgCl₂, 10 pmol de cada primer e 0.5 U de Taq polimerase, foi submetida a reação que consistiu nas seguintes etapas: inicialização a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação (95°C por 30 segundos) seguida de anelamento na temperatura indicada na tabela 2 por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, e finalmente uma etapa de extensão final a 72°C por 7 minutos. A verificação de qualidade dos produtos de PCR foi feita através de corrida em gel de agarose a 2%.

Tabela 2. Lista de oligonucleotídeos para amplificação dos 5 exons do gene *DNM2*¹⁹.

Exon	Forward primer 5' - 3'	Reverse primer 5' - 3'	Anel. (°C)
8	ATTCCAGAGTAGTGTGGAAACCT	TTATTGCCTGGGAGGAGG	58
11	CCTCCGCATTTTCTACCTGT	ATATGCAGCTGTCAGCATGCA	58
14	TGCCGTTAGTTGTCAGGTGAGT	AGAGGGCTAGGGTCAAAGGTGT	60
15	GAGGTTCCCTGCTAAGCT	CACCTCCTCATCCTTGT	58
16	TCCACCCTCAGGAGAAAGAGAAGA	AGTGCTCAGTGAAGTTGTGGAGT	60

O sequenciamento dos exons do gene *DNM2* foi feito parcialmente através do serviço multiusuário da FMUSP, em um aparelho 3730 DNA Analyzer da Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA), no Laboratório de Endocrinologia da FMUSP (LIM25), e parcialmente na plataforma de sequenciamento e genômica do Instituto Cochin, em Paris, França, em colaboração com o Instituto de Genética e Biologia Molecular e Celular (IGBMC), de Estrasburgo, França. As sequências obtidas foram analisadas no programa *Mutation Surveyor Demo V 3.20*, em comparação com a sequência genômica “wild type” do gene *DNM2* (RefSeq versão NM_001005360.2). A nomenclatura das mutações seguiu as recomendações publicadas por den Dunnen et al⁶¹, e as variantes encontradas foram comparadas com o banco de mutações e variantes do gene *DNM2* curados no sistema Leiden Open Variation Database (LOVD), disponível online no endereço <http://www.dmd.nl/>, com o banco de mutações do gene *DNM2* mantido em <http://www.umd.be/DNM2/>, além do banco de mutações do Human Gene Mutation Database (HGMD), cuja versão pública está disponível em <http://www.hgmd.org/>⁶². Exons onde mutações foram encontradas foram adicionalmente sequenciados nos pais, para definir a segregação familiar e descartar eventuais polimorfismos.

3.2.6 Sequenciamento do gene *BIN1*

Todos os exons do gene *BIN1* que fazem parte da codificação da isoforma muscular da proteína anifisina-2, totalizando 15 exons, foram sequenciados nos pacientes em que não encontramos mutações nos genes *MTM1* e *DNM2*. As reações de amplificação e sequenciamento foram realizadas pelo autor deste trabalho no Laboratório de Diagnóstico Genético do Nouvel Hôpital Civil de Estrasburgo, França, sob supervisão da Dra. Valérie Biancalana.

Tabela 3. Lista de oligonucleotídeos para amplificação de 15 exons do gene *BIN1* (protocolo do NHC, Estrasburgo).

Exon	Forward primer 5' - 3'	Reverse primer 5' - 3'	Anel. (°C)
1	GTCAGTTGGCTCCGCTGT	AGGATAGGGGGACAGGTG	60
2	TGGTGACTGAGCACTCTTGG	ACATACCCCATCCCTCTTCC	60
3/4	TTGGGAGGTCAGCTGATCAGT	CAGAGAGGCTTGCCAGAG	60
5	ACATTTGCCCCATCTTACA	GTCCTAGGCCCTGTCTCTC	58
6	GATCCACTGGACCTGGAGTC	CACAAGGGCCTCTCACTCAC	60
8	AGGAGGTGGGAGGACTGG	AGAGGCACAAACCAGAGAGG	60
9	CTGGTTTGTGCCTCTGATGA	CGGTGTGTGCTGAACCTG	60
10	ATGGGGAAAGAGGAGCTTGT	ACCAACAGGGTCACAGGAAG	58
11	TCCTCTGAGCAGAAGGGTTG	CACTGCACACAGAGCCAGAT	60
12	TGCACACACCTCTTCACACA	ATGGAGGACAACAGCAAAGC	58
17	GTTTCCTGTGTCTGGCTGT	TCCAGCTTCTCAACAGGAG	60
18	CTCCTGTTGAGGAAGCTGGA	AGTGCCTGTCACAACCTT	58
19	GCTTTTGAGCACTCCTGGTC	TATGGGGACAGGGAGAGAGA	60
20	CCTGGAGGAGGTGTTCTCAA	GGGGTCTCCTCTTGATTTC	58

Inicialmente foi feita a amplificação por PCR, em uma termocicladora Biometra, dos 15 exons supracitados, utilizando os pares de oligonucleotídeos listados na tabela 3. Uma solução com volume final de 25 µL, contendo 50 ng de DNA, 10 mM de Tris-HCl com pH de 8.3 como tampão de reação, 200 µM de dNTP, 1.5 a 2.0 mM MgCl₂, 10 pmol de cada primer e 0.2 U de *Taq* polimerase, foi submetida a reação que consistiu nas seguintes etapas:

inicialização a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação (95°C por 30 segundos) seguida de anelamento na temperatura indicada na tabela 3 por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, e finalmente uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos. A verificação dos produtos de PCR foi feita através de corrida em gel de agarose a 2%.

O sequenciamento foi realizado em um aparelho 3130 Genetic Analyzer da Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA) e analisado através do sistema integrado de análise genética em rede do Laboratório de Diagnóstico Genético do Nouvel Hôpital Civil de Estrasburgo, França. A versão da sequência genômica do gene BIN1 utilizada foi RefSeq NM_139343.2. As variantes encontradas foram comparadas com o banco de polimorfismos do próprio laboratório, e ainda com o banco de mutações do Human Gene Mutation Database (HGMD), cuja versão pública está disponível em <http://www.hgmd.org/>⁶².

3.2.7 MLPA

Os pacientes sem diagnóstico molecular após sequenciamento Sanger foram incluídos em uma bateria de Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) para o gene *MTM1*, técnica utilizada para detecção de variação do número de cópias de até 50 sequências de DNA em uma única reação de PCR, com o objetivo de identificar variações do número de cópias (deleções, duplicações) neste gene. A bateria foi realizada no Laboratório de Diagnóstico Genético do Nouvel Hôpital Civil (NHC), de Estrasburgo, sob supervisão da Dra. Valérie Biancalana. Para a reação, foram utilizados o kit de sondas para *MTM1* SALSA MLPA P309 *MTM1* probemix e o kit de reagentes MLPA EK1-FAM, ambos da empresa MRC-Holland (Amsterdã, Países Baixos), uma termocicladora Biometra para as reações de PCR, e o sequenciador 3130 Genetic Analyzer da Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA), este último para realização de análise de fragmentos.

A bateria incluiu 14 pacientes e três controles sadios, e consistiu nas etapas descritas a seguir. Inicialmente, um volume de 5 µL com 100 ng de DNA em um tubo de 0,2 ml para cada amostra é desnaturado na termocicladora, a 98°C por 5 minutos. Em seguida, 1,5 µL do kit de sondas *MTM1* e 1,5 µL do tampão de MLPA, componente do kit de reagentes, são adicionados a cada tubo, de forma a hibridizar as sondas com o DNA desnaturado, por 18 horas a 60°C. Após a hibridização, são adicionados a cada tubo uma mistura de 25 µL de água, 3 µL do tampão A, 3 µL do tampão B, e 1 µL da enzima ligase 65 (todos componentes do kit de reagentes). A reação de ligação ocorre a 58°C por 15 minutos, após o que segue-se uma etapa de desnaturação a 98°C por 5 minutos, e finalmente a temperatura é reduzida a 20°C. Os tubos são retirados da termocicladora, e são imediatamente aplicados a uma reação de PCR que inclui, para cada amostra, 7,5 µL de água, 2 µL do mix de sondas MLPA, componente do kit de reagentes, e 0,5 µL de Taq polimerase. A reação consistiu em 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 60 segundos, seguida de uma etapa de extensão final a 72°C por 15 minutos. Os tubos foram retirados da termocicladora e mantidos em geladeira dentro de uma caixa escura até a realização da análise de fragmentos.

Para a análise de fragmentos, 0,8 µL de cada produto de PCR foram adicionados a poços de uma placa de sequenciamento, onde foram misturados a 9 µL de formamida ABI 4311320 e 0,2 do padrão ABI GeneScan 500 LIZ. A placa foi então submetida a choque térmico: após aquecimento a 95°C por 2 minutos na termocicladora, foi deixada em freezer a -20°C por 2 minutos, descongelada em temperatura ambiente e introduzida no sequenciador. A corrida usou os seguintes parâmetros: voltagem de injeção de 1.6 kV, tempo de injeção de 15 segundos, voltagem da corrida de 15 kV, tempo de corrida de 1800 segundos, e o polímero usado foi o POP-7. Para análise dos resultados, foi utilizado o software PeakScanner, versão 1.0, da empresa Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA).

3.2.8 Estudo de inativação do X

O estudo de inativação do X foi realizado no Laboratório de Diagnóstico Genético do NHC para o caso de uma paciente portadora manifestante, na qual foi encontrada uma macrodeleção em heterozigose pela técnica de MLPA. Foi feito o ensaio de metilação diferencial no locus do gene *FMR1*, descrito em Carrel et al⁶³. Resumidamente, duas alíquotas, uma contendo 100 ng de DNA genômico e outra contendo a mesma quantidade após processo de digestão completa com a enzima HpaII, seguida de aquecimento para inativação da mesma, são submetidas a PCR com sondas que abrangem o sítio de restrição da enzima HpaII e repetições CGG polimórficas do gene *FMR1*. A reação de PCR consiste em desnaturação a 95°C por 4 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto e meio, seguida de anelamento a 65°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos. Os produtos da PCR são misturados na proporção 2:1 com formamida, e analisados em corrida em gel de acrilamida a 6%. A PCR amplifica seletivamente os alelos metilados (inativados), portanto não digeridos pela enzima HpaII, sensível a metilação. A avaliação da inativação é feita com a comparação do sinal das imagens da corrida em gel do produto de PCR, após tratamento com a enzima HpaII vs. sem este tratamento.

3.2.9 Sequenciamento de exoma

O DNA de 13 pacientes sem diagnóstico molecular após o sequenciamento dos genes *MTM1*, *BIN1* e exons selecionados do gene *DNM2* foram submetidos a técnicas de alto débito para sequenciamento de exoma. Todos os exomas foram sequenciados no Centro Nacional de Genotipagem (CNG), localizado em Evry, França, como parte do projeto colaborativo Myocapture.

Para as corridas de sequenciamento de alto débito, foram usados 4 µg de DNA genômico de cada paciente. Inicialmente, o DNA foi submetido a controle de qualidade através de corrida de DNA genômico bruto em gel de agarose a 2%, além de quantificação através do espectrofotômetro de micro-volume Nanodrop (ThermoScientific, EUA) e fluorômetro Qubit® 2.0 (Life technologies, EUA). Todas as amostras de DNA passaram nos testes de qualidade.

A primeira etapa do protocolo de preparação para sequenciamento de alto débito foi a fragmentação do DNA genômico por sonicação, com o objetivo de produzir fragmentos ao redor de 200 pares de base. Foi utilizado o ultrasonicador S2 da empresa Covaris (Woburn, MA, EUA), a 200 ciclos/turno, por 300 segundos, com água a 8°C. A verificação de tamanho dos fragmentos foi realizada através do aparelho LabChip GX, da empresa Caliper Life Sciences (Hopkington, MA, EUA).

A captura foi realizada através do kit Agilent SureSelect All Exon V5 da empresa Agilent (Santa Clara, CA, EUA). Para a captura, inicialmente foi feita a ligação de adaptadores do kit Agilent a ambas extremidades dos fragmentos de DNA gerados, seguida da seleção de fragmentos entre 200 e 400 pares de base, usando o aparelho SPRI-TE da empresa Beckman Coulter (Pasadena, CA, EUA). Em seguida, foi realizada reação de PCR para enriquecer seletivamente tais fragmentos. O produto desta PCR é purificado através de método usando esferas magnetizadas AMPure do kit SureSelect, e a seguir verificado através do aparelho LabChip GX. A próxima etapa, hibridização, foi feita segundo protocolo detalhado pela empresa Agilent para o kit de captura, o qual envolve a adição sequencial de um tampão de hibridização, RNase de bloqueio, e biblioteca de captura SureSelect às amostras dentro de um termociclador ajustado a temperaturas específicas, para finalmente mantê-las por 24 horas a 65°C. A biblioteca de captura hibridizada é separada através de esferas magnetizadas de estreptavidina previamente preparadas com buffer de ligação do kit SureSelect, purificada com esferas magnetizadas AMPure do mesmo kit, amplificada através de uma reação de PCR pós-captura padrão

usando marcadores do kit SureSelect, com 12 ciclos a uma temperatura de anelamento de 60°C, e finalmente purificada mais uma vez com as esferas AMPure. O produto final foi analisado no aparelho LabChip GX, e em seguida transferido para os aparelhos de sequenciamento de alto débito.

O sequenciamento foi realizado nos instrumentos HiSeq 2000 da empresa Illumina (San Diego, CA, EUA), gerando dados brutos de sequenciamento no formato FASTQ.

As seguintes etapas de tratamento de Bioinformática foram realizadas, a partir dos dados brutos (arquivos FASTQ) gerados pelos sequenciadores Illumina HiSeq 2000:

1. As sequências em formato FASTQ foram alinhadas (mapeadas) com o genoma referência hg19/GRCh37 através do software bwa (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>), com as opções default, gerando um arquivo BAM;
2. Um controle de coerência de nomenclaturas do arquivo BAM obtido foi feito através da suíte de programas PicardTools (<http://picard.sourceforge.net/>) e SamTools (<http://samtools.sourceforge.net/>);
3. Duplicatas foram detectadas e eliminadas do arquivo BAM através da suíte de programas PicardTools;
4. O controle de qualidade dos dados brutos foi feito através dos softwares FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), além de um sistema proprietário do CNG que inclui o uso das ferramentas BedTools (<http://code.google.com/p/bedtools/>) e R (<http://www.r-project.org/>). Todas as amostras passaram no controle de qualidade, com média de 99,3% de bases sequenciadas com cobertura mínima de 5X, 96,2% com cobertura mínima de 10X, e 88% de bases sequenciadas com cobertura mínima de 30X. A média de cobertura dos 13 pacientes foi de 100X;

5. A identificação de variantes, resultado da comparação do sequenciamento com o genoma referência, a qual resulta na geração de um arquivo VCF (Variant Call Format), foi feita através do software GATK (<http://www.broadinstitute.org/gatk/>), usando os módulos UnifiedGenotyper, VariantAnnotator e VariantFiltration;

6. A anotação de variantes foi realizada através da suíte SnpEff (<http://snpeff.sourceforge.net>). A anotação de variantes é o processo pelo qual informações sobre as variantes são introduzidas no arquivo VCF, o qual inicialmente contém apenas coordenadas genômicas e as sequências divergentes. SnpEff verifica se as variantes estão presentes em um gene, em um exon/intron, determina o tipo (missense, nonsense, perda de códon de parada, sinônima), e calcula impacto das mutações. A ferramenta ainda compara as variantes identificadas com bancos de dados públicos de variantes frequentes (dbSnp, 1000 Genomes) e fornece suporte para notação do Human Genome Variation Society (HGVS). Após a anotação, uma filtragem inicial para descartar variantes de baixo impacto foi feita com a ferramenta SnpSift (<http://snpeff.sourceforge.net/SnpSift.html>);

7. A análise e filtragem de variantes listadas no arquivo VCF foi realizada através de solução integrada desenvolvida pelo autor deste trabalho, usando a linguagem de script perl (<http://www.perl.org/>), um software proprietário do IGBMC para score de variantes o qual foi construído sobre o sistema de anotação Alamut-Batch (<http://www.interactive-biosoftware.com/alamut-batch/>), além do sistema gerenciador de banco de dados MySQL (<http://www.mysql.com/>). As seguintes etapas foram realizadas:

a. Uma análise de semelhança de variantes entre os vários pacientes da coorte e outros indivíduos sequenciados pelo CNG dentro da colaboração do projeto Myocapture foi realizada através de script SQL, no intuito de detectar eventuais trocas de amostras. No caso de famílias em que mais de um indivíduo foi sequenciado, o mesmo script também foi usado como teste de

consanguinidade, com o objetivo de ajudar a definir o cenário de segregação mais provável (em homozigose vs. heterozigose composta ou *de novo*), e também como teste de paternidade, para evitar troca de amostras entre membros da família;

b. A primeira etapa de filtragem leva em consideração a segregação familiar. Nas famílias em que apenas um indivíduo teve o exoma sequenciado, esta etapa é ignorada. Nas famílias com mais de um indivíduo sequenciado, o cenário de segregação mais provável foi escolhido para execução, seguido dos demais cenários em ordem de probabilidade. Por exemplo, para dois irmãos afetados, filhos de pais não afetados, não consanguíneos, foi feita a comparação direta de variantes em heterozigose composta (duas variantes heterozigotas em um mesmo gene), em seguida a comparação direta de variantes em homozigose (menos provável devido à não consanguinidade dos pais), e finalmente a comparação direta de variantes em heterozigose simples (apenas uma variante heterozigota por gene; cenário ainda menos provável porque pressupõe mosaicismo germinativo, considerando pais não afetados);

c. Em seguida, são eliminadas variantes em regiões intergênicas, intrônicas sem impacto em splicing, e variantes sinônimas que não gerem novos sítios de splicing;

d. A próxima etapa consistia na filtragem de variantes com frequência alélica mínima maior que 0,5%, usando a integração da solução de filtragem com o banco de dados Exome Variant Server (EVS) do Projeto de Sequenciamento de Exomas do National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI), disponível em <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>, com o banco de variantes do projeto 1000 Genomes (<http://www.1000genomes.org/>), além do banco de exomas do IGBMC;

e. A filtragem prosseguiu com o descarte de variantes com baixa cobertura, usando o limiar de 10 leituras. Este limiar foi fixado arbitrariamente, por comunicação pessoal, baseado em experiência prévia da equipe do Dr.

Laporte e outros pesquisadores do IGBMC com análise de exomas. Eles observaram que variantes encontradas com cobertura menor que 10 a 15 leituras frequentemente correspondem a erros de sequenciamento quando validados pela técnica Sanger. Optamos pelo limiar menor, para descartar menos variantes;

f. Em seguida, foram eliminadas variantes encontradas em genes que fazem parte de uma lista de genes de alta variabilidade, que acumulam mutações em truncamento diferentes em alta frequência na população. Esta lista inclui genes que codificam proteínas envolvidas em receptores olfatórios, genes envolvidos no sistema de antígenos leucocitários humanos (HLA), entre outros;

g. As variantes que sobreviveram às filtragens foram ordenadas segundo um escore que integra predição de patogenicidade e existência de validação prévia, e inicialmente foram selecionadas aquelas que ocorrem em genes conhecidos como causadores de miopatias;

h. Paralelamente à análise de variantes em genes implicados em miopatias, usamos uma classificação ordenada do genoma humano segundo um escore de semelhança a genes causadores de miopatias, com o objetivo de identificar rapidamente variantes interessantes em possíveis genes candidatos. Este ranking foi criado usando Manteia (<http://manteia.igbmc.fr>)⁶⁴, uma solução integrada *in silico*, disponível online livre de custos, combinando dados minerados de diversos bancos públicos de informação genética e de biologia molecular, como AmiGO (<http://amigo.geneontology.org/amigo>; Gene Ontology, termos descritivos de funções biológicas e localização intracelular), HPO (<http://www.human-phenotype-ontology.org>; Human Phenotype Ontology, dados de fenotipagem humana), MGI (<http://www.informatics.jax.org>; Mouse Genome Informatics, dados de fenotipagem em modelos murinos), InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>; análise funcional de proteínas e predição de domínios proteicos), Reactome (<http://www.reactome.org>; conhecimento sobre vias biológicas comuns, mapas de interação entre proteínas) e GTex

(<http://www.gtexportal.org/home/>; Genotype-Tissue Expression Project, dados de expressão tecidual). A abordagem integrada para a criação deste ranking é descrita com detalhes em artigo recém-submetido pelo autor desta tese, o qual se encontra no Apêndice 2.

3.2.10 Confirmação de variantes detectadas na análise de exoma

As variantes marcadas como mais prováveis de serem as implicadas em cada família foram confirmadas através de sequenciamento Sanger. Para cada variante, foram projetados oligonucleotídeos diretos e reversos através do sistema Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Um protocolo de PCR foi criado e padronizado para cada par de oligonucleotídeos, e as reações de PCR foram feitas nos membros das famílias com DNA disponível, mesmo naqueles que não foram submetidos ao sequenciamento de exoma, com o objetivo de demonstrar segregação das variantes, usando uma termocicladora Biometra. Os produtos de PCR foram fotografados após corrida em gel de agarose a 2%, para confirmação de execução adequada, e em seguida enviados para sequenciamento Sanger na plataforma de sequenciamento e genômica do Instituto Cochin, em Paris, França, em colaboração com o Instituto de Genética e Biologia Molecular e Celular (IGBMC), de Estrasburgo, França. As sequências obtidas foram analisadas no programa *Mutation Surveyor Demo V 3.20*.

A validação de variantes por sequenciamento Sanger foi necessária considerando que os exomas dos pacientes incluídos neste trabalho fizeram parte das primeiras baterias de sequenciamento realizadas no Instituto Cochin dentro da colaboração com o IGBMC, e fazia-se necessário o controle de qualidade dos resultados.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

A análise de laudos e revisão de lâminas de biópsia muscular do LIM15 da FMUSP e do Laboratório de Patologia do Setor de Doenças Neuromusculares da UNIFESP permitiu a identificação de 8 biópsias com diagnóstico de miopatia miotubular (MTM) e 26 biópsias com diagnóstico de miopatia centronuclear (MCN). Deste grupo, foram incluídos no estudo 6 pacientes com diagnóstico clínico/histológico de MTM e 17 com MCN.

Para os demais, ou não foi possível contato devido a endereços e telefones de contato não atualizados e falta de seguimento ambulatorial, ou os pacientes ou responsáveis não aceitaram participar do estudo, especialmente paciente provenientes de outros estados, por motivo de distância da FMUSP e consequente dificuldade de deslocamento. Um paciente adicional com diagnóstico clínico de MTM, que iniciou acompanhamento no Ambulatório de Doenças Neuromusculares da Infância do HC-FMUSP, foi incluído apesar de não ter sido submetido a biópsia muscular, uma vez que o sequenciamento do gene *MTM1* demonstrou mutação patogênica conhecida.

Do total de 24 pacientes incluídos neste trabalho, provenientes de 21 famílias, foi possível chegar ao diagnóstico molecular de 19 pacientes (16 famílias). As tabelas 4 e 5 sumarizam os principais dados clínicos e histológicos dos pacientes, e a tabela 6 apresenta as mutações encontradas. A seguir, os resultados são apresentados com agrupamento das famílias segundo os genes implicados.

Tabela 4. Aspectos clínicos das famílias com MCN.

Família	Origem	Raça	Sexo	Idade	Idade de início	Manif. Inicial	Evolução	Achados oculares	Paresia facial	Def. Col. Vertebral	Def. torácica	CPK
1.1	Sorocaba-SP	branca	M	4 a	Neonatal	IR	Estável	P+O	sim	não	não	normal
1.2	Cubatão-SP	branca	M	8 a	Neonatal	IR	Estável	P+O	sim	escoliose	pectus exc.	normal
1.3	São Paulo-SP	branca	M	1 a 8 m	Neonatal	IR	Estável	P+O	sim	não	não	normal
1.4	São Paulo-SP	branca	M	9 m*	Neonatal	IR	Óbito	P	sim	não	não	normal
1.5	Vitória-ES	branca	M	3 a 5 m*	Neonatal	IR	Óbito	P+O	sim	não	não	ND
1.6	Araçatuba-SP	branca	M	5 a	Neonatal	IR	Estável	P+O	sim	escoliose	pectus exc.	normal
1.7	Taboão-SP	branca	F	13 a	1º ano	ADM+H	Estável	P+O	sim	escoliose leve	não	normal
2.1	Lorena-SP	branca	F	20 a	6 a	Def. Pé	Estável	P+O	sim	escoliose	pectus exc.	normal
2.2	Chapecó-SC	parda	F	16 a	9 a	Quedas	Estável	P+O	sim	não	não	normal
3.1	Primavera-MT	branca	M	5 a	1º ano	ADM+H	Estável	P	sim	não	pectus exc.	normal
3.1	Primavera-MT	branca	F	12 a	1º ano	ADM+H	Estável	P	não	não	não	normal
3.2	São Paulo-SP	branca	M	12 a	1º ano	ADM+H	Estável	não	sim	lord. lombar	pectus exc.	2X
3.2	São Paulo-SP	branca	F	7a	1º ano	ADM+H	Estável	não	não	lord. lombar	não	normal
3.3	Goiânia-GO	branca	M	51 a	1º ano	ADM+H	Estável	O	sim	escoliose	não	normal
3.3	Goiânia-GO	branca	F	43 a	1º ano	ADM+H	Estável	O	sim	escoliose	afundamento	normal
3.4	Feliz-MG	branca	M	16 a	1º ano	ADM+H	Estável	O	sim	espinha rígida	não	1.5X
3.5	Goiânia-GO	branca	F	6 a	1º ano	ADM+H	Estável	O	não	não	pectus exc.	ND
3.6	São Paulo-SP	parda	F	10 a	1º ano	ADM+H	Estável	não	sim	cifose	afundamento	ND
3.7	São Paulo-SP	branca	F	5 a	1º ano	ADM+H	Estável	P	sim	não	não	normal
4.1	São Paulo-SP	branca	M	5 a	Neonatal	IR	Estável	P+O	sim	escoliose	não	normal
4.2	São Paulo-SP	parda	F	24 a	1º ano	ADM+H	Estável	O	sim	escoliose	não	ND
4.3	Alfredo-SP	parda	M	10 a	1º ano	ADM+H	Estável	P	não	lord. e cif.	pectus exc.	ND
4.4	São Paulo-SP	parda	M	22 a	1º ano	ADM+H	Estável	não	não	não	não	ND
4.5	São Paulo-SP	parda	F	42 a	30 a	F.MMII	Estável	O	não	não	não	ND

Deform. col.: deformidade de coluna; CPK: creatina fosfoquinase; M: masculino; F: feminino; a: anos; m: meses; IR: insuficiência respiratória; ADM+H: atraso de desenvolvimento motor + hipotonia; Def. pé: deformidade dos pés; P: ptose; O: oftalmoparesia; lord.: lordose; cif.: cifose; exc.: excavatum; F.MMII: fraqueza de MMII; ND: não disponível.

Tabela 5. Resultados da análise histológica dos pacientes com MCN.

Família	Sexo	Idade	Idade Bx	Local	Músculo	Var	Tecido Conj.	Centralizações	% fibras tipo 1	Fibras em colar	ESR	Ox central	Falhas focais
1.1	M	4 a	8 m	FMUSP	bíceps	++	-	80	90	sim	não	sim	não
1.2	M	8 a	5 m	UNIFESP	deltoide	-	+	90	90	não	não	sim	não
1.3	M	1,5 a	3 m	FMUSP	bíceps	++	+	70	70	não	não	sim	não
1.4	M	9 m	3 m	UNIFESP	deltoide	+	+	90	90	não	não	sim	não
1.5	M	3,5 a	2 a 4 m	UNIFESP	deltoide	+	+	90	90	sim	não	sim	não
1.7	F	13 a	6 a	UNIFESP	deltoide	+++	++	50	80	sim	não	sim	não
2.1	F	20 a	16 a	FMUSP	bíceps	++	+	30	40	não	sim	não	não
2.2	F	16 a	13 a	UNIFESP	deltoide	++	++	80	60	sim	sim	sim	não
3.1	M	5 a	6 m	UNIFESP	deltoide	++	-	60	70	não	não	não	não
3.1	F	12 a	6 a	UNIFESP	deltoide	+	-	30	50	não	não	não	sim
3.2	M	12 a	5 a	UNIFESP	deltoide	++	+	40	70	não	não	não	sim
3.3	M	51 a	44 a	UNIFESP	deltoide	+++	++	90	80	não	não	não	sim
3.3	F	43 a	37 a	UNIFESP	deltoide	+++	++	90	80	não	não	não	sim
3.4	M	16 a	13 a	FMUSP	bíceps	+++	++	70	70	sim	não	não	sim
3.5	F	6 a	3 a	FMUSP	bíceps	+	+	40	70	não	não	não	sim
3.6	F	10 a	2 a	FMUSP	bíceps	++	-	50	90	não	não	sim	não
3.7	F	5 a	2 a 6 m	UNIFESP	deltoide	-	+	30	60	não	não	não	sim
4.1	M	5 a	10 m	UNIFESP	deltoide	++	-	60	90	não	não	não	não
4.2	F	24 a	15 a	UNIFESP	deltoide	+++	+++	90	90	não	não	não	sim
4.3	M	10 a	2 a	UNIFESP	deltoide	+	+	40	70	não	não	não	sim
4.4	M	22 a	17 a	UNIFESP	deltoide	+	+	100	80	não	não	não	sim
4.5	F	42 a	30 a	FMUSP	bíceps	+	+	60	90	não	não	não	sim

Bx: biópsia; M: masculino; F: feminino; a: anos; m: meses; Var.: variabilidade; Conj.: conjuntivo; ESR: estrias sarcoplasmáticas radiadas;

Ox: reação oxidativa; FMUSP: Faculdade de Medicina da USP; UNIFESP: Universidade Federal de São Paulo

Tabela 6. Mutações encontradas nas famílias com MCN.

Família	Gene	MIM	Locus	Transcrito	Estado	Exon/Intron	Efeito	Base	AA
1.1	<i>MTM1</i>	300415	Xq28	NM_000252	Hemizigose	3	nonsense	c.85C>T	p.Arg29*
1.2	<i>MTM1</i>	300415	Xq28	NM_000252	Hemizigose	9	nonsense	c.700G>T	p.Glu234*
1.3	<i>MTM1</i>	300415	Xq28	NM_000252	Hemizigose	4	missense	c.205C>T	p.Arg69Cys
1.4	<i>MTM1</i>	300415	Xq28	NM_000252	Hemizigose	10	frameshift	c.947_51del	
1.5	<i>MTM1</i>	300415	Xq28	NM_000252	Hemizigose	11	missense	c.1234A>G	p.Ile412Val
1.6	<i>MTM1</i>	300415	Xq28	NM_000252	Hemizigose	13	nonsense	c.1420C>T	p.Arg474*
1.7	<i>MTM1</i>	300415	Xq28	NM_000252	Heterozigose		macrodeleção		
2.1	<i>DNM2</i>	602378	19p13.3	NM_001005360	Heterozigose	8	missense	c.1115T>G	p.Phe372Cys
2.2	<i>DNM2</i>	602378	19p13.3	NM_001005360	Heterozigose	8	missense	c.1102G>A	p.Glu368Lys
3.1	<i>RYR1</i>	180901	19q13.2	NM_000540	Heterozigose	14	def. splicing	c.1576+1G>A	
	<i>RYR1</i>	180901	19q13.2	NM_000540	Heterozigose	44	missense	c.7093G>A	p.Gly2365Arg
3.2	<i>RYR1</i>	180901	19q13.2	NM_000540	Heterozigose	42	def. splicing	c.6797-6_6798del	
	<i>RYR1</i>	180901	19q13.2	NM_000540	Heterozigose	66	missense	c.9892G>A	p.Ala3298Thr
3.3	<i>RYR1</i>	180901	19q13.2	NM_000540	Heterozigose	33	nonsense	c.4837C>T	p.Gln1613*
	<i>RYR1</i>	180901	19q13.2	NM_000540	Heterozigose	26	missense	c.3523G>A	p.Glu1175Lys
3.4	<i>RYR1</i>	180901	19q13.2	NM_000540	Heterozigose	65	missense	c.9611C>T	p.Ala3204Val
	<i>RYR1</i>	180901	19q13.2	NM_000540	Heterozigose	101	missense	c.14545G>A	p.Val4849Ile
3.5	<i>RYR1</i>	180901	19q13.2	NM_000540	Heterozigose	43	def. splicing	c.7027G>A	p.Gly2343Ser
	<i>RYR1</i>	180901	19q13.2	NM_000540	Heterozigose	94	missense	c.13672C>T	p.Arg4558Trp
3.6	<i>RYR1</i>	180901	19q13.2	NM_000540	Heterozigose	25	missense	c.3224G>A	p.Arg1075Gln
	<i>RYR1</i>	180901	19q13.2	NM_000540	Heterozigose	74	missense	c.10882C>G	p.Arg3628Gly
3.7	<i>RYR1</i>	180901	19q13.2	NM_000540	Heterozigose	8	missense	c.725G>A	p.Arg242Lys
	<i>RYR1</i>	180901	19q13.2	NM_000540	Heterozigose	69	def. splicing	c.10348-6C>G	
4.1	<i>DMPK?</i>								
4.2	??								
4.3	<i>TTN</i>	188840	2q31.2	NM_001267550	Heterozigose	73	frameshift	c.17133insG	
	<i>TTN</i>	188840	2q31.2	NM_001267550	Heterozigose	360	def. splicing	c.98827+1C>T	
4.4	<i>SYNE2</i>	608442	14q23.2	NM_015180	Heterozigose	103	missense	c.18632C>T	p.Thr6211Met
4.5	??								

MIM: Mendelian Inheritance in Men; Def. splicing: defeito de splicing; AA: aminoácido;

4.1 Famílias com mutação no gene *MTM1*

Mutações no gene *MTM1* foram identificadas em 7 famílias: as 6 famílias originalmente diagnosticadas como MTM segundo critérios clínicos ou histológicos, incluindo o paciente que não foi submetido a biópsia muscular, e uma paciente do sexo feminino, a qual havia recebido diagnóstico histológico de miopatia centronuclear e apresentou-se como portadora manifestante de deleção em heterozigose no gene *MTM1*, detectada por técnica de MLPA. Na figura 5, abaixo, estão representados os heredogramas das famílias com mutações no gene *MTM1*. Alguns aspectos fenotípicos clínicos e histológicos dos pacientes, sumarizados nas tabelas 4 e 5, são ilustrados nas figuras 6 a 10.

Figura 5. Heredogramas das famílias com mutações no gene *MTM1*

4.1.1 Família 1.1

O probando é do sexo masculino, 4 anos, filho único de pais não consanguíneos, nasceu de parto cesáreo com 8 meses de gestação devido a retardo de crescimento intrauterino, com hipotonia grave, choro fraco e insuficiência respiratória, tendo sido imediatamente intubado e admitido em UTI neonatal. Após várias tentativas de retirada do suporte ventilatório, foi submetido a traqueostomia e liberado da UTI aos 2 meses, ainda com tubo de gastrostomia. Recebeu alta hospitalar com 4 meses e meio, usando BiPAP à noite e durante infecções respiratórias, que foram se tornando menos frequentes e menos graves. Houve melhora progressiva do quadro geral a partir da alta hospitalar, apesar de evoluir com atraso importante de desenvolvimento para marcos motores – no momento, aos 3 anos de idade, ainda tem sustento cefálico incompleto, só consegue sentar-se sem apoio por alguns minutos, não consegue rolar a partir da posição supina ou ser colocado de pé. Apresenta hipotonia importante e fraqueza muscular proximal maior que distal, fácies miopática alongada com fronte proeminente, ptose bilateral leve, oftalmoparesia e fraqueza facial, além de palato ogival. Aos 2 anos e meio foi submetido a ablação de glândulas salivares para melhor controle de sialorréia. Tem cognição preservada e comunica-se através de linguagem de sinais, da qual sua mãe é instrutora.

A dosagem sérica de CPK sempre esteve dentro da faixa normal. Na investigação inicial para causas centrais de síndrome do bebê hipotônico, em ressonância nuclear magnética de crânio foi observado atrofia do hemisfério cerebelar esquerdo. Apesar disto, o paciente não apresenta ao exame físico qualquer sinal de assimetria na hipotonia ou coordenação.

A mãe do paciente tem ptose leve da pálpebra direita, sem outros sinais ao exame físico. A história familiar sugere que um tio materno da mãe possa ter tido a mesma doença: teve um quadro similar de hipotonia e fraqueza

muscular ao nascer, com óbito aos 4 anos após infecção respiratória. No entanto, nunca foi investigado.

O paciente foi submetido a biópsia muscular aos 8 meses no m. bíceps braquial, a qual mostra numerosas fibras com núcleos centralizados na coloração HE. A reação NADH-TR mostra que a maioria das fibras apresenta a característica típica da miopatia miotubular, de atividade oxidativa aumentada no centro das fibras musculares circundada por um halo periférico claro²⁷. No entanto, também há algumas fibras consistentes com o achado mais recente de fibras “em colar” em pacientes com a forma grave clássica de MTM¹⁸. A reação de ATPase com o pH de 4.3 mostra uma evidente predominância de fibras tipo 1, um achado consistente com miopatias congênitas em geral.

O sequenciamento do gene *MTM1* identificou uma mutação nonsense no exon 3 (p.Arg29*, c.85C>T), a qual trunca a proteína em uma posição precoce. Esta mutação já foi relatada diversas vezes e está associada com o fenótipo clássico da miopatia miotubular^{5, 6, 65, 66}. O exon 3 também foi sequenciado na mãe, confirmando que ela é portadora da mesma mutação.

4.1.2 Família 1.2

O probando é do sexo masculino, 8 anos, terceiro filho de um casal não consanguíneo, sem outros afetados família. Nasceu de parto cesário aos 8 meses devido a poliídramnia e pré-eclâmpsia, com hipotonia profunda e insuficiência respiratória, para a qual foi prontamente intubado e admitido em UTI neonatal. Aos 3 meses, foi submetido a gastrostomia e traqueostomia e retirado do suporte ventilatório, mas após uma semana apresentou dificuldade para respirar e foi reintroduzido à ventilação mecânica, tornando-se dependente desde então. Evoluiu com atraso importante no desenvolvimento motor, adquirindo sustento cefálico apenas com 1 ano de idade e sentando sem apoio aos 2 anos e 6 meses; nunca conseguiu ficar de pé. No entanto, o

curso motor sempre foi estável, sem períodos de piora. Por outro lado, teve atraso cognitivo, para o qual não é possível descartar como etiologia evento anóxico ocorrido aos 3 meses de idade, apesar de apresentar exame de imagem normal após o episódio. Foi submetido a remoção de glândulas salivares aos 5 anos para controle de sialorréia.

Ao exame físico, apresenta o fenótipo típico de miopatia miotubular, caracterizado por fraqueza facial e oftalmoparesia, face alongada com palato ogival, associada a fraqueza muscular proximal maior que distal, além de hipotonia.

A CPK sempre esteve na faixa normal. Biópsia muscular feita aos 5 meses no m. deltoide mostra núcleos centralizados típicos com o aspecto de miotubos no centro das fibras musculares na coloração HE, além de atividade oxidativa aumentada no centro das fibras, circundada por uma área mais clara, quando a reação NADH-TR é feita.

O probando tem uma mutação nonsense no exon 9 do gene *MTM1*, que não havia sido relatada anteriormente (p.Glu234*, c.700G>T). Presume-se a patogenicidade desta mutação por causar uma parada prematura na tradução da miotubularina, a qual gera uma enzima truncada com função alterada. A mãe apresenta a mesma mutação em heterozigose, comprovando o estado portador.

4.1.3 Família 1.3

O probando é do sexo masculino, 1 ano e 8 meses, segundo filho de pais não consanguíneos, nasceu a termo em uma gestação com movimentos fetais reduzidos e poliídramnia, para ser intubado após 30 minutos por insuficiência respiratória. Seu peso e comprimento ao nascer estavam no percentil 75 das curvas de crescimento da OMS e permaneceram assim desde

então. Foi possível realizar o desmame do suporte ventilatório e oxigênio em menos de um mês, mas optou-se por realizar traqueostomia com 1 mês e 10 dias após o paciente ter broncoaspirado devido a fraqueza para deglutir, motivo pelo qual também recebeu gastrostomia. Recebeu alta hospitalar aos 5 meses, e segue em cuidados domiciliares especializados com fisioterapia e fonoterapia diários.

Aos 6 meses, ainda não consegue segurar completamente a cabeça, senta com apoio, mas não sem apoio. Vem tendo melhora progressiva, com tônus maior que ao nascimento; eleva membros inferiores contra a gravidade, mas não os membros superiores. A oftalmoparesia também está melhorando. Usa BIPAP apenas à noite.

O fenótipo do paciente inclui paralisia facial leve e oftalmoparesia, além de palato ogival. Apresenta hipotonia e tem fraqueza em membros proximal maior que distal.

A dosagem de CPK sempre foi normal, e uma eletroneuromiografia mostrou um padrão miopático. A biópsia do músculo bíceps braquial, feita aos 3 meses, mostrou o aspecto típico de miopatia miotubular, com aumento do número de núcleos centralizados em miofibras, além de predominância de fibras atrofiadas do tipo 1 nas reações de ATPase, as quais apresentavam ainda aumento da atividade oxidativa na reação NADH-TR.

O primeiro filho do casal foi um menino que teve óbito aos 16 dias por sepsse consequente a pneumonia. Após gestação sem intercorrências, foi intubado ao nascer devido insuficiência respiratória e hipotonia, e não foi possível retirar o suporte ventilatório após várias tentativas. Não foi feita biópsia muscular deste paciente, ou coletado material biológico para exame genético.

O sequenciamento do gene *MTM1* no probando mostrou uma mutação clássica no exon 4 (p.Arg69Cys, c.205C>T), relatada várias vezes^{60, 66-69}. Esta mutação está associada a um fenótipo menos grave de miopatia miotubular e

foi bastante estudada. Mostrou-se que a mutação induz ao “skipping” do exon 4 em modelos animais e em seres humanos, o qual leva a término prematuro da tradução da miotubularina⁶⁹. No entanto, foi demonstrado que algum RNA mensageiro com tamanho completo é transcrito, respondendo pela tradução de miotubularina suficiente para justificar o fenótipo mais leve. O sequenciamento da mãe demonstrou que a mesma é portadora assintomática da mesma mutação.

4.1.4 Família 1.4

O probando é do sexo masculino, primeiro filho de um casal não consanguíneo, nasceu a termo de uma gestação sem intercorrências por parto cesáreo, e teve que ser reanimado e intubado na sala de parto devido a insuficiência respiratória. Aos 3 meses, foi submetido a gastrostomia e traqueostomia porque ainda não podia engolir ou respirar adequadamente. Foi liberado da UTI aos 6 meses e recebeu alta hospitalar pouco após, para receber cuidados domiciliares. O sustento cefálico foi adquirido parcialmente aos 8 meses, e ele nunca conseguiu sentar, mesmo sem apoio, apesar de ter ampla mobilidade em membros, incluindo elevação contra a gravidade. No entanto, ao exame apresentava fraqueza muscular em membros contra oposição e resistência. Tinha face alongada, com fraqueza leve percebido através de reduzida expressão facial, palato ogival e oftalmoparesia leve.

A CPK foi normal, e sua biópsia muscular, coletada no músculo deltoide aos 3 meses mostrou núcleos centralizados típicos na maioria das miofibras em HE, associadas com aumento da atividade oxidativa no centro da maioria das fibras na reação NADH-TR. Em sua primeira visita ambulatorial, aos 8 meses, no entanto, apresentou considerável melhora no tônus e mobilidade de membros, e foi considerado como portador de um fenótipo leve de miopatia miotubular, a ponto de ser posta em dúvida este diagnóstico, do ponto de vista

clínico, uma vez que naquele momento o paciente ainda não tinha diagnóstico molecular.

A criança faleceu aos 9 meses de idade por choque hipovolêmico súbito, o qual foi atribuído a ruptura de um cisto hepático, de acordo com exame post-mortem. No entanto, não foi feito exame microscópico específico no tecido hepático para determinar se o paciente era portador de peliose hepática.

Os resultados do sequenciamento do gene *MTM1* confirmaram uma deleção de 5 nucleotídeos no exon 10 (c.947_951del), mutação “frameshift” que gera um códon de parada no mesmo exon, truncando a proteína prematuramente. Esta mutação nunca foi relatada, e antecipa-se que gere uma miotubularina não funcional. O sequenciamento do exon 5 no DNA materno demonstrou a deleção em heterozigose, confirmando seu estado de portadora assintomática.

4.1.5 Família 1.5

O probando é do sexo masculino, filho único de pais não consanguíneos, nascido de parto cesáreo com 41 semanas de uma gestação sem intercorrências, durante a qual a mãe observou movimentos fetais reduzidos. Ao nascer, o probando não conseguia chorar ou deglutir, e precisou de reanimação cardiopulmonar após parada respiratória, intubação orotraqueal e admissão em UTI neonatal. Antes da alta da UTI aos 4 meses e meio, foi submetido a traqueostomia e gastrostomia. Após liberação hospitalar, evoluiu com lenta mas persistente aquisição de marcos de desenvolvimento motor: sentou com apoio aos 11 meses, sem apoio com 1 ano e 2 meses, mesma idade em que adquiriu sustento cefálico; podia ser colocado em ortostase com apoio com um ano e meio, mas nunca conseguiu permanecer de pé sem apoio, caminhar ou engatinhar. Apesar de um curso motor estável, sofria de infecções pulmonares recorrentes, pelas quais precisou de admissão hospitalar por 5

vezes, com suporte ventilatório invasivo. Fora dos períodos de infecção, necessitava apenas de BIPAP noturno.

Ao exame, o paciente apresentava um fenótipo típico de miopatia miotubular, com face alongada, fronte proeminente, expressão facial reduzida, ptose, oftalmoparesia e palato ogival, associados a fraqueza proximal maior que distal, além de fraqueza cervical.

Aos 3 anos e 5 meses, esta criança teve óbito súbito pelo que aparentou ser choque hipovolêmico, de acordo com a descrição da mãe. O paciente queixou-se de dor no abdome e tornou-se progressivamente pálido e frio, com aumento da frequência cardíaca e pulsos diminuídos. A autópsia infelizmente não foi realizada para verificar a verdadeira causa do óbito, mas este paciente pode ter falecido de hemorragia hepática, como ocorreu com o caso 1.4.

A biópsia muscular, realizada com 2 anos e 4 meses no m. deltoide, mostra uma abundância de fibras musculares com núcleos centralizados de aspecto típico para a miopatia miotubular, além de fibras “em colar”, as quais podem ser observadas na coloração HE. Elas também podem ser individualizadas na reação NADH-TR, entre várias outras fibras que apresentam a típica atividade oxidativa central aumentada.

O sequenciamento do gene *MTM1* realizado no DNA da mãe mostrou uma mutação em heterozigose no exon 11 (p.Ile412Val, c.1234A>G), a qual já foi descrita em pacientes acometidos pela MTM¹².

4.1.6 Família 1.6

O probando é do sexo masculino, 5 anos, filho único de pais não consanguíneos, nascido de gestação com poliídramnia e movimentos fetais reduzidos percebidos pela mãe após o sexto mês, por parto cesáreo, com 35

semanas. Imediatamente após o parto, foi observada hipotonia profunda e insuficiência respiratória, resultando em intubação imediata e admissão em UTI neonatal. Aos 6 meses, foi submetido a traqueostomia e gastrostomia. Só recebeu alta da UTI com 1 ano e 1 mês devido a complicações respiratórias e distúrbio de deglutição. Mesmo após a alta hospitalar, já teve 3 admissões hospitalares devido a pneumonia, incluindo uma admissão em UTI. No momento, em uso de BiPAP com desmame progressivo, consegue permanecer até 6 horas diárias sem suporte ventilatório. Durante o período neonatal, foi detectada a presença de criptorquidia, corrigida cirurgicamente.

Ao exame, o paciente apresenta fácies alongada, com semiptose palpebral e oftalmoparesia bilaterais, boca triangular com cantos voltados para baixo, palato ogival e paralisia facial bilateral. Hipotonia muscular generalizada, fraqueza muscular de predomínio proximal em quatro membros, e retrações redutíveis bilateralmente em joelhos. CPK dentro da normalidade.

Não foi feita biópsia muscular para este caso. Após a suspeita de miopatia miotubular pelas características clínicas, foi feito diretamente o sequenciamento do gene *MTM1*, que demonstrou a mutação no exon 13 (p.Arg474*, c.1420C>T), a qual já havia sido relatada previamente em vários trabalhos^{6, 60, 66}.

4.1.7 Família 1.7

Probando do sexo feminino, 13 anos, única afetada em uma família de pais não consanguíneos. A mãe percebeu movimentos fetais reduzidos durante a gestação, e a criança nasceu com hipotonia, mas não houve envolvimento respiratório neonatal ou necessidade de terapia intensiva. Houve atraso do desenvolvimento para marcos motores durante o primeiro ano de vida, mas a paciente eventualmente adquiriu capacidade de deambular, com melhora progressiva, apesar de lenta, sempre com menor aptidão física quando

comparada a crianças da mesma idade. A partir dos 7 anos de idade, passou a ter dificuldade para subir escadas e levantar-se de lugares baixos, e veio piorando progressivamente, com envolvimento de membros superiores. Desenvolveu contraturas múltiplas, mais evidentes em membros inferiores. Agora não consegue elevar membros superiores ou inferiores contra a gravidade, e encontra-se limitada a cadeira de rodas devido a contraturas bilaterais em calcâneos.

Ao exame, a paciente apresenta paresia facial assimétrica associada a ptose da pálpebra direita, palato ogival, tetraparesia flácida com predomínio proximal além de fraqueza cervical para flexão. Contraturas irreduzíveis em calcâneos e joelhos bilateralmente, redutíveis em cotovelos e punhos também bilateralmente, além de escoliose leve. Exames apontaram função cardíaca e respiratória normais até o momento. A CPK, dosada em vários momentos, sempre esteve dentro da faixa normal.

A biópsia muscular, realizada aos 6 anos no m. deltoide, mostra um padrão miopático sugestivo de miopatia centronuclear, com aumento da variabilidade de tamanho das fibras musculares, aumento das centralizações e internalizações nucleares, e predomínio de fibras do tipo 1. A reação NADH-TR mostra a presença em grande quantidade de fibras em colar, além de falhas focais na atividade oxidativa em diversas fibras. Algumas fibras apresentam ainda aumento da atividade oxidativa na região central, semelhante ao padrão típico encontrado na miopatia miotubular.

O sequenciamento Sanger do genes *MTM1*, *BIN1* e hot spots do gene *DNM2* não mostraram qualquer alteração nesta paciente. Exame de MLPA, no entanto, detectou uma deleção em heterozigose extensa, envolvendo todo o gene *MTM1*, além dos genes próximos *MTMR1*, *IDSP1* e *MAMLD1*. Exame de inativação do cromossomo X realizado posteriormente não mostrou inativação preferencial significativa, resultando em proporção 40/60.

Figura 6. Características clínicas dos pacientes com MTM. Foram observadas intensa hipotonia (A, B, C) e limitação respiratória, mesmo que parcial, com todos os pacientes necessitando de traqueostomia. Para nutrição, gastrostomia foi invariavelmente necessária devido à dificuldade de deglutição (C, D). Probandos das famílias: 1.3 (A), 1.2 (B), 1.5 (C), 1.6 (D).

Figura 7. Aspectos faciais dos pacientes com MTM. Os casos apresentaram-se com face alongada, fronte proeminente, graus variados de ptose e oftalmoparesia, boca de aspecto triangular com cantos voltados para baixo e diparesia facial (A, B, C, D, E). Alguns casos não apresentaram a fácies típica (F). Probandos das famílias: 1.5 (A), 1.1 (B), 1.2 (C), 1.3 (D), 1.6 (E), 1.4 (F).

Figura 8. Histologia da MTM. Observaram-se fibras musculares sem o contorno poligonal, apresentando em seu centro núcleo grande e arredondado com aspecto de miotubo (HE; A, B e C). Na reação de ATPase 4.3 (D), observaram-se atrofia e predomínio de fibras tipo 1, as quais acumulam área não preenchida em seu centro, correspondente à posição do núcleo. Probandos das famílias: 1.2 (A), 1.5 (B), 1.4 (C), 1.3 (D).

Figura 9. Histologia da MTM na reação oxidativa NADH-TR. A maioria das fibras apresentou aumento intenso da atividade oxidativa em seu centro, circundadas por um halo claro (pontas de seta). Dois casos apresentaram fibras em colar (setas). Houve uma predominância marcante de fibras tipo 1, quase completa na maioria dos casos. Quando foi possível distinguir duas populações de fibras, as fibras tipo 1 foram menores e mais numerosas (C). Probandos das famílias: 1.5 (A); 1.1 (B); 1.3 (C); 1.2 (D).

Figura 10. Probando da família 1.7, portadora manifestante com macrodeleção no gene *MTM1*. A: aspectos faciais, mostrando semiptose palpebral direita e diparesia facial. B: coloração Gömöri mostrando aumento da variabilidade de tamanho das fibras associadas a centralizações nucleares. C: reação NADH-TR mostrou numerosas fibras em colar, além de uma fibra com aumento da atividade oxidativa em reação central.

4.2 Famílias com mutação no gene *DNM2*

Apenas duas pacientes apresentaram mutações no gene *DNM2*, em famílias com um único afetado. Ambas apresentavam características histológicas que sugeriam o gene *DNM2* como responsável, além de quadro clínico típico de miopatia centronuclear. A figura 11, abaixo, apresenta os heredogramas das famílias, e as figuras 12 e 13 mostram aspectos faciais e histológicos destes casos, respectivamente.

Figura 11. Heredogramas das famílias com mutações no gene *DNM2*.

4.2.1 Família 2.1

O probando é do sexo feminino, 20 anos, quinta filha de uma prole de 5 filhos de um casal não consanguíneo, dos quais é a única afetada. Ao nascer de parto cesariano a termo, de uma gestação sem intercorrências, a mãe percebeu que a criança era “molinha”, com choro fraco e dificuldade para sugar. No entanto, evoluiu sem atraso motor no primeiro ano de vida, tendo andado com 1 ano e 2 meses, chegou a correr e andar de bicicleta. Aos 6 anos, começou a apresentar deformidade progressiva nos pés e escoliose, as quais motivaram o início da investigação médica, e iniciou quadro de fraqueza muscular, com dificuldade para subir escadas e levantar-se de posições baixas, com evolução lenta. Aos 12 anos, tornou-se cadeirante principalmente devido

às deformidades em pés. No momento, tem mantido estabilidade na evolução do quadro motor, mas iniciou acometimento respiratório com dispneia aos mínimos esforços, cefaleia matinal e sonolência diurna excessiva, o qual foi demonstrado por padrão restritivo grave (CVF 18% do predito para sexo e idade) em prova de função pulmonar.

Ao exame, paciente cadeirante, não deambula devido deformidade bilateral em pés, porém consegue manter-se de pé quando posicionada, com órteses. Apresenta fácies alongada, com ptose, oftalmoparesia bilateral com limitação para movimentos em todas as direções, paresia facial bilateral, boca triangular de cantos voltados para baixo, palato ogival e micrognatia. Padrão de atrofia muscular generalizada, deformidade torácica sob a forma de pectus excavatum, escoliose importante em S, retrações não redutíveis bilateralmente em joelhos em tornozelos.

Dosagens de CPK normais. Ecocardiograma transtorácico mostrou prolapso leve da válvula mitral e tricúspide, com fração de ejeção normal (58%). Holter com a presença de batimentos ectópicos supraventriculares em excesso, associados a aberrância e bigeminismo.

Biópsia muscular realizada aos 16 anos em m. bíceps braquial mostra aumento da variabilidade de tamanho das fibras musculares, presença de centralizações e internalizações nucleares, proliferação do tecido conjuntivo endomisial lembrando um padrão distrófico, além de predomínio de fibras tipo 1. A reação NADH-TR mostra o padrão típico de fitas sarcoplasmáticas radiadas, ou “roda de carroça”.

O sequenciamento do gene *DNM2* mostrou a mutação em heterozigose c.1115T>G, p.Phe372Cys, no exon 8. Tal mutação é interpretada como patogênica em diversas ferramentas de predição, e nunca havia sido descrita como causadora de miopatia centronuclear. Análise de segregação por sequenciamento Sanger do exon 8 em familiares mostrou que se trata de uma mutação *de novo* no caso índice.

4.2.2 Família 2.2

O probando é do sexo feminino, 16 anos, filha única de casal não consanguíneo, nascida de parto cesário aos 8 meses de uma gestação sem intercorrências, onde a mãe presenciou poucos movimentos fetais. Apresentou baixo peso (1500 g) ao nascer, com hipóxia neonatal leve, tendo necessitado permanecer por 1 mês em incubadora, em uso de O₂. Após alta hospitalar, desenvolveu-se bem durante o primeiro ano de vida, com DNPM normal, e deambulou com 1 ano de idade. Até os 9 anos de idade, chamava a atenção da mãe a ptose palpebral e a face alongada, mas a paciente apresentava comprometimento motor mínimo. Após essa idade, no entanto, começou a apresentar fraqueza muscular evidente, com muitas quedas, lentidão e dificuldade para subir escadas, com piora progressiva, porém lenta. No momento, não consegue levantar-se da cadeira ou do chão sem ajuda. Só anda se for colocada de pé. Mastiga lentamente, mas não engasga.

Ao exame, apresenta face típica de miopatia centronuclear, alongada, com ptose palpebral bilateral e palato ogival, fraqueza muscular de predomínio proximal em quatro membros, fraqueza cervical para flexão, retrações fixas bilaterais em calcâneos e leves em joelhos.

A CPK sempre foi normal. Realizou ENMG, que mostrou padrão miopático, recebendo indicação de biópsia muscular. A biópsia muscular, feita aos 13 anos em m. deltoide, mostrou um padrão típico de miopatia centronuclear, com centralizações e internalizações nucleares na maioria das fibras. Havia leve proliferação de tecido conjuntivo no endomísio, além de aumento da variabilidade do tamanho das fibras. A reação NADH-TR mostrou o aspecto típico de fibras com fitas sarcoplasmáticas radiadas, ou padrão em “roda de carroça”, as quais apontavam para o gene *DNM2* como provável implicado na doença.

O sequenciamento por técnica de Sanger do gene *DNM2* mostrou, em heterozigose, a mutação c.1102G>A, p.Glu368Lys, já conhecida como patogênica^{70, 71}. Análise de segregação em familiares mostrou que se trata de mutação *de novo*.

Figura 12. Pacientes com miopatia centronuclear e mutações no gene *DNM2*. Observaram-se face alongada, diparesia facial, ptose e oftalmoparesia. A: probando da família 2.1; B: probando da família 2.2.

Figura 13. Histologia da MCN por mutações no gene *DNM2*. Observaram-se fibras musculares arredondadas com aumento das centralizações nucleares nas colorações HE e Gömöri (A, C). Na reação NADH-TR, observaram-se fibras com estrias sarcoplasmáticas radiadas, ou aspecto de “roda de carroça” (B, seta) e ainda algumas fibras em colar (B, D). Probandos das famílias: 2.2 (A, B), 2.1 (C, D).

4.3 Famílias com mutação no gene *RYR1*

Um total de 10 pacientes, provenientes de 7 famílias com diagnóstico clínico e histológico de miopatia centronuclear, apresentaram o gene *RYR1* como o responsável pela doença, todos com mutações em heterozigose composta. A irregularidade de atividade oxidativa na biópsia da maioria destes pacientes apontavam *RYR1* como possibilidade de diagnóstico molecular. Os heredogramas das famílias podem ser vistas na figura 14, abaixo. As figuras 15 e 16 mostram alguns aspectos clínicos e histológicos destes pacientes.

Figura 14. Heredogramas das famílias com mutações no gene *RYR1*.

4.3.1 Família 3.1

Casal não consanguíneo não afetado, com um casal de filhos afetados. O probando tem 5 anos, sexo masculino, nasceu a termo de parto normal de uma gestação sem intercorrências, com hipotonia e dificuldade de sucção, porém não necessitou de terapia intensiva. Evoluiu com atraso do desenvolvimento motor, com eventual aquisição dos principais marcos (sustento cefálico aos 6 meses, sentar com apoio com 1 ano, marcha com 1 ano e 8 meses). No momento, as limitações funcionais principais são para subir e descer escadas, ocasiões em que necessita apoiar-se no corrimão.

Ao exame, apresenta fácies alongada, com palato ogival, hipotonia com hiperextensibilidade de membros, retrações redutíveis em tornozelos bilateralmente, pectus excavatum, fraqueza cervical para flexão grau 2 da escala MRC, fraqueza apendicular proximal grau 4+ da escala MRC, força distal normal. A dosagem de CPK foi 107 (normal), e exames cardíacos não mostraram qualquer alteração. Biópsia muscular colhida aos 6 meses no deltoide mostra predominância de fibras tipo 1, com centralizações nucleares proeminentes concentradas neste tipo de fibra. Reações oxidativas mostram aumento da atividade central em algumas fibras, mas não há falhas focais.

Irmã do probando, com 12 anos de idade, teve história clínica semelhante. Nascida a termo de parto normal, gestação sem intercorrências, apresentou hipotonia e dificuldade de sucção neonatal, sem consequências imediatas e com melhora subsequente. Evoluiu com atraso de marcos motores no primeiro ano de vida e eventual aquisição de capacidades. No momento, não apresenta limitações funcionais motoras.

Ao exame, apresenta fácies ligeiramente alongada, com semiptose palpebral bilateral e palato ogival, hipotonia leve com hiperextensibilidade apendicular, retrações redutíveis leves em tornozelos, pior à direita, e força muscular quase normal, reduzida apenas em flexores do quadril, grau 4+ da

escala MRC. CPKs dentro da faixa normal (24 e 87, aos 6 anos), exames cardíacos normais. Biópsia muscular realizada aos 6 anos, também em m. deltoide, mostra alterações mais leves que a do probando, com leve aumento das centralizações nucleares, porém sem predominância de tipos de fibra, mas foram observadas algumas falhas focais de atividade oxidativa na reação NADH-TR.

Após exclusão dos exons hot spot do gene *DNM2*, além do sequenciamento completo dos genes *MTM1* e *DNM2*, foi feito sequenciamento de exoma dos dois paciente, e após filtragem de variantes, foram detectadas mutações em heterozigose composta no gene *RYR1*, confirmadas posteriormente por sequenciamento Sanger nos dois casos e segregando adequadamente com os pais. A mutação c.1576+1G>A, proveniente do pai, perturba o sítio primário doador de splicing do intron 14, com escores altos e concordantes de patogenicidade em diversas ferramentas de predição de efeito de splicing. A segunda mutação, proveniente da mãe, trata-se da c.7093G>A, p.Gly2365Arg, no exon 44, que tem predição de patogenicidade em múltiplas ferramentas. As duas variantes nunca foram descritas antes, e não estão presentes no banco de variantes EVS.

4.3.2 Família 3.2

O probando tem 12 anos, sexo masculino, segundo filho de um casal não consanguíneo não afetado, nasceu de parto normal a termo, sem intercorrências perinatais. Bebê hipotônico, evoluiu com atraso de desenvolvimento para marcos motores, adquirindo sustento cefálico aos 11 meses, deambulação com 1 ano e 10 meses. Teve melhora progressiva após fisioterapia motora, e no momento permanece estável. Não consegue levantar-se de lugares baixos sem ajuda, sobe escadas com apoio de corrimão, mas caminha no plano de forma independente. Tem dificuldade para mastigar e engolir, acompanhando com fonoaudiologia, mas não tem dificuldade

respiratória, e nunca teve infecções respiratórias graves. Ao exame físico, apresenta boca triangular com cantos voltados para baixo, fraqueza facial, palato ogival, porém motricidade ocular extrínseca preservada; fraqueza muscular em quatro membros de predomínio proximal (escala MRC grau 3 simétrico proximal, grau 4- distal em membros superiores e 4+ distal em membros inferiores), associada a hipotonia. Tem pectus excavatum, escápula alada, discreta lordose lombar e hipertrofia de panturrilhas. Dosagem de CPK levemente aumentada (29 e 64 aos 2 anos de idade, com referência < 20). A biópsia muscular do probando, realizada aos 5 anos em m. deltoide, mostra predominância de fibras do tipo 1, centralizações nucleares proeminentes na maioria das fibras musculares, além de falhas focais na atividade oxidativa das fibras musculares nas reações NADH-TR e SADH.

A irmã mais nova do probando, 7 anos, também nascida de parto normal a termo, sem intercorrências, apresentou quadro de hipotonia desde o nascimento, associada a atraso no desenvolvimento motor. Devido ao diagnóstico prévio do irmão, a paciente recebeu terapia com reabilitação mais cedo, evoluindo com estabilidade e aquisição eventual dos marcos motores, tendo andado com 1 ano e 10 meses. Ao contrário deste, apresentou quadro de infecções respiratórias baixas de repetição a partir dos 10 meses até os 3 anos de idade, tendo melhorado após início de trabalho de fisioterapia respiratória. No momento, tem grande dificuldade para levantar-se de cadeira, não consegue levantar-se do chão, não consegue subir ou descer escadas. Não apresenta dificuldade para mastigar ou engolir. Ao exame, apresenta discreto palato ogival, sem alterações da mímica facial, hipotonia global, com hiperelasticidade distal em membros, fraqueza em membros com predomínio proximal (grau 4+ proximal e distal em membros superiores, 4+ proximal e 5 distal em membros inferiores), discreta lordose, hipertrofia de panturrilhas. A irmã não teve biópsia muscular colhida.

Na família, a primeira filha do casal, agora com 15 anos, não tem acometimento. Um primo de primeiro grau da avó paterna do probando, agora com cerca de 60 anos, apresenta “problema muscular”, sem diagnóstico, que

se iniciou na infância, e agora é cadeirante. Um tio paterno do probando teve dois filhos gêmeos, um dos quais faleceu ao nascer, e o outro sobreviveu, hipotônico, demorou para andar, caía bastante, mas teve evolução estável, e hoje, com 19 anos, apresenta alguma limitação motora mas é mais “forte” que o probando. Se supusermos tratar-se da mesma condição, o mecanismo de herança familiar sugerido é autossômico recessivo.

Após exclusão dos genes *DNM2*, *MTM1* e *BIN1*, foi feito sequenciamento de exoma a partir do DNA dos dois irmãos afetados. Os resultados da filtragem mostraram que ambos possuem duas mutações patogênicas no gene *RYR1* em heterozigose composta, com segregação familiar confirmada por sequenciamento Sanger. A primeira (c.6797-6_6798del), proveniente do pai, e não presente na irmã não afetada, é uma deleção de 8 nucleotídeos que interrompe o sítio primário acceptor de splicing entre o intron 41 e o exon 42, levando ainda a truncagem prematura da proteína. A segunda (c.9892G>A, p.Ala3298Thr), proveniente da mãe, é uma mutação missense no exon 66, com predição de patogenicidade em múltiplas ferramentas. Ambas são mutações nunca antes descritas, não presentes no banco de variantes EVS, o que sugere que possam ser mutações privadas da família.

4.3.3 Família 3.3

O probando tem 51 anos, sexo masculino, filho de casal não consanguíneo não afetado, segundo filho de um total de 4 irmãos, dos quais uma irmã mais nova é afetada. Dois irmãos mais velhos não são afetados, e têm filhos não afetados. Não há outros afetados na família. O probando teve dois filhos, um falecido aos 23 anos por leucemia, sem evidências de miopatia, e uma filha saudável. Após gestação sem intercorrências, a mãe observou que o paciente tinha um pouco mais de dificuldade para adquirir marcos do desenvolvimento motor durante o primeiro ano de vida, porém com eventual

aquisição completa. Durante a infância, levantava-se apoiando em objetos, subia escadas usando corrimão, andava de bicicleta no plano, mas ajudava empurrando os membros inferiores com as mãos quando tinha que fazer esforço. Aos 18 anos, já tinha uma certa dificuldade de nadar, levantava do sofá "escalando". Evoluiu com progressão lenta ao longo da idade adulta, com pioras eventuais quando suspende reabilitação, viaja ou ganha peso. No momento, independente para atividades de vida diária, necessita de ajuda para levantar-se, deambula com apoio manual unilateral. Tem certa dificuldade para mastigar e deglutir. Ao exame, apresenta fraqueza facial simétrica, oftalmoparesia leve para todas as direções do olhar, marcha anserina, hipotrofia global, fraqueza muscular simétrica de predomínio proximal (MRC grau 4 proximal e 5 distal em quatro membros), além de hipertrofia de panturrilhas. ENMG realizada aos 22 anos mostrou alterações miopáticas, e tem exame de CPK aos 37 anos normal.

Realizou biópsia muscular aos 44 anos em m. deltoide, a qual mostrou um padrão miopático com grande variabilidade de fibras musculares, leve proliferação do tecido conjuntivo endomisial, além de intenso predomínio de fibras apresentando internalizações e centralizações nucleares, por vezes múltiplas. Reações oxidativas mostram alterações da arquitetura interna eventuais, com aspecto semelhante a cores.

A irmã mais nova, 43 anos, tem história semelhante, com atraso de desenvolvimento para marcos motores e eventual progressão lenta. Apesar de um quadro motor mais leve, tendo evoluído com menos limitação para deambulação, apresenta limitação respiratória secundária deformidade de caixa torácica. Tem face alongada, com oftalmoparesia e fraqueza facial simétrica, além de fraqueza muscular simétrica de predomínio proximal. Realizou biópsia muscular aos 37 anos, também em m. deltoide, com aspecto semelhante ao do irmão, com grande variabilidade de tamanho das fibras musculares, leve proliferação endomisial, centralizações e internalizações nucleares proeminentes, além de falhas focais da arquitetura interna, algumas com aspecto de cores estruturados.

O probando foi sequenciado para os genes *MTM1*, *BIN1* e hot spots do *DNM2*, os quais não apresentavam alterações. Exomas dos dois irmãos afetados foram realizados, onde foram identificadas, após filtragem e análise de variantes com escores altos, duas mutações em heterozigose composta no gene *RYR1*: uma mutação nonsense no exon 33 (c.4837C>T, p.Gln1613*), além de uma mutação missense com predição de patogenicidade no exon 26 (c.3523G>A, p.Glu1175Lys). Nenhuma das duas mutações tem descrições nos bancos de mutações do gene *RYR1*, e não foram encontradas como variantes na base EVS.

4.3.4 Família 3.4

Probando do sexo masculino, 16 anos, filho único de casal não consanguíneo não afetado, gestação sem intercorrências, parto normal a termo sem complicações. No primeiro ano de vida, mãe notou hipotonia e atraso no desenvolvimento motor. Evoluiu com eventual aquisição de marcos motores, com marcha após os 5 anos, ao fazer uso de tala suro-podálica, e adquiriu estabilidade do curso da doença. No último ano, vem evoluindo com alterações em provas de função pulmonar, no momento com CVF 44% do predito para sexo e idade.

Ao exame, apresenta face alongada, palato ogival, fraqueza facial simétrica, com ligeira oftalmoparesia, hipotrofia global, pior em cinturas pélvica e escapular. Assume ortostase com apoio unilateral, em uso de tala, não consegue subir degraus ou levantar-se do chão. Tem retrações redutíveis em cotovelos e joelhos bilateralmente. Força muscular grau 4 da escala MRC globalmente, pior para abdução dos ombros. Tem escápula alada e espinha rígida.

Dosagens de CPK normais ou levemente aumentadas (169, 228 aos 11 anos), avaliação cardiológica normal. A biópsia muscular, realizada aos 13

anos em m. bíceps braquial, mostrou acentuada variação do tamanho das fibras musculares, grande aumento do tecido conjuntivo endomisial e perimisial, grande aumento da centralização nuclear, além da presença de fibras hipertrofiadas, lembrando um aspecto distrófico, sem no entanto apresentar qualquer grau de necrose ou inflamação. No entanto, reações oxidativas mostraram alterações importantes da arquitetura interna da fibras, incluindo algumas fibras com aspecto “em colar” e anelares, e as ATPases mostraram grande predomínio de fibras tipo 1, apontando para a possibilidade de uma miopatia congênita estrutural.

Após descartar mutações nos genes *MTM1*, *BIN1* e hot spots do gene *DNM2* por sequenciamento Sanger, análise de exoma detectou duas variantes em estado heterozigótico composto no gene *RYR1*: uma mutação missense no exon 65 (c.9611C>T, p.Ala3204Val), com predição de patogenicidade alta, nova, não encontrada na base de variantes EVS, além de uma mutação no exon 101 (c.14545G>A, p.Val4849Ile), patogênica conhecida, que já havia sido descrita diversas vezes, inclusive em pacientes brasileiros, em associação a um fenótipo de fraqueza axial e proximal, além de escoliose leve, em pacientes com diagnóstico histológico de doença do central core e susceptibilidade para hipertermia maligna^{72, 73}. A mutação afeta a concentração de repouso do cálcio segundo análise funcional *in vitro*⁷⁴.

4.3.5 Família 3.5

Probando do sexo feminino, 6 anos, filha única de casal não consanguíneo não afetado, fruto de uma gestação sem intercorrências, parto normal a termo sem complicações perinatais, apresentou hipotonia leve desde o nascimento, sem necessitar de UTI, e evoluiu com atraso para o desenvolvimento de marcos motores (sustento cefálico com 7 meses, marcha com 1 ano e 8 meses), porém com aquisição gradual, melhora persistente e

estabilidade. No momento tem dificuldade para correr e pular, consegue subir escada com apoio do corrimão. Não tem disfagia ou problemas respiratórios.

Ao exame, hipotônica, discreta oftalmoparesia nas extremidades do olhar, apresentando fraqueza muscular de predomínio proximal 4+ da escala MRC em cinturas escapular e pélvica, pectus excavatum, sem retrações.

Foi submetida a biópsia muscular aos 3 anos em m. bíceps braquial, a qual mostrou variabilidade do tamanho das fibras musculares, centralizações nucleares proeminentes na maioria das fibras, predominância de fibras tipo 1 e alterações da arquitetura interna das fibras nas reações oxidativas.

O sequenciamento dos genes *MTM1*, *BIN1* e hot spots do gene *DNM2* não evidenciaram alterações. Análise de exoma mostrou a presença de duas mutações em heterozigose composta no gene *RYR1*: a primeira no exon 43 (c.7027G>A, p.Gly2343Ser), missense, ainda gera novo sítio acceptor de splicing. A segunda, no exon 94 (c.13672C>T, p.Arg4558Trp), missense, tem predição de patogenicidade em múltiplas ferramentas. As mutações foram confirmadas em sequenciamento Sanger, com segregação paterna e materna.

4.3.6 Família 3.6

Probando do sexo feminino, 10 anos, filha única de pais não consanguíneos não afetados, nasceu a termo por parto normal de gestação sem intercorrências. Desde o nascimento, mãe percebeu hipotonia e atraso do desenvolvimento de marcos motores (sentou aos 9 meses, andou com mais de 2 anos), com eventual estabilidade, apesar da limitação. Aos 3 anos, iniciou quadro respiratório evidenciado por infecções pulmonares de repetição. No último ano, evoluiu com piora da função respiratória (espirometria mostrando padrão restritivo com 28% da CVF) e aumento da frequência de internações hospitalares por infecções pulmonares, uma das quais, em fevereiro de 2013,

necessitou de IOT e antibioticoterapia IV em UTI. Após as internações, demora para recuperar a função motora, mas eventualmente atinge a capacidade máxima anterior. No momento, consegue levantar-se da cadeira, mas não a partir de uma posição deitada, e deambula no plano com marcha em báscula.

Ao exame, face alongada, palato ogival, boca triangular com cantos voltados para baixo, hipomímia facial, porém sem oftalmoparesia. Tem hipotonia com hiperextensibilidade em cotovelos e tornozelos, sem contrações ou anquiloses, associada a cifose, afundamento em hemitórax superior direito e escápula alada. Apresenta tetraparesia flácida de predomínio proximal (MRC grau 3 proximal e 4 distal), fraqueza cervical para extensão, hipotrofia global importante, além de reflexos abolidos.

A biópsia muscular, realizada aos 2 anos de idade em m. bíceps braquial, mostra duas aparentes populações de fibras musculares nas reações de ATPase, com grande predominância de fibras tipo 1, pequenas, com núcleos centralizados em sua maioria. As reações oxidativas mostram um aumento de atividade na região central das fibras. Há ainda eventuais falhas focais nas atividades enzimáticas, sugerindo alteração da arquitetura interna das fibras.

Após sequenciamento dos genes *MTM1*, *BIN1* e hot spots do gene *DNM2*, o DNA da paciente foi submetido para sequenciamento de exoma, o qual demonstrou, após filtragem rigorosa de variantes, a presença de duas mutações missense no gene *RYR1*, preditas como patogênicas em múltiplas ferramentas, não encontradas no banco de variantes EVS, uma das quais tinha segregação materna (não foi possível coletar material genético do pai). Ambas são mutações novas: a primeira no exon 25 (c.3224G>A, p.Arg1075Gln), a segunda no exon 74 (c.10882C>G, p.Arg3628Gly).

4.3.7 Família 3.7

Probando do sexo feminino, 5 anos, filha única de casal não consanguíneo, nascida de parto cesárea a termo de uma gestação sem intercorrências, apresentou quadro de hipotonia ao nascimento, sem necessidade de IOT, porém permaneceu em UTI para investigação, tendo sido descartadas causas centrais. Evoluiu com importante atraso do desenvolvimento motor, adquirindo habilidade de sentar sem apoio aos 9 meses, sustento cefálico com 1 ano, e ainda não consegue deambular sem apoio, apesar de permanecer de pé com apoio desde os 2 anos e meio. Teve dois episódios de pneumonia com necessidade de internação até os 7 meses, e desde então sem novos episódios após fisioterapia respiratória. No momento, estável do quadro motor.

Ao exame, face alongada, palato ogival, boca entreaberta de aspecto triangular, ptose palpebral bilateral, hipomímia facial. Apresenta hipotonia global e hipotrofia sem predominância de grupos musculares, fraqueza muscular em quatro membros de predomínio proximal (MRC grau 4- proximal, 4 distal).

Dosagem de CPK aos 2 anos dentro da normalidade (23), ENMG aos 8 meses mostrou padrão miopático, e biópsia muscular realizada aos 2 anos e meio em m. deltoide mostra predominância de fibras tipo 1, sem variabilidade de tamanho das fibras musculares, leve aumento do número de fibras com núcleos centralizados, leve aumento do tecido conjuntivo endomisial, além de desagregação da arquitetura interna normal das fibras observada em reações oxidativas.

Não foram encontradas mutações nos genes *MTM1*, *BIN1* e hot spots do gene *DNM2* no sequenciamento Sanger. Análise de exoma após filtragem rigorosa de variantes mostrou a presença de duas mutações no gene *RYS1* em heterozigose composta, confirmadas em sequenciamento Sanger em

segregação com os pais. A primeira mutação é do tipo missense no exon 8 (c.725G>A, p.Arg242Lys) não foi encontrada em bancos de mutações ou no banco de variantes EVS, e tem predição de patogenicidade em múltiplas ferramentas. A segunda, no intron 69 (c.10348-6C>G), rara, porém encontrada no EVS com frequência alélica mínima < 0,01%, já foi descrita uma vez em associação a depleção do *RYR1*, em um caso de miopatia por central core em heterozigose composta⁷⁵.

Figura 15. Alterações esqueléticas em pacientes com mutações no gene *RYR1*. Lordose lombar associada a cifose torácica no probando da família 3.2 (A). Afundamento de caixa torácica no probando da família 3.6 (B). Visão lateral da mesma paciente mostra cifose torácica (C).

Figura 16. Histologia da MCN por mutações no gene *RYR1*. Na coloração HE (A, C), observaram-se aumento da variabilidade das fibras musculares, graus variados de aumento do tecido conjuntivo endomisial, além do aumento do número de fibras com centralizações nucleares. Na reações oxidativas (B, NADH-TR; D, SDH), houve falhas focais da atividade oxidativa em múltiplas fibras. A e B: probando da família 3.5; C e D: probando da família 3.2.

4.4 Famílias com outros diagnósticos moleculares

Cinco famílias com um único afetado apresentaram outros diagnósticos moleculares. Um dos casos provavelmente se trata de uma titinopatia, mas necessita de validação funcional. Um segundo caso mostrou tratar-se de uma distrofia muscular de Emery-Dreifuss em sua forma autossômica dominante, manifestando-se com uma mutação *de novo*. As demais famílias não apresentaram variantes promissoras em genes sabidamente implicados em doenças neuromusculares, e podem servir de objeto de descoberta de novos genes com as análises em andamento. Os heredogramas para este grupo de famílias podem ser analisados na figura 17.

Figura 17. Heredograma das famílias com mutações em outros genes ou sem diagnóstico molecular.

4.4.1 Família 4.1

Probando do sexo masculino, 5 anos, filho de casal não consanguíneo não afetado que já havia tido gestação com óbito fetal de gêmeos do sexo masculino, nasceu de parto cesáreo de uma gestação sem intercorrências, com movimentos fetais percebidos pela mãe, a termo. Logo após o nascimento, foi intubado por insuficiência respiratória e admitido em UTI, onde sofreu parada cardiorrespiratória aos 2 meses, tendo sido prontamente ressuscitado, e permaneceu internado por um ano e meio, recebendo alta para cuidados intensivos em regime de home care, com traqueostomia e gastrostomia. Apesar de melhora gradual, segue bastante limitado, nunca tendo adquirido sustento cefálico ou capacidade de sentar-se. No momento, consegue movimentar braços no plano horizontal e tem melhorado a movimentação de mãos e pés. Ao exame, ptose palpebral bilateral com oftalmoplegia total, sem expressão facial, com boca entreaberta de aspecto triangular, palato ogival, não obedece a comandos verbais, hipotonia global importante com hiperelasticidade articular, porém sem retrações. Força muscular MRC grau 2 proximal e 3 distal em quatro membros. Dosagem de CPK dentro da normalidade. Realizou biópsia muscular aos 10 meses de idade em m. deltoide, a qual mostrou grande predominância de fibras tipo 1, além de aumento da proporção de fibras musculares com centralizações nucleares, sem alterações da atividade oxidativa.

O quadro clínico grave, combinado com os aspectos faciais, apontavam para o possível diagnóstico de miopatia miotubular, apesar da histologia muscular não apresentar as típicas centralizações com aspecto de miotubo, ou o aumento da atividade oxidativa predominando no centro das fibras. O sequenciamento Sanger e a aplicação da técnica de MLPA para o gene *MTM1*, no entanto, não mostraram alterações. Foram sequenciados os genes *BIN1* e os hot spots do gene *DNM2*, também sem variantes sugestivas de patogenicidade. Submetido a sequenciamento de exoma, também não surgiram variantes promissoras em genes conhecidos para doenças

neuromusculares após filtragem rigorosa. Para elucidação do caso, amostras de DNA dos pais do paciente também foram enviadas para sequenciamento de exoma, com o objetivo de combinar os dados de segregação do trio para identificação de novos genes candidatos. Uma alíquota de DNA do paciente também foi enviada para pesquisa de distrofia miotônica tipo 1 (DM1), cujo mecanismo genético que envolve repetições de trinucleotídeos não é bem coberto no sequenciamento de exoma. A DM1 faz parte do diagnóstico diferencial clínico e histológico da miopatia miotubular, mesmo quando sinais clínicos na ancestralidade direta estão ausentes.

4.4.2 Família 4.2

Probando do sexo feminino, 24 anos, filha de pais não consanguíneos não afetados com dois irmãos mais velhos normais, nasceu a termo por parto cesáreo devido trabalho de parto prolongado de uma gestação sem intercorrências, em que a mãe percebeu pouca movimentação intra-útero. Houve hipóxia neonatal, choro e sucção fracos, precisou de 3 dias de cuidados em UTI neonatal, com alta em seguida. Aos 6 meses a mãe procurou atendimento porque notava pouca mobilidade e hipotonia. Evoluiu com atraso importante dos marcos motores, tendo sustentado o pescoço e sentado com 3 anos, andou com apenas 6 anos. Apesar de melhora progressiva, sempre teve fraqueza muscular importante e atrofia. Aos 10 anos, iniciou quadro de escoliose, com cirurgia corretiva aos 15, e estabilidade posterior. No momento, levanta-se da cadeira sem ajuda, mas não levanta-se do chão. Deambula de forma independente, e eleva os braços acima da cabeça, mais à direita. Não tem problemas cardíacos, respiratórios ou disfagia, apesar de ter mastigação lenta.

Ao exame, hipotonia e hipotrofia globais, marcha anserina, diparesia facial com moderada oftalmoparesia global, palato ogival, fraqueza muscular de predomínio proximal em membros superiores (MRC grau 3 proximal à

esquerda e 4- à direita) e inferiores (MRC grau 3 proximal, 4 distal, exceto dorsiflexão grau 3, limitada por pé equino bilateral).

A biópsia muscular, realizada em m. deltoide aos 15 anos, mostra uma grande variação no tamanho das fibras musculares, a presença de numerosas internalizações nucleares em quase todas as fibras, além de um aumento importante do tecido conjuntivo endomisial e perimisial, sugerindo um padrão distrófico, exceto pela ausência de fibras em degeneração/regeneração ou inflamação. Nas reações oxidativas, observam-se falhas focais, com rompimento da arquitetura interna.

O sequenciamento Sanger dos genes conhecidos para miopatia centronuclear não mostrou alterações, e a análise do sequenciamento de exoma não mostrou variantes sugestivas de patogenicidade em genes conhecidos para doenças neuromusculares. O sequenciamento de exoma dos pais pode ajudar a identificar alguma mutação promissora em um eventual novo gene.

4.4.3 Família 4.3

Probando do sexo masculino, 10 anos, filho único de pais não consanguíneos não afetados, apresentou anóxia, choro e sucção fracos, além de artrogripose, ao nascer de uma gestação sem intercorrências. Muito hipotônico, evoluiu com atraso importante do desenvolvimento motor, adquirindo sustento cefálico com 1 ano e meio, capacidade de sentar-se aos 8 meses, porém nunca conseguiu pôr-se de pé ou deambular. Até os 3 anos, teve vários episódios de infecção respiratória com internação hospitalar, precisando ser submetido a traqueostomia. Desde então, houve melhora do quadro pulmonar, e vem evoluindo com melhora gradual do quadro motor.

Ao exame, criança hipotônica com múltiplas contraturas em região cervical, cotovelos, joelhos, quadril e dedos, pescoço alado, escápula alada, lordose torácica e cifose lombar associada a pectus excavatum, polegares aduzidos. Apresenta fraqueza muscular global (escala MRC 4-, em alguns grupos musculares proximais 3).

A biópsia muscular foi feita aos 2 anos em m. deltoide; tem pouca variabilidade do tamanho das fibras musculares, associada a um leve aumento do tecido conjuntivo endomisial, e aumento das centralizações nucleares. As reações oxidativas mostram desarranjo da arquitetura interna, com falhas focais sugestivas de cores.

Após a exclusão dos genes *MTM1*, *BIN1* e hot spots do gene *DNM2*, foi aplicado um painel de 81 genes associados a doenças neuromusculares, onde foram encontradas mutações heterozigotas no gene *TTN*: uma mutação “frameshift” no exon 73 (c.17133insG), a qual gera um códon de parada subsequente, e um rompimento de sítio doador de splicing, o qual causa uma proteína truncada no exon 360 (c.98827+1C>T).

4.4.4 Família 4.4

Probando do sexo masculino, 22 anos, filho único de casal não consanguíneo não afetado, nascido de parto normal a termo de uma gestação sem intercorrências. Aos 6 meses de idade, a mãe percebeu que a criança não se movimentava muito e apresentava atraso para desenvolver a motricidade, tendo sentado aos 8 meses e andado sem apoio aos 2 anos e 6 meses. Desde então, evoluiu com melhora progressiva do quadro motor, apesar de sempre ter mais dificuldade que os colegas para andar de bicicleta e correr, até os 15 anos. A partir desta idade, refere um pouco de piora para subir escadas, mas há 2 anos apresenta estabilidade, após ter iniciado fisioterapia motora regular.

Ao exame, apresenta tônus reduzido e hipotrofia com distribuição de cinturas pélvica e escapular, além de bíceps braquial e tríceps; marcha em pontas de pés associadas a retrações em tornozelos e joelhos, escoliose em S. Tem fraqueza muscular grau 4- da escala MRC para flexão do cotovelo, 4 para extensão do cotovelo, 4- para extensão dos joelhos. Não consegue realizar dorsiflexão dos pés devido às retrações de tornozelos. Não se evidenciam sinais miopáticos faciais, e não há fraqueza da musculatura cervical.

Biópsia muscular, realizada aos 17 anos em m. deltoide, mostra um padrão miopático com leve aumento do tecido conjuntivo endomisial, sem grande variabilidade do tamanho das fibras musculares, e a presença de numerosas centralizações e internalizações nucleares na maioria das fibras musculares. Nas reações oxidativas, observam-se falhas focais na atividade oxidativa além de regiões com coloração mais intensa sugestivas de aumento desta atividade.

A análise de exoma mostrou a presença de uma mutação patogênica conhecida no gene *SYNE2* (c.18632C>T, p.Thr6211Met), a qual se associa a um fenótipo de distrofia muscular de Emery-Dreifuss com herança autossômica dominante e acometimento cardíaco grave.

4.4.5 Família 4.5

Probando do sexo feminino, 42 anos, segunda filha de uma prole de 11 filhos, com duas irmãs afetadas, de um casal não consanguíneo não afetado, iniciou dificuldade para levantar-se a partir de lugar baixo e para subir em ônibus a partir dos 30 anos, e veio piorando desde então. Hoje, não consegue levantar do chão, não consegue andar rápido, precisa de apoio em corrimão para subir escadas, lentamente. Tropeça fácil, já teve muitas quedas. Tem dificuldade para pegar peso, dificuldade para dobrar edredom, pegar objeto alto, cansa para pentear cabelo. Tem também dificuldade para girar chave

apertada, abrir tampa de vidro. Apresenta ainda cansaço fácil aos esforços, ficando sudoreica. Não tinha dificuldade motora quando na infância ou adolescência. A irmã mais velha, com 44 anos, é mais grave, tem fraqueza desde a infância, que foi piorando, tem muita dificuldade para caminhar, além de cardiopatia. Uma das irmãs mais novas, hoje com 41 anos, iniciou quadro aos 28 anos e tem limitações semelhantes. O probando tem três filhos não afetados, com 7, 9 e 15 anos.

Ao exame, oftalmoparesia nas extremidades do olhar para cima, hipotonia leve e fraqueza muscular em membros superiores e inferiores (força muscular proximal grau 4+ da escala MRC exceto flexores do quadril, grau 2; força muscular distal grau 5), além de cervical (força muscular grau 4+ para flexão e extensão). Discreta hipotrofia de predomínio em cinturas, reflexos abolidos, sem deformidades esqueléticas ou retrações.

Biópsia muscular, realizada aos 30 anos em m. bíceps braquial, mostra predomínio quase completo de fibras do tipo 1, aumento das centralizações nucleares sem alterações sugestivas de distrofia, falhas focais da atividade oxidativa na reação NADH-TR associadas a áreas radiadas com aumento desta atividade.

O DNA da paciente foi enviado para sequenciamento de exoma, mas por erro de técnica o material incluído em uma bateria foi perdido, e não havia o suficiente para uma nova corrida. No momento, aguardamos uma nova coleta de DNA para tentar um novo sequenciamento.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho estudamos uma coorte brasileira de pacientes com diagnóstico clínico e/ou histológico de miopatias miotubular (MTM) ou centronuclear (MCN). As definições clássicas destas doenças obedecem a critérios clínicos e sobretudo histológicos, e foram o ponto de partida para a descrição desta coorte.

Existe uma clara demarcação fenotípica entre a MTM e as outras diferentes formas de MCN. O grupo de pacientes com MTM apresenta uma homogeneidade de apresentação clínica, caracterizada por um quadro neonatal grave com intensa hipotonia e insuficiência respiratória necessitando invariavelmente de suporte ventilatório em UTI neonatal e posterior traqueostomia. Esse componente de gravidade, associado a aspectos faciais típicos, como fronte proeminente e boca triangular com os cantos voltados para baixo, além de fraqueza facial e alterações oculares, sugerem apenas com o quadro clínico o diagnóstico de MTM, como pudemos comprovar com a indicação bem-sucedida de sequenciamento genético como primeiro passo diagnóstico no probando da família 1.6. A biópsia muscular, quando geralmente realizada como parte da investigação da síndrome do bebê hipotônico, mostra fibras com núcleos centralizados grandes, com aspecto de miotubo, além de áreas de atividade oxidativa central aumentada nas reações oxidativas. Todos os pacientes do sexo masculino apresentaram este padrão. Dois probandos de famílias diferentes, além destes achados clássico, demonstraram a presença de fibras em colar, um marcador histopatológico que originalmente se imaginava associar-se apenas a casos leves de MTM/MCN de início mais tardio, geralmente em portadoras mulheres manifestantes²⁷. Mais recentemente, mostramos que meninos com MTM clássica, grave, também podem apresentar fibras em colar¹⁸. Essas duas famílias adicionais corroboram com esta observação.

Dois pacientes de famílias diferentes tiveram óbito de maneira súbita e inesperada, por choque hipovolêmico confirmado em uma família e presumido na outra. A hemorragia hepática é uma das causas de mortalidade nos pacientes com miopatia miotubular⁷⁶⁻⁸⁰. O mecanismo patogênico ainda não foi completamente estabelecido, mas pacientes portadores de MTM podem ter uma predisposição genética à peliose hepática, uma doença vascular do fígado associada a um risco aumentado de hemorragia, classicamente associada a infecção pela *Bartonella henselae* ou indução por drogas, como esteroides anabolizantes, quimioterápicos e antibióticos⁸¹. Caracteriza-se por cavidades preenchidas por sangue, distribuídas aleatoriamente no lóbulo hepático. Na microscopia eletrônica, ocorrem alterações no alinhamento endotelial, que permitem a entrada de eritrócitos no espaço de Disse. A maioria dos casos ocorre de forma assintomática, e os exames hepáticos podem estar normais ou pouco alterados. No entanto, como há relato de tratamento bem sucedido da peliose hepática em paciente com MTM através de embolização hemodinâmica da artéria hepática⁸², há um esforço no momento, em tentar reconhecer marcadores bioquímicos, genéticos ou em exames de imagem que possam identificar quais pacientes com MTM podem estar sob risco aumentado desta condição. Um estudo colaborativo internacional de história natural da MTM, incluindo exames seriados da função hepática, está em andamento (Jocelyn Laporte, comunicação pessoal), e os pacientes brasileiros serão incluídos.

O diagnóstico molecular dos pacientes com MTM confirmou mutações patogênicas no gene *MTM1* em todos os pacientes, exceto um (probando da família 4.1), ainda sem diagnóstico, mas que pode ser portador de distrofia miotônica tipo 1 congênita (DM1, doença de Steinert). O quadro clínico e o aspecto da biópsia muscular dos pacientes com DM1, semelhante à MTM, podem gerar uma confusão diagnóstica se os pais não tiverem sinais evidentes de DM1. Além disso, o mecanismo molecular envolve expansão de trinucleotídeos, a qual não é bem capturada no sequenciamento de exoma. Das 6 famílias com meninos, duas apresentaram mutações novas. A família 1.2 apresentou uma mutação nonsense, p.Glu234*, que trunca a proteína MTM prematuramente no exon 9, e a família 1.4 possui uma mutação com quebra no

quadro de leitura, c.947_951del, que origina um códon de parada prematuro no exon 10. Das famílias com genes conhecidos, uma delas, a família 1.3, tem a mutação p.Arg69Cys, uma das mais comuns, que está associada a um fenótipo relativamente mais leve, com boa evolução. Essa mutação, por ser tão frequente, é objeto de estudos em modelos animais e pode ser a primeira para a qual serão oferecidas terapias genéticas^{69, 83}. A frequência das mutações no gene *MTM1* em nossa coorte obedeceu a estatística relatada na literatura: 4 mutações estavam presentes entre os exons mais acometidos (3, 4, 9 e 11), e distribuídas como 2 mutações missense, 3 nonsense e 2 deleções.

O caso isolado da família 1.7, uma adolescente, foi diagnosticada como portadora sintomática de mutação no gene *MTM1*. Trata-se de uma macrodeleção sobrepondo não apenas este gene, mas também *MTMR1*, *IDSP1* e *MAMLD1*, este último associado a distúrbios do desenvolvimento sexual, incluindo hipospádias em meninos e virilização em mulheres, quando ocorre em homozigose⁸⁴. O quadro clínico dela, apesar de progressivo, é bem mais leve que o observado nos casos típicos de miopatia miotubular. O estado portador do gene *MTM1*, localizado no cromossomo X, teoricamente protetor para a doença em mulheres, pode se associar a manifestação de doença, mesmo quando não há inativação desbalanceada deste cromossomo. Quando há inativação desbalanceada favorecendo a expressão do alelo mutado, geralmente ocorre uma manifestação grave da doença, semelhante à MTM. Por outro lado, quando há inativação aleatória, as mulheres podem ser portadoras assintomáticas ou manifestantes, associadas a um quadro mais leve que a MTM, que envolve frequentemente assimetria de acometimento muscular (Figura 10)⁸⁵. O caso da família 1.7 se enquadra nesse segundo mecanismo, como demonstrado por estudo de inativação do X. A histologia dos casos de portadoras manifestantes também costuma seguir a gravidade clínica. Casos com inativação desbalanceada apresentam histologia típica de MTM, o que não ocorre na inativação aleatória, a qual se associa a um padrão menos monotônico, com centralizações nucleares sem aspecto de miotubos e a presença de fibras em colar, as quais puderam ser observadas na paciente (Figura 10)²⁷.

Não observamos nesta coorte a proporção de dinaminopatias entre os pacientes com MCN relatada na literatura, de até 50%²⁷. Nesta coorte de pacientes brasileiros, apenas duas famílias apresentaram mutações no gene *DNM2*. Coincidentemente, as biópsias dos probandos destas duas famílias foram as únicas que apresentaram fitas sarcoplasmáticas radiadas típicas, ou fibras com aspecto em “roda de carroça”, classicamente associadas às dinaminopatias. Em ambos os casos, os exons “hot spot” do gene *DNM2* foram inicialmente sequenciados, e mutações foram encontradas no exon 8, o que demonstra a utilidade de uma abordagem sequenciada para o diagnóstico da MCN⁸⁶. O quadro clínico das dinaminopatias, com história típica de miopatia congênita, associada a face alongada, aspecto longilíneo, oftalmoparesia e fraqueza proximal associada às vezes a fraqueza distal em membros, sugere o diagnóstico. A biópsia muscular confirma a suspeita clínica e o achado de estrias sarcoplasmáticas radiadas aponta com alta probabilidade para *DNM2* como o gene implicado, apesar de nem sempre estar presente.

A família 2.2 apresentou a mutação p.Glu368Lys, que afeta o domínio intermediário da proteína e já foi descrita em mais de 20 famílias²⁵. Nestas famílias, o fenótipo envolve fraqueza muscular global associada a um quadro em geral mais grave que o observado em outras mutações no domínio intermediário da dinamina-2.

Já na família 2.1, encontramos uma nova mutação, p.Phe372Cys, também no exon 8 e domínio intermediário da intermediário da proteína, em uma posição que compõe a região que realiza a interface entre este domínio e o domínio de homologia da pleckstrina. Em um modelo tridimensional da proteína dinamina-2, a posição 372 corresponde a um dos sítios em que há predição de rompimento da interface com a mudança de um aminoácido aromático, a fenilalanina, para um aminoácido nucleofílico, a cisteína (Figura 18; Jocelyn Laporte, comunicação pessoal). Além desta nova posição, apenas 3 outras posições na interface já foram associadas a dinaminopatias: 368, 369 e 465. As mutações no domínio intermediário estão associadas a um fenótipo mais leve de MCN, com início do quadro no primeiro ano de vida, melhora

subsequente e retomada de evolução lentamente progressiva a partir da adolescência. Essas características contrastam com mutações no domínio de homologia da pleckstrina, em geral no exon 16, que se associam a um quadro neonatal grave, com insuficiência respiratória e mortalidade alta.

Figura 18. Modelagem tridimensional da dinamina-2. O domínio intermediário é mostrado no topo, em cinza, e o domínio PH na porção inferior, em amarelo.

Resíduos mostrados em vermelho representam mutações descritas em associação com a MCN e se concentram na interface entre os domínios intermediário e PH, enquanto mutações implicadas na doença de CMT, mostradas em azul, ocorrem fora desta interface. A nova mutação descrita na família 2.1 afeta o resíduo Phe372, representado em verde no modelo, e tem predição de perturbar a interface.

Em nossa coorte, não encontramos pacientes com mutações no gene *BIN1*, que é o gene menos frequentemente acometido nos casos de MCN, com poucos casos descritos e apenas 5 mutações relatadas. Segundo a descrição da literatura, a histologia típica é a presença de fibras musculares homogeneamente arredondadas com núcleos grandes, semelhantes a agrupamentos nucleares, em quase 100% das fibras, em um contexto de aumento do tecido conjuntivo endomisial, sem aspecto distrófico. Na reações oxidativas, os núcleos aparecem claros, com uma borda de atividade aumentada. Retrospectivamente, não encontramos essa histologia em nenhum dos pacientes desta coorte. Também não encontramos variantes patogênicas nos genes *CCDC78* e *SPEG* nos pacientes sequenciados para exoma.

A maior parte das famílias da coorte brasileira com quadro de MCN apresentou mutações em heterozigose composta no gene *RYR1*, consistente com um padrão recessivo. Em apenas três famílias houve mais de um afetado, o que ajudou a confirmar a suspeição pelo cruzamento das variantes na análise de exoma. Apenas uma das mutações já era conhecida, inclusive na população brasileira, na família 3.4, implicada tanto na miopatia por central core quanto na susceptibilidade a hipertermia maligna⁷³. O gene *RYR1*, apesar de sabidamente envolvido em pacientes dentro do espectro da miopatia centronuclear, não é frequentemente testado de forma completa devido à sua extensão de 105 exons, que torna impraticável e caro o sequenciamento Sanger. A prática mais comum, antes do advento do sequenciamento de alto débito, consistia em sequenciar a região C-terminal do gene, onde se acumulam mutações conhecidas, de forma que se imaginava que esta consistia em uma região “hot spot” para mutações neste gene.

As mutações encontradas em nossa coorte, em contraste com esta observação, ocorreram ao longo de toda a extensão do gene (exons 8, 14, 25, 26, 33, 42, 43, 44, 65, 66, 74 e 101), o que sugere que na realidade pode não haver regiões “hot spot”, ao menos nesse grupo fenotípico.

Apesar de sua extensão, o gene *RYR1* apresenta grande conservação evolutiva, o que faz com que mutações tenham alta predição de patogenicidade. Em outras palavras, trata-se de um gene intolerante a mutações com perda de função, ao contrário, por exemplo, do gene *TTN*, em que encontramos uma frequência alta de mutações com proteína truncada na população geral (observação após análises de exomas).

Em cinco famílias, as mutações duplas incluíam uma mutação nula, que gera uma proteína truncada (mutação nonsense, deleção ou rompedora de sítio de splicing). Em um trabalho recente, os autores estudaram mutações nulas no gene *RYR1* em coortes de pacientes com miopatia com falhas focais na atividade oxidativa, e observaram que a maioria apresenta mutações em homozigose composta, combinando uma mutação nula e uma missense. Mutações nulas duplas originam quadros graves de acometimento neonatal⁷⁵.

As mutações nulas originam uma redução nos níveis proteicos, com presunção de patogenicidade. Já as mutações missense, todas tiveram predição de patogenicidade de alta probabilidade, concordantes entre múltiplas ferramentas de predição, como SIFT e PolyPhen, além de se encontrarem em regiões e posições conservadas evolutivamente, o que aponta mais uma vez no sentido da patogenicidade.

Clinicamente, os aspectos de homogeneidade desta coorte de pacientes com mutações no gene *RYR1* dizem respeito à estabilidade da evolução do quadro e ao predomínio de fraqueza proximal, mas há variabilidade no acometimento respiratório e esquelético, bem como grau de achados faciais e oculares.

Exames de imagem muscular podem ajudar a identificar pacientes com potencial envolvimento do gene *RYR1*. A ultrassonografia do m. quadríceps femoral, em particular, mostra um envolvimento diferencial em que o m. vasto lateral é muito mais acometido que o m. reto femoral (Carsten G. Bönnemann, comunicação pessoal). Esse padrão pode ser observado também na

ressonância nuclear magnética (RNM) dos membros inferiores⁸⁷. No momento, estamos firmando colaboração para realização de exames de RNM em alguns pacientes da coorte *RYR1*, para buscar documentar essas alterações.

Histologicamente, o achado principal sugestivo para esse subgrupo de pacientes é a presença de irregularidades na atividade oxidativa, sugerindo um rompimento da arquitetura miofibrilar normal. As irregularidades não são falhas centrais com bordas bem delimitadas, o que sugere um outro grupo de miopatia congênita bem definida, a miopatia por central core. No entanto, na era do diagnóstico molecular, faz sentido falar em espectros de apresentação relacionados a genes determinados. O gene *RYR1*, nesse particular, tem um espectro que abrange todas miopatias cuja biópsia é não distrófica e apresenta desarranjo da arquitetura miofibrilar, mesmo que as características principais não sejam a presença de cores.

O gene *RYR1* está também implicado com a susceptibilidade a hipertermia maligna, com várias mutações descritas. Nenhuma das mutações encontradas nesta coorte havia sido associada previamente a hipertermia maligna. Portanto, na ausência de testes funcionais da atividade do canal para cada mutação específica, todos os pacientes com mutações neste gene devem ser considerados como sob risco desta condição, e foram orientados a, sempre que submetidos a procedimento anestésico, alertar equipe médica da necessidade de evitar bloqueadores neuromusculares do tipo succinilcolina, bem como anestésicos inalatórios halogenados.

O probando da família 4.3, incluído nesta coorte de pacientes com MCN, possuía um aspecto histológico compatível com o subgrupo de pacientes com mutações no gene *RYR1*, em que predominam, além das centralizações nucleares, as falhas focais na atividade oxidativa. No entanto, a análise de exoma não mostrou variantes patogênicas no gene *RYR1*, e sim uma truncagem dupla no gene *TTN*, nunca descrita. Como já mencionado, este gene é relativamente tolerante a mutações nulas, especialmente em heterozigose. No entanto, a presença de duas mutações nulas, não-alélicas,

aumenta a suspeição de implicação deste gene como responsável pelo fenótipo, especialmente porque esse tipo particular de combinação já foi descrito em associação à MCN⁴². Apesar disso, são necessários estudos funcionais para determinar quantitativamente o efeito das truncagens na proteína titina no tecido muscular, considerando que este gene sofre splicing alternativo.

A biópsia muscular do probando da família 4.4 também apresentou um padrão sugestivo de MCN associado a falhas focais na atividade oxidativa. Além dessa característica, no entanto, havia regiões com aumento da atividade oxidativa, o que sugeria um padrão histológico atípico. Clinicamente, a presença de retrações proeminentes em desproporção com a fraqueza muscular também apontava para um fenótipo atípico. A análise de exoma mostrou uma mutação patogênica conhecida no gene *SYNE2*, associada a um fenótipo de distrofia muscular de Emery-Dreifuss com padrão de herança autossômica dominante⁸⁸. Como há poucos casos descritos com esse fenótipo associado a este gene particular, todos os quais tiveram acometimento cardíaco grave, o paciente está sendo monitorado com maior vigilância quanto à possibilidade de vir a desenvolver arritmias ou miocardiopatia.

Além da família 4.3, com diagnóstico molecular não completamente confirmado, as famílias 4.2 e 4.5 seguem sem diagnóstico. O probando da família 4.2 teve exoma sequenciado, mas a filtragem de variantes não mostrou resultados claramente promissores nos genes conhecidos para doenças neuromusculares ou candidatos, o que sugere que um novo gene possa estar envolvido. O DNA dos pais da paciente foram enviados para sequenciamento de exoma, de forma que o cruzamento dos dados dos três possa ajudar a identificar potenciais variantes em genes não candidatos, segundo diversos cenários de segregação (variantes em homozigose, em heterozigose composta, ou *de novo*).

O probando da família 4.5 foi excluído para os genes *BIN1* e *MTM1*, além dos hot spots do gene *DNM2*, e foi incluída na bateria de MLPA para

MTM1. No entanto, por questões técnicas de qualidade do DNA não foi possível realizar o sequenciamento de exoma. A paciente foi reconvocada para nova coleta de sangue periférico.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

A MTM em pacientes brasileiros segue o fenótipo e a histologia clássicos descritos na literatura, mas observamos que fibras “em colar” e peliose hepática podem ser frequentes. A localização e efeito das mutações encontradas no gene *MTM1* obedecem a frequência de outros trabalhos.

Mutações no gene *DNM2*, encontradas em apenas dois casos esporádicos em nossa coorte, sugerem que este gene pode não ser tão frequente na MCN quanto relatado na literatura. Os dois casos apresentaram fenótipo e histologia clássicos para este subtipo.

Nossa casuística sugere que o gene *RYR1* é frequentemente implicado na MCN, o que corrobora com relatos recentes após o advento do sequenciamento em alto débito. A heterogeneidade fenotípica deste subgrupo contrasta com as alterações da atividade oxidativa na biópsia muscular como marcador histológico.

Não encontramos mutações nos genes *BIN1*, *CCDC78*, ou *SPEG* em pacientes brasileiros, confirmando a raridade do envolvimento destes.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A - Aprovação da comissão de ética

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0734/11

Título: ESTUDO CLÍNICO, HISTOLÓGICO E MOLECULAR DA MIOPATIA CENTRONUCLEAR

Pesquisador Responsável: Edmar Zanoteli

Pesquisador Executante: Osório Lopes Abath Neto

Co-autores: Umbertina Conti Reed, Acary Souza Bulle Oliveira, Gerson Chadi

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Departamento: NEUROLOGIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 14/12/2011, o protocolo acima.

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) s elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 16 de Dezembro de 2011

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Vice-Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Rua Dr. Ovidio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
Fone: 55 11 2661-6442 ramais 16, 17, 18 e 20 - e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº

APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD

(.....).....

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :

SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº

APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD

(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Estudo clínico, histológico e molecular da miopatia centronuclear

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Edmar Zanoteli

CARGO/FUNÇÃO: Médico Pesquisador

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 68120

PESQUISADOR EXECUTANTE: Médico

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 131422

CARGO/FUNÇÃO: Candidato a Doutorando

UNIDADE DO HCFMUSP: Divisão de Clínica Neurológica

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

3.DURAÇÃO DA PESQUISA : 4 anos

Neste documento explicamos o estudo que estamos realizando com os pacientes portadores de miopatia centronuclear (MCN). Por favor, leia até o fim, para decidir se você aceita participar do estudo.

A miopatia centronuclear (MCN) é uma doença congênita que ocasiona fraqueza muscular desde o nascimento. A sua causa são mutações (erros genéticos) herdadas do pai, da mãe, ou de ambos, que podem apresentar ou não os sintomas da doença. Em alguns casos, as mutações podem ocorrer durante a gestação do paciente, e nestes casos apenas ele é afetado.

Por se tratar de uma doença rara, a MCN ainda não é completamente compreendida. Não se conhecem ainda todas as mutações que podem causar a doença, e nem mesmo todos os genes (locais dentro da célula que contêm as informações genéticas) onde as mutações podem ocorrer. Além disso, há uma grande variação na gravidade como a doença pode se apresentar, desde pacientes que nascem precisando de UTI por fraqueza dos músculos da respiração e acabam morrendo nos primeiros dias de vida até pacientes com uma fraqueza leve que não piora muito durante a vida e pode até mesmo surgir só na idade adulta e passar despercebida durante a infância.

Neste estudo, temos como objetivo tentar identificar, através de testes genéticos, as mutações que causaram a miopatia centronuclear nos pacientes diagnosticados com esta doença, e saber se essas mutações foram herdadas dos pais ou são exclusivas dos pacientes.

Saber que mutações causam quais gravidades da doença permitirá no futuro melhorar o diagnóstico dos pacientes com MCN como um todo, orientar os pais dos pacientes com esta doença quanto ao prognóstico (chance de a doença de seus filhos ficar estável, melhorar ou piorar) e os tratamentos preventivos adequados.

No entanto, é importante informar que **não há um benefício imediato** para o paciente incluído no estudo, exceto pela possibilidade de saber se a mutação foi realmente herdada dos pais, o que pode ajudar a saber o risco de que novos filhos do casal possam ter a mesma doença. O tratamento e acompanhamento dos pacientes serão o mesmo, estando eles incluídos no estudo ou não.

Neste estudo, inicialmente, faremos uma **consulta médica** com o paciente e seus pais, não muito diferente das consultas regulares que habitualmente são feitas a cada seis meses no acompanhamento. Inclusive, aproveitaremos as datas já agendadas para as consultas. Perguntaremos detalhes sobre a história da doença do

paciente, informações sobre sua gestação, parto e desenvolvimento durante os primeiros meses e anos de vida, exames e terapias realizadas, entre outros detalhes.

Em seguida, será feito o **exame físico** do paciente, em que realizaremos testes de mobilidade das articulações (juntas) e músculos, e solicitaremos ao paciente que realize algumas **manobras um pouco desconfortáveis**, como sentar-se no chão e levantar-se dele, caminhar na ponta dos pés, subir escadas e empurrar e puxar o braço do examinador com várias partes do corpo. Todas as solicitações, entretanto, sempre levarão em conta as capacidades máximas do paciente, e o mesmo **poderá interromper o exame a qualquer momento caso se sinta cansado**. O exame **deve ser realizado com o paciente despido** (mantendo vestimenta íntima), de forma que o médico possa observar o contorno e tamanho dos músculos durante os movimentos, além de possíveis deformidades esqueléticas, da coluna e articulações. Durante o exame, faremos também o **registro fotográfico de várias partes do corpo e do rosto do paciente**, com o objetivo de comparar as alterações do exame físico do paciente com as de outros pacientes portadores de MCN. As fotografias serão usadas exclusivamente dentro do estudo, e preservarão o anonimato do paciente, para que o paciente não possa ser identificado por quem não estiver envolvido no estudo. Por exemplo, se usarmos fotos do rosto do paciente em algum relatório ou registro em computador, aplicaremos faixas pretas para evitar a identificação completa do rosto. Em nenhum momento poremos nomes diretamente nas fotos. Caso precisem ser identificadas, serão usados códigos com letras e números. Do mesmo modo que para as fotografias, as informações e dados relacionados aos pacientes, bem como materiais coletados, serão usados apenas dentro desta pesquisa, em sigilo.

Ao final do exame físico, o paciente e seus pais serão encaminhados para a **coleta de sangue periférico** de uma veia do antebraço. A amostra de sangue de cada um, no total de 5 a 10 ml (uma seringa pequena), será armazenada nos laboratórios do Hospital das Clínicas e usada posteriormente para os testes genéticos. A coleta não é diferente dos "exames de sangue" feitos normalmente nos laboratórios de hospitais e clínicas. Normalmente, a coleta é realizada apenas uma vez, porque a quantidade de sangue coletada é suficiente para uma grande quantidade de testes genéticos. Em algumas raras situações, poderemos vir a solicitar uma nova coleta de sangue caso testes adicionais sejam necessários.

Os resultados dos testes genéticos, tão logo sejam completados, serão informados aos responsáveis pelo paciente, caso seja de seu interesse, com o objetivo

de aconselhamento genético (informação do risco de que novos filhos possam apresentar a doença).

É importante salientar que **não será necessária a repetição da biópsia muscular**, que necessariamente já foi realizada para que o paciente tenha tido o diagnóstico de MCN. Caso seja necessária realizar novas análises de biópsia, serão aproveitados os fragmentos de músculo já armazenados.

Em qualquer momento do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para **esclarecimento de eventuais dúvidas**. O investigador principal é o dr. Edmar Zanoteli, e o pesquisador executante é o dr. Osório Abath Neto. Ambos podem ser encontrados no ambulatório de doenças neuromusculares do HC-FMUSP, que fica no prédio dos ambulatórios, 6º andar, todas as terças-feiras, pela manhã (mesmo lugar e horários das consultas regulares dos pacientes). Em outros horários durante a semana, ambos podem ser contactados por telefone na FMUSP, LIM45, telefone (11) 3061-7460. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 5º andar, tel. (11) 3069-6442, ramais 16, 17, 18 ou 20, fax (11) 3069-6442, ramal 26, email: cappesq@hcnnet.usp.br.

Também em qualquer momento, **você poderá desistir de participar do estudo**, ficando claro que esta desistência **não impedirá** o paciente de continuar o acompanhamento médico no ambulatório de doenças neuromusculares do HC-FMUSP.

Não haverá despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Por outro lado, também **não haverá compensação financeira** relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional para realizar os testes genéticos, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o “Estudo clínico, histológico e molecular da miopatia centronuclear”. Eu discuti com o dr. Edmar Zanoteli e/ou dr. Osório Abath Neto sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Spiro AJ, Shy GM and Gonatas NK. Myotubular myopathy. Persistence of fetal muscle in an adolescent boy. *Archives of neurology*. 1966; 14: 1-14.
2. Sher JH, Rimalovski AB, Athanassiades TJ and Aronson SM. Familial centronuclear myopathy: a clinical and pathological study. *Neurology*. 1967; 17.
3. Thomas N and Wallgren-Pettersson C. X-linked myotubular myopathy. 33rd ENMC International Workshop Soest. The Netherlands, 9-11 June 1995. *Neuromuscular disorders : NMD*. 1996; 6: 129-32.
4. Laporte J, Hu LJ, Kretz C, et al. A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nature genetics*. 1996; 13: 175-82.
5. Laporte J, Biancalana V, Tanner SM, et al. MTM1 mutations in X-linked myotubular myopathy. *Human mutation*. 2000; 15: 393-409.
6. Biancalana V, Caron O, Gallati S, et al. Characterisation of mutations in 77 patients with X-linked myotubular myopathy, including a family with a very mild phenotype. *Human genetics*. 2003; 112: 135-42.
7. Jungbluth H, Wallgren-Pettersson C and Laporte J. Centronuclear (myotubular) myopathy. *Orphanet journal of rare diseases*. 2008; 3: 26.
8. Zanuteli E, Laporte J, Rocha JC, et al. Deletion of both MTM1 and MTMR1 genes in a boy with myotubular myopathy. *American journal of medical genetics Part A*. 2005; 134: 338-40.

9. Joseph M, Pai GS, Holden KR and Herman G. X-linked myotubular myopathy: clinical observations in ten additional cases. *American journal of medical genetics*. 1995; 59: 168-73.
10. McEntagart M, Parsons G, Buj-Bello A, et al. Genotype-phenotype correlations in X-linked myotubular myopathy. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2002; 12: 939-46.
11. Yu S, Manson J, White S, et al. X-linked myotubular myopathy in a family with three adult survivors. *Clinical genetics*. 2003; 64: 148-52.
12. Bevilacqua JA, Bitoun M, Biancalana V, et al. "Necklace" fibers, a new histological marker of late-onset MTM1-related centronuclear myopathy. *Acta neuropathologica*. 2009; 117: 283-91.
13. Penisson-Besnier I, Biancalana V, Reynier P, Cossee M and Dubas F. Diagnosis of myotubular myopathy in the oldest known manifesting female carrier: a clinical and genetic study. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2007; 17: 180-5.
14. Hammans SR, Robinson DO, Moutou C, et al. A clinical and genetic study of a manifesting heterozygote with X-linked myotubular myopathy. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2000; 10: 133-7.
15. Sutton IJ, Winer JB, Norman AN, Liechti-Gallati S and MacDonald F. Limb girdle and facial weakness in female carriers of X-linked myotubular myopathy mutations. *Neurology*. 2001; 57: 900-2.
16. Grogan PM, Tanner SM, Orstavik KH, et al. Myopathy with skeletal asymmetry and hemidiaphragm elevation is caused by myotubularin mutations. *Neurology*. 2005; 64: 1638-40.

17. Helliwell TR, Ellis IH and Appleton RE. Myotubular myopathy: morphological, immunohistochemical and clinical variation. *Neuromuscular disorders : NMD*. 1998; 8: 152-61.
18. Gurgel-Giannetti J, Zanoteli E, de Castro Concentino EL, et al. Necklace fibers as histopathological marker in a patient with severe form of X-linked myotubular myopathy. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2012; 22: 541-5.
19. Bitoun M, Maugenre S, Jeannet PY, et al. Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nature genetics*. 2005; 37: 1207-9.
20. Jeannet PY, Bassez G, Eymard B, et al. Clinical and histologic findings in autosomal centronuclear myopathy. *Neurology*. 2004; 62: 1484-90.
21. Gal A, Geller L, Pal E and Bereznai B. New phenotype variance in the background of dynamin 2 mutation. *European journal of human genetics : EJHG*. 2011; 19: 396.
22. Bitoun M, Bevilacqua JA, Prudhon B, et al. Dynamin 2 mutations cause sporadic centronuclear myopathy with neonatal onset. *Annals of neurology*. 2007; 62: 666-70.
23. Bitoun M, Bevilacqua JA, Eymard B, et al. A new centronuclear myopathy phenotype due to a novel dynamin 2 mutation. *Neurology*. 2009; 72: 93-5.
24. Böhm J, Schaefer E, DeChene ET and Karasoy H. Centronuclear myopathy: 38 novel DNM2 mutations reveal hotspots and a genotype/phenotype correlation. *European journal of human genetics : EJHG*. 2011; 19: 402.

25. Bohm J, Biancalana V, Dechene ET, et al. Mutation spectrum in the large GTPase dynamin 2, and genotype-phenotype correlation in autosomal dominant centronuclear myopathy. *Human mutation*. 2012; 33: 949-59.
26. Zuchner S, Noureddine M, Kennerson M, et al. Mutations in the pleckstrin homology domain of dynamin 2 cause dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease. *Nature genetics*. 2005; 37: 289-94.
27. Romero NB. Centronuclear myopathies: a widening concept. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2010; 20: 223-8.
28. Zanuteli E, Vergani N, Campos Y, Vainzof M, Oliveira AS and d'Azzo A. Mitochondrial alterations in dynamin 2-related centronuclear myopathy. *Arquivos de neuro-psiquiatria*. 2009; 67: 102-4.
29. Majczenko K, Davidson AE, Camelo-Piragua S, et al. Dominant mutation of CCDC78 in a unique congenital myopathy with prominent internal nuclei and atypical cores. *American journal of human genetics*. 2012; 91: 365-71.
30. Nicot AS, Toussaint A, Tosch V, et al. Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nature genetics*. 2007; 39: 1134-9.
31. Claeys KG, Maisonobe T, Bohm J, et al. Phenotype of a patient with recessive centronuclear myopathy and a novel BIN1 mutation. *Neurology*. 2010; 74: 519-21.
32. Toussaint A, Cowling BS, Hnia K, et al. Defects in amphiphysin 2 (BIN1) and triads in several forms of centronuclear myopathies. *Acta neuropathologica*. 2011; 121: 253-66.
33. Mejaddam AY, Nennesmo I and Sejersen T. Severe phenotype of a patient with autosomal recessive centronuclear myopathy due to a BIN1

mutation. *Acta myologica : myopathies and cardiomyopathies : official journal of the Mediterranean Society of Myology / edited by the Gaetano Conte Academy for the study of striated muscle diseases*. 2009; 28: 91-3.

34. Bohm J, Yis U, Ortac R, et al. Case report of intrafamilial variability in autosomal recessive centronuclear myopathy associated to a novel BIN1 stop mutation. *Orphanet journal of rare diseases*. 2010; 5: 35.

35. Siegel IM. Foot deformity in myotubular myopathy. Pathology of intrinsic foot musculature. *Archives of neurology*. 1983; 40: 589.

36. Gospe SM, Jr., Armstrong DL, Gresik MV and Hawkins HK. Life-threatening congestive heart failure as the presentation of centronuclear myopathy. *Pediatric neurology*. 1987; 3: 117-20.

37. Zanuteli E, Oliveira AS, Kiyomoto BH, Schmidt B and Gabbai AA. Centronuclear myopathy. Histopathological aspects in ten patients with childhood onset. *Arquivos de neuro-psiquiatria*. 1998; 56: 1-8.

38. Zanuteli E, Oliveira AS, Schmidt B and Gabbai AA. Centronuclear myopathy: clinical aspects of ten Brazilian patients with childhood onset. *Journal of the neurological sciences*. 1998; 158: 76-82.

39. Jungbluth H, Zhou H, Sewry CA, et al. Centronuclear myopathy due to a de novo dominant mutation in the skeletal muscle ryanodine receptor (RYR1) gene. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2007; 17: 338-45.

40. Wilmschurst JM, Lillis S, Zhou H, et al. RYR1 mutations are a common cause of congenital myopathies with central nuclei. *Annals of neurology*. 2010; 68: 717-26.

41. Amburgey K, Bailey A, Hwang JH, et al. Genotype-phenotype correlations in recessive RYR1-related myopathies. *Orphanet journal of rare diseases*. 2013; 8: 117.
42. Ceyhan-Birsoy O, Agrawal PB, Hidalgo C, et al. Recessive truncating titin gene, TTN, mutations presenting as centronuclear myopathy. *Neurology*. 2013; 81: 1205-14.
43. Agrawal PB, Pierson CR, Joshi M, et al. SPEG Interacts with Myotubularin, and Its Deficiency Causes Centronuclear Myopathy with Dilated Cardiomyopathy. *American journal of human genetics*. 2014; 95: 218-26.
44. Tosch V, Rohde HM, Tronchere H, et al. A novel PtdIns3P and PtdIns(3,5)P2 phosphatase with an inactivating variant in centronuclear myopathy. *Human molecular genetics*. 2006; 15: 3098-106.
45. Dowling JJ, Vreede AP, Low SE, et al. Loss of myotubularin function results in T-tubule disorganization in zebrafish and human myotubular myopathy. *PLoS genetics*. 2009; 5: e1000372.
46. Al-Qusairi L, Weiss N, Toussaint A, et al. T-tubule disorganization and defective excitation-contraction coupling in muscle fibers lacking myotubularin lipid phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009; 106: 18763-8.
47. Amoasii L, Hnia K, Chicanne G, et al. Myotubularin and PtdIns3P remodel the sarcoplasmic reticulum in muscle in vivo. *Journal of cell science*. 2013; 126: 1806-19.
48. Ferguson SM and De Camilli P. Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012; 13: 75-88.

49. McNiven MA, Kim L, Krueger EW, Orth JD, Cao H and Wong TW. Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape. *The Journal of cell biology*. 2000; 151: 187-98.
50. Kenniston JA and Lemmon MA. Dynamin GTPase regulation is altered by PH domain mutations found in centronuclear myopathy patients. *The EMBO journal*. 2010; 29: 3054-67.
51. Cowling BS, Toussaint A, Amoasii L, et al. Increased expression of wild-type or a centronuclear myopathy mutant of dynamin 2 in skeletal muscle of adult mice leads to structural defects and muscle weakness. *The American journal of pathology*. 2011; 178: 2224-35.
52. Cowling BS, Chevremont T, Prokic I, et al. Reducing dynamin 2 expression rescues X-linked centronuclear myopathy. *The Journal of clinical investigation*. 2014; 124: 1350-63.
53. Royer B, Hnia K, Gavriilidis C, Tronchere H, Tosch V and Laporte J. The myotubularin-amphiphysin 2 complex in membrane tubulation and centronuclear myopathies. *EMBO reports*. 2013; 14: 907-15.
54. Kojima C, Hashimoto A, Yabuta I, et al. Regulation of Bin1 SH3 domain binding by phosphoinositides. *The EMBO journal*. 2004; 23: 4413-22.
55. Lee E, Marcucci M, Daniell L, et al. Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science*. 2002; 297: 1193-6.
56. Wechsler-Reya RJ, Elliott KJ and Prendergast GC. A role for the putative tumor suppressor Bin1 in muscle cell differentiation. *Molecular and cellular biology*. 1998; 18: 566-75.
57. Butler MH, David C, Ochoa GC, et al. Amphiphysin II (SH3P9; BIN1), a member of the amphiphysin/Rvs family, is concentrated in the cortical

cytomatrix of axon initial segments and nodes of ranvier in brain and around T tubules in skeletal muscle. *The Journal of cell biology*. 1997; 137: 1355-67.

58. Karpati G and Sinnreich M. The molecular era of myology. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2003; 62: 1203-10.

59. Miller SA, Dykes DD and Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*. 1988; 16: 1215.

60. Laporte J, Guiraud-Chaumeil C, Vincent MC, et al. Mutations in the MTM1 gene implicated in X-linked myotubular myopathy. ENMC International Consortium on Myotubular Myopathy. European Neuro-Muscular Center. *Human molecular genetics*. 1997; 6: 1505-11.

61. den Dunnen JT and Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Human mutation*. 2000; 15: 7-12.

62. Stenson PD, Ball EV, Howells K, Phillips AD, Mort M and Cooper DN. The Human Gene Mutation Database: providing a comprehensive central mutation database for molecular diagnostics and personalized genomics. *Human genomics*. 2009; 4: 69-72.

63. Carrel L and Willard HF. An assay for X inactivation based on differential methylation at the fragile X locus, FMR1. *American journal of medical genetics*. 1996; 64: 27-30.

64. Tassy O and Pourquie O. Manteia, a predictive data mining system for vertebrate genes and its applications to human genetic diseases. *Nucleic acids research*. 2014; 42: D882-91.

-
65. Tanner SM, Schneider V, Thomas NS, Clarke A, Lazarou L and Liechti-Gallati S. Characterization of 34 novel and six known MTM1 gene mutations in 47 unrelated X-linked myotubular myopathy patients. *Neuromuscular disorders : NMD*. 1999; 9: 41-9.
66. Herman GE, Kopacz K, Zhao W, Mills PL, Metzenberg A and Das S. Characterization of mutations in fifty North American patients with X-linked myotubular myopathy. *Human mutation*. 2002; 19: 114-21.
67. de Gouyon BM, Zhao W, Laporte J, Mandel JL, Metzenberg A and Herman GE. Characterization of mutations in the myotubularin gene in twenty six patients with X-linked myotubular myopathy. *Human molecular genetics*. 1997; 6: 1499-504.
68. Pierson CR, Agrawal PB, Blasko J and Beggs AH. Myofiber size correlates with MTM1 mutation type and outcome in X-linked myotubular myopathy. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2007; 17: 562-8.
69. Pierson CR, Dulin-Smith AN, Durban AN, et al. Modeling the human MTM1 p.R69C mutation in murine Mtm1 results in exon 4 skipping and a less severe myotubular myopathy phenotype. *Human molecular genetics*. 2012; 21: 811-25.
70. Jeub M, Bitoun M, Guicheney P, et al. Dynamin 2-related centronuclear myopathy: clinical, histological and genetic aspects of further patients and review of the literature. *Clinical neuropathology*. 2008; 27: 430-8.
71. Hanisch F, Muller T, Dietz A, et al. Phenotype variability and histopathological findings in centronuclear myopathy due to DNM2 mutations. *Journal of neurology*. 2011; 258: 1085-90.

-
72. Zhou H, Jungbluth H, Sewry CA, et al. Molecular mechanisms and phenotypic variation in RYR1-related congenital myopathies. *Brain : a journal of neurology*. 2007; 130: 2024-36.
73. Kossugue PM, Paim JF, Navarro MM, et al. Central core disease due to recessive mutations in RYR1 gene: is it more common than described? *Muscle & nerve*. 2007; 35: 670-4.
74. Ducreux S, Zorzato F, Ferreiro A, et al. Functional properties of ryanodine receptors carrying three amino acid substitutions identified in patients affected by multi-minicore disease and central core disease, expressed in immortalized lymphocytes. *The Biochemical journal*. 2006; 395: 259-66.
75. Monnier N, Marty I, Faure J, et al. Null mutations causing depletion of the type 1 ryanodine receptor (RYR1) are commonly associated with recessive structural congenital myopathies with cores. *Human mutation*. 2008; 29: 670-8.
76. Herman GE, Finegold M, Zhao W, de Gouyon B and Metzenberg A. Medical complications in long-term survivors with X-linked myotubular myopathy. *The Journal of pediatrics*. 1999; 134: 206-14.
77. Wang SY, Ruggles S, Vade A, Newman BM and Borge MA. Hepatic rupture caused by peliosis hepatis. *Journal of pediatric surgery*. 2001; 36: 1456-9.
78. Karger B, Varchmin-Schultheiss K and Fechner G. Fatal hepatic haemorrhage in a child-peliosis hepatis versus maltreatment. *International journal of legal medicine*. 2005; 119: 44-6.
79. Motoki T, Fukuda M, Nakano T, et al. Fatal hepatic hemorrhage by peliosis hepatis in X-linked myotubular myopathy: a case report. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2013; 23: 917-21.

-
80. Hagiwara SI, Kubota M, Sakaguchi K, Hiwatari E, Kishimoto H and Kagimoto S. Fatal Hepatic Hemorrhage from Peliosis Hepatis with X-linked Myotubular Myopathy: A Case Report. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2013.
81. Tsokos M and Erbersdobler A. Pathology of peliosis. *Forensic science international*. 2005; 149: 25-33.
82. Terlizzi JP, Azizi R, Chow MD, et al. Peliosis hepatis in a child with myotubular myopathy: successful treatment using hepatic artery embolization. *Journal of pediatric surgery*. 2013; 48: e9-e12.
83. Lawlor MW, Viola MG, Meng H, et al. Differential muscle hypertrophy is associated with satellite cell numbers and Akt pathway activation following activin type IIB receptor inhibition in Mtm1 p.R69C mice. *The American journal of pathology*. 2014; 184: 1831-42.
84. Brandao MP, Costa EM, Fukami M, et al. MAMLD1 (mastermind-like domain containing 1) homozygous gain-of-function missense mutation causing 46,XX disorder of sex development in a virilized female. *Advances in experimental medicine and biology*. 2011; 707: 129-31.
85. Kristiansen M, Knudsen GP, Tanner SM, et al. X-inactivation patterns in carriers of X-linked myotubular myopathy. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2003; 13: 468-71.
86. Bohm J, Vasli N, Malfatti E, et al. An integrated diagnosis strategy for congenital myopathies. *PloS one*. 2013; 8: e67527.
87. Klein A, Jungbluth H, Clement E, et al. Muscle magnetic resonance imaging in congenital myopathies due to ryanodine receptor type 1 gene mutations. *Archives of neurology*. 2011; 68: 1171-9.

88. Zhang Q, Bethmann C, Worth NF, et al. Nesprin-1 and -2 are involved in the pathogenesis of Emery Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity. *Human molecular genetics*. 2007; 16: 2816-33.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Artigo submetido à revista Genetics and Molecular Biology em 06/08/14

Submission
Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Genetics and Molecular Biology*.

Manuscript ID: GMB-2014-0238

Title: DNM2 mutations in a cohort of sporadic patients with centronuclear myopathy

Authors: Abath Neto, Osorio
Martins, Cristiane
Carvalho, Mary
Chadi, Gerson
Seitz, Katia
Oliveira, Acary
Reed, Umbertina
Laporte, Jocelyn
Zanoteli, Edmar

Date Submitted: 06-Aug-2014

***DNM2* mutations in a cohort of sporadic patients with centronuclear myopathy**

Osorio Abath Neto^{1,4}, Cristiane de Araújo Martins¹, Mary Carvalho¹, Gerson Chadi¹, Katia Werneck Seitz², Acary Souza Bulle Oliveira³, Umbertina Conti Reed¹, Jocelyn Laporte⁴, Edmar Zanoteli^{1*}

¹*Departamento de Neurologia, Faculdade de Medicina de São Paulo (FMUSP), São Paulo, Brazil;*

²*Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE), Chapecó, Brazil;*

³*Setor de Doenças Neuromusculares, Departamento de Neurologia, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil;*

⁴*Dept. of Translational Medicine and Neurogenetics, IGBMC, INSERM U964, CNRS UMR7104, University of Strasbourg, Collège de France, Illkirch, France.*

*Correspondence to: Edmar Zanoteli, Faculdade de Medicina da USP, Brazil.
E-mail: jocelyn@igbmc.fr.

ABSTRACT

Centronuclear myopathy (CNM) is a rare congenital muscle disease characterized by fibers with prominent centralized nuclei in the muscle biopsy. The disease is clinically heterogeneous, ranging from severe neonatal hypotonic phenotypes to adult-onset mild muscle weakness, and can have multiple modes of inheritance in association with various genes, including *MTM1*, *DNM2*, *BIN1* and *RYR1*. Here we analyzed a series of 18 sporadic patients with clinical and histological diagnosis of CNM and sequenced the *DNM2* gene, which codes for the dynamin 2 protein. We found *DNM2* missense mutations in two patients, both in exon 8, one known (p.E368K) and one novel (p.F372C), which is found in a position of presumed pathogenicity and appeared *de novo*. The patients had similar phenotypes characterized by neonatal signs followed by improvement and late childhood reemergence of slowly progressive generalized muscle weakness, elongated face with ptosis and ophthalmoparesis, and histology showing fibers with radiating sarcoplasmic strands (RSS). These patients were the only ones in the series to present this histological marker, which together with previous reports in the literature suggest that, when RSS are present, directly sequencing *DNM2* mutation hot spot regions should be the first step towards molecular diagnosis of CNM, even in sporadic cases.

Keywords: centronuclear myopathy, dynamin 2, congenital myopathy

Centronuclear myopathy (CNM) is a rare, clinically heterogeneous structural congenital myopathy characterized by the presence of centralized nuclei in the majority of muscle fibers in the muscle biopsy, not linked to excessive regeneration (Zanoteli *et al.*, 1998). Three inheritance patterns are described: X-linked recessive, which gives rise to a form also referred to as myotubular myopathy (MIM #310400), with a severe neonatal presentation distinguished by profound hypotonia and respiratory failure, associated to the *MTM1* gene (MIM *300415)(Laporte *et al.*, 1996); autosomal dominant, causing to a milder, neonatal to adult-onset muscle involvement (MIM #160150), with mutations in the *DNM2* gene (MIM *602378)(Bitoun *et al.*, 2005); and autosomal recessive, with intermediate severity as compared to the other forms (MIM #255200),

caused by mutations in the genes *BIN1* (MIM *601248)(Nicot *et al.*, 2007) or *RYR1* (MIM *180901)(Wilmschurst *et al.*, 2010; Bevilacqua *et al.*, 2011). In addition, heterozygous variants in the genes *CCDC78* (MIM *614666) and *MTMR14* (MIM *611089) were proposed in association with autosomal dominant early-onset centronuclear myopathy (Tosch *et al.*, 2006; Majczenko *et al.*, 2012), and more recently the genes *TTN* (MIM *188840) and *SPEG* were put forward as a cause of recessive cases (Ceyhan-Birsoy O *et al.*, 2013; Agrawal *et al.*, 2014). Disease severity and more importantly inheritance pattern dictate which genes should be studied to establish a molecular diagnosis. However, sporadic cases, with both mild and severe phenotypes, can presumably have any of the genes involved and thus present a diagnostic challenge.

Peculiar findings in the muscle biopsy can help further point to the probably implicated gene (Romero, 2010), potentially reducing the time to molecular diagnosis. Large centralized nuclei within rounded muscle fibers similar to fetal myotubes and increased oxidative activity in the center of fibers are typical of cases associated to mutations in the *MTM1* gene. The finding of fibers with radiating sarcoplasmic strands (aspect of “spoke of wheels”) suggests the *DNM2* gene as the culprit. A majority of rounded fibers with clusters of centralized nuclei is suggestive of involvement of the *BIN1* gene, while the presence of areas of myofibrillar disorganization devoid of mitochondria, such as moth-eaten or core-like structures, points to the *RYR1* gene.

Here we investigated a cohort of 18 sporadic CNM patients in the Brazilian population for the *DNM2* gene and found it to be involved in only two patients. To select our CNM cohort, we analyzed sequential muscle biopsy reports from the last five years taken from two large neuromuscular center biopsy banks of Sao Paulo, Brazil (LIM15/FMUSP and Setor de Doenças Neuromusculares/UNIFESP), and screened for diagnoses of CNM, myotubular myopathy, or descriptions which included internal nuclei as a prominent feature, as long as the biopsy did not have a dystrophic pattern. A muscle pathology specialist then reviewed the biopsy slides to confirm findings and noted specific

features. Subsequently, patients were recruited for a clinical consultation and drawing of peripheral blood for genomic DNA extraction. The *DNM2* gene was Sanger sequenced using an Applied Biosystems ABI 3130 sequencer (Foster City, CA, USA), after PCR amplification of its exons and intron-exon boundaries using specifically designed pairs of oligonucleotides (available upon request). Sequences were compared to the wild-type *DNM2* sequence (RefSeq NM_001005360.2), and variants identified were matched to a database of *DNM2* variants in 100 control individuals in the Brazilian population, data from the Exome Variant Server (EVS) of NHLBI (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) and the variants database of the 1000 Genomes Project (<http://www.1000genomes.org/>), to exclude polymorphisms. Potential mutations were compared to *DNM2* mutation databases curated at the Leiden Open Variation Database (LOVD; <http://www.dmd.nl/>), at the Universal Mutation Database (UMD; <http://www.umd.be/DNM2/>), and at the Human Gene Mutation Database (HGMD; <http://www.hgmd.org/>).

The first patient to harbor a *DNM2* mutation was a 20 year-old female, fifth and last child and only affected of a non-consanguineous couple, who was born at term on cesarean section from a normal pregnancy. From the outset, the child was hypotonic, with weak suction and cry. However, she achieved normal infantile developmental milestones, having walked at 1 year and 2 months, and gaining ability to run and bike. At age 6, she started having feet deformity and scoliosis, which prompted medical investigation, and at the same time difficulty climbing stairs and raising from low positions became apparent, with slow progression. At age 12, she got to be wheelchair bound mainly due to the equinovarus feet deformities. Her motor ability remained stable thereafter. She recently started respiratory compromise manifested with dyspnea upon exertion, morning headache and excessive daytime sleepiness, confirmed as a severe restrictive pattern in a pulmonary function test (FVC 18% of predicted for age and sex). Despite being wheelchair bound and not walking due to the bilateral feet deformity, she is able to keep standing if put in position, with prosthetics. Physical exam shows elongated face, asymmetric ptosis, bilateral ophthalmoparesis with eye movement restriction in all directions, bilateral facial

weakness, high-arched palate and micrognathia (Figure 1A). There is generalized muscle atrophy, pectus excavatum, marked scoliosis, fixed bilateral knee and heel contractures. Multiple serum CK level measurements were normal, as well as echocardiography and EKG-Holter. Muscle biopsy performed at age 16 on the biceps brachii muscle showed increased fiber size variability with numerous centralized and internalized nuclei, moderate increase of endomysial connective tissue, in addition to a type 1 fiber predominance (Figure 2A). NADH-TR oxidative reaction showed a typical radiating sarcoplasmic strands, “spoke of wheels” fiber pattern (Figure 2B). Sanger sequencing of *DNM2* uncovered the mutation c.1115T>G, p.F372C, in exon 8, in a heterozygous state (Figure 1C). Sanger sequencing of this exon in both parents was normal, consistent with the finding of a *de novo* mutation.

The second patient, a 16-year old female, single child of non-consanguineous parents, was born at 8 months post amenorrhea after an uneventful pregnancy in which the mother noticed reduced fetal movements. She had low weight (1500 g) and mild neonatal hypoxia, requiring incubator therapy and O₂ administration for one month. After hospital discharge, she had normal infantile development, acquiring motor and cognitive milestones at the expected ages. Until the age of 9, the patient had minimal motor involvement. Thereafter, she started to manifest muscle weakness in her lower limbs, with frequent falls and difficulty climbing stairs, with continuous, albeit slow, worsening. She is now unable to rise from the floor or chair without help, but is ambulant if put in a standing position. She is slow to chew, but has no difficulty swallowing.

She has a typical congenital myopathy elongated face with ptosis, in addition to high-arched palate and slight facial weakness (Figure 1B). There is generalized muscular atrophy, with appendicular weakness predominantly in the lower limbs, proximal more than distal (MRC 4- vs. MRC 4+), marked fixed bilateral ankle contractures, and mild bilateral knee contractures. While she has normal head control, cervical flexors are involved (MRC 4). Serum CK level was always normal, EMG showed a myopathic pattern with short duration, small amplitude and polyphasic MUAPs. At the age of 13, she had a muscle biopsy performed in the deltoid muscle, which showed a typical centronuclear myopathy pattern with

increased centralized and internalized nuclei in the majority of fibers (Figure 2C). There was also mild proliferation of endomysial connective tissue. NADH-TR oxidative reaction showed fibers with radiated sarcoplasmic strands (Figure 2D). Sanger sequencing of *DNM2* showed the heterozygous mutation c.1102G>A, p.E368K, already known to be pathogenic in dominant families (Figure 1D). Further sequencing of parents confirmed that the mutation is indeed *de novo*.

The *DNM2* gene, mapped at cytoband 19p13.2, codes dynamin 2, a GTPase involved in intracellular vesicle trafficking and cytoskeleton remodeling with ubiquitous tissue expression (Bitoun *et al.*, 2005). In addition to its association to autosomal dominant and sporadic forms of centronuclear myopathy, *DNM2* is also mutated in axonal and dominant intermediate forms of Charcot-Marie-Tooth neuropathy (MIM #606482) (Bitoun *et al.*, 2007, Bitoun *et al.*, 2009, Züchner *et al.*, 2005) and a recessive mutation is implicated in a lethal congenital contracture syndrome (MIM #615368) (Koutsopoulos *et al.*, 2013). So far a total of 19 *DNM2* mutations have been deemed responsible for the CNM phenotype, concentrated in hot spot regions encompassing exons 8, 11 and 16, followed by exons 14 and 15; these exons code for either the stalk or the pleckstrin homology (PH) protein domains (Böhm *et al.*, 2012). Patients with mutations in exon 16 tend to present as a severe neonatal phenotype with profound hypotonia, whereas mutations in exon 8 are linked to mild or intermediate courses with neonatal to childhood onset.

The mutation found in the second patient (p.E368K, in exon 8) is the second most frequent in association with autosomal dominant CNM, giving rise to an invariable intermediate severity phenotype with neonatal or infantile onset of diffuse weakness including facial and periorbital muscles in 19 families (Böhm *et al.*, 2012). It is found in the middle/stalk domain of the dynamin 2 protein, and is expected to disrupt its binding interface with to the PH domain, according to the dynamin 1 crystal structure model (Faelber *et al.*, 2011). The novel mutation found in the first patient (p.F372C, in exon 8) changes phenylalanine to cysteine three amino acids down the coding sequence from the common mutation of the

second patient, in a position that also sits in the short region of the middle domain that compose the interface with the PH domain (Figure 3). This interface is made up of the positions 368, 369 (in both of which CNM mutations have been described), 372 (first patient of this report), and 373, 374 and 376, for which no mutation has been reported so far. Moreover, this novel p.F372C appeared de novo, sustaining it is pathologic.

In this Brazilian cohort, the two patients with *DNM2* mutations were the only ones to present typical fibers with radial arrangement of sarcoplasmic strands, a consistent finding described in various works (Romero, 2010; Bitoun *et al.*, 2005; Jeannet *et al.*, 2004). Direct sequencing of the mutation hot spots in the *DNM2* gene thus seems a reasonable approach in both autosomal dominant CNM cases and sporadic CNM cases when radiated sarcoplasmic strands are a prominent feature.

ACKNOWLEDGMENTS

OA was supported by a fellowship from CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil, process number 1286/51-2.

REFERENCES

- Agrawal PB, Pierson CR, Joshi M, Liu X, Ravenscroft G, Moghadaszadeh B, Talabere T, Viola M, Swanson LC, Haliloğlu G, et al. SPEG Interacts with Myotubularin, and Its Deficiency Causes Centronuclear Myopathy with Dilated Cardiomyopathy. *Am J Hum Genet.* 2014;doi: 10.1016/j.ajhg.2014.07.004.
- Bevilacqua JA, Monnier N, Bitoun M, Eymard B, Ferreiro A, Monges S, Lubieniecki F, Taratuto AL, Laquerrière A, Claeys KG et al. Recessive RYR1 mutations cause unusual congenital myopathy with prominent nuclear internalization and large areas of myofibrillar disorganization. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2011;37(3):271-84.
- Bitoun M, Maugendre S, Jeannet PY, Lacène E, Ferrer X, Laforêt P, Martin JJ, Laporte J, Lochmüller H, Beggs AH et al. Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nat Genet.* 2005;37(11):1207-9.

Bitoun M, Bevilacqua JA, Prudhon B, Maugenre S, Taratuto AL, Monges S, Lubieniecki F, Cances C, Uro-Coste E, Mayer M et al. Dynamin 2 mutations cause sporadic centronuclear myopathy with neonatal onset. *Ann Neurol*. 2007;62(6):666-70.

Bitoun M, Bevilacqua JA, Eymard B, Prudhon B, Fardeau M, Guicheney P, and Romero NB. A new centronuclear myopathy phenotype due to a novel dynamin 2 mutation. *Neurology*. 2009;72(1):93-5.

Böhm J, Biancalana V, Dechene ET, Bitoun M, Pierson CR, Schaefer E, Karasoy H, Dempsey MA, Klein F, Dondaine N et al. Mutation spectrum in the large GTPase dynamin 2, and genotype-phenotype correlation in autosomal dominant centronuclear myopathy. *Hum Mutat*. 2012;33(6):949-59.

Ceyhan-Birsoy O, Agrawal PB, Hidalgo C, Schmitz-Abe K, DeChene ET, Swanson LC, Soemedi R, Vasli N, Iannaccone ST, Shieh PB et al. Recessive truncating titin gene, TTN, mutations presenting as centronuclear myopathy. *Neurology*. 2013;81(14):1205-14.

Faelber K, Posor Y, Gao S, Held M, Roske Y, Schulze D, Haucke V, Noé F, and Daumke O. Crystal structure of nucleotide-free dynamin. *Nature*. 2011;477(7366):556-60.

Jeannet PY, Bassez G, Eymard B, Laforêt P, Urtizberea JA, Rouche A, Guicheney P, Fardeau M, and Romero NB. Clinical and histologic findings in autosomal centronuclear myopathy. *Neurology*. 2004;62(9):1484-90.

Koutsopoulos OS, Kretz C, Weller CM, Roux A, Mojzisova H, Böhm J, Koch C, Toussaint A, Heckel E, Stemkens D, et al. Dynamin 2 homozygous mutation in humans with a lethal congenital syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2013;21(6):637-42.

Majczenko K, Davidson AE, Camelo-Piragua S, Agrawal PB, Manfready RA, Li X, Joshi S, Xu J, Peng W, Beggs AH et al. Dominant mutation of CCDC78 in a unique congenital myopathy with prominent internal nuclei and atypical cores. *Am J Hum Genet*. 2012;91(2):365-71.

Nicot AS, Toussaint A, Tosch V, Kretz C, Wallgren-Pettersson C, Iwarsson E, Kingston H, Garnier JM, Biancalana V, Oldfors A et al. Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nat Genet*. 2007;39(9):1134-9.

Romero NB. Centronuclear myopathies: a widening concept. *Neuromuscul Disord.* 2010;20(4):223-8.

Tosch V, Rohde HM, Tronchère H, Zanoteli E, Monroy N, Kretz C, Dondaine N, Payrastre B, Mandel JL, and Laporte J. A novel PtdIns3P and PtdIns(3,5)P₂ phosphatase with an inactivating variant in centronuclear myopathy. *Hum Mol Genet.* 2006;15(21):3098-106.

Zanoteli E, Oliveira AS, Schmidt B, and Gabbai AA. Centronuclear myopathy: clinical aspects of ten Brazilian patients with childhood onset. *J Neurol Sci.* 1998;158(1):76-82.

Züchner S, Nouredine M, Kennerson M, Verhoeven K, Claeys K, De Jonghe P, Merory J, Oliveira SA, Speer MC, Stenger JE et al. Mutations in the pleckstrin homology domain of dynamin 2 cause dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Genet.* 2005;37(3):289-94.

INTERNET RESOURCES

1. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.omim.org/> (Accessed July 2014)
2. NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) Exome Variant Server (EVS), <http://evs.gs.washington.edu/EVS/> (Accessed July 2014)
3. 1000 Genomes, A Deep Catalog of Human Genetic Variation, <http://www.1000genomes.org/> (Accessed July 2014)
4. Leiden Muscular Dystrophy Pages Dynamin 2 (DNM2) Database, http://www.dmd.nl/nmdb/home.php?select_db=DNM2 (Accessed July 2014)
5. The UMD-DNM2-isoform1 mutations database, <http://www.umd.be/DNM2/> (Accessed July 2014)
6. The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff, <http://www.hgmd.org/> (Accessed July 2014)

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Clinical features and mutations of patients with *DNMT2* mutations. Both patients (A, first patient; B, second patient) present with elongated face, facial weakness and bilateral ptosis. The first patient also has asymmetrical ophthalmoparesis. C: heterozygous *DNMT2* mutation c.1115T>G, p.F372C found in the first patient. D: heterozygous *DNMT2* mutation c.1102G>A, p.E368K found in the second patient.

Figure 2. Muscle biopsy findings of patients with *DNM2* mutations. A: histology of the first patient shows moderate variability of muscle fiber size, fibers with prominence of centralized nuclei and mild increase of connective tissue (H&E stain, 40X); B: fiber type architecture of the first patient is abnormal, characterized in oxidative stains by fibers with radiating sarcoplasmic strands (aspect of “spoke of wheels”, green arrow), and ring-like fibers with a peripheral clear area (arrowheads) (NADH-TR, 40X); C: similarly, in the muscle biopsy of the second patient, there is a prominence of fibers with centralized nuclei and variable size, in addition to increased connective tissue (H&E stain, 40X); D: oxidative stains also show typical fibers with radiating sarcoplasmic strands (green arrow) and ring-like fibers (green arrowheads) (NADH-TR, 40X).

Figure 3. Dynamin 2 tridimensional structure prediction. Middle/stalk domain is shown at the top, in grey, and the PH domain at the bottom of the figure, in yellow. Residues shown in red have mutations described in association with CNM and concentrate at the interface between PH domain and the middle domain, whereas mutations implicated in Charcot-Marie-Tooth neuropathies, shown in blue, occur outside this interface. The novel mutation described in the first patient affects the F372 residue, shown in green in the model, is predicted to directly disturb the interface.

APÊNDICE 2

Artigo submetido à revista PLoS One em 15/06/2014

Integrative data mining highlights candidate genes for monogenic myopathies

Osorio Abath Neto^{1,2}, Olivier Tassy³, Valérie Biancalana^{1,4}, Edmar Zanuteli², Olivier Pourquié³, Jocelyn Laporte^{1*}

¹*Dept. of Translational Medicine and Neurogenetics, IGBMC, INSERM U964, CNRS UMR7104, University of Strasbourg, Collège de France, Illkirch, France;*

²*Departamento de Neurologia, Faculdade de Medicina de São Paulo (FMUSP), São Paulo, Brazil;*

³*Dept. of Development & Stem Cells, IGBMC, INSERM U964, CNRS UMR7104, University of Strasbourg, Collège de France, Illkirch, France;*

⁴*Faculté de Médecine, Laboratoire de Diagnostic Génétique, Nouvel Hopital Civil, Strasbourg, France.*

*Correspondence to: Jocelyn Laporte, IGBMC, 1 rue Laurent Fries, F-67404 Illkirch, France. E-mail: jocelyn@igbmc.fr.

Abstract

Inherited myopathies are a heterogeneous group of disabling disorders with still barely understood pathological mechanisms. Around 40% of afflicted patients remain without a molecular diagnosis after exclusion of known genes. The advent of high-throughput sequencing has opened avenues to the discovery of new implicated genes, but a working list of prioritized candidate genes is necessary to deal with the complexity of analyzing large-scale sequencing data. Here we used an integrative data mining strategy to analyze the genetic network linked to myopathies, derive specific signatures for inherited myopathy and related disorders, and identify and rank candidate genes for these groups. Training sets of genes were selected after literature review and used in Manteia, a public web-based data mining system, to extract disease group signatures in the form of enriched descriptor terms, which include functional annotation, human and mouse phenotypes, as well as biological pathways and protein interactions. These specific signatures were then used as an input to mine and rank candidate genes, followed by filtration against skeletal muscle expression and association with known diseases.

Signatures and identified candidate genes highlight both potential common pathological mechanisms and allelic disease groups. Recent discoveries of gene associations to diseases, like *B3GALNT2*, *GMPPB* and *B3GNT1* to congenital muscular dystrophies, were prioritized in the ranked lists, suggesting *a posteriori* validation of our approach and predictions. We show an example of how the ranked lists can be used to help analyze high-throughput sequencing data to identify candidate genes, and highlight the best candidate genes matching genomic regions linked to myopathies without known causative genes. This strategy can be automatized to generate fresh candidate gene lists, which help cope with database annotation updates as new knowledge is incorporated.

Keywords

Myopathy; muscle; candidate gene; gene ranking; data mining; *in silico* gene prioritization; mutation

Background

A large number of disorders affecting skeletal muscle have a genetic basis, with multiple modes of inheritance. They are classified based on phenotype and histopathological features into several groups, which include muscular dystrophies, congenital myopathies and myotonic syndromes, among others (Table 1)[1]. Muscular dystrophies and congenital muscular dystrophies, for example, are characterized by dystrophic changes on muscle biopsy, as opposed to congenital myopathies, which have non-dystrophic peculiar histopathologic findings [2-5]. Despite being rare, most inherited myopathies impose a heavy burden on the life of affected persons, and have a strong impact on the health care system. The identification of the causative gene and mutations is often a pre-requisite for genetic counseling and potentially prenatal diagnosis, improved disease care, and access to more specific therapies or inclusion in clinical trials. A lot of advances have been made in the last few decades on the molecular bases of inherited myopathies, which included the discovery of about 130 genes associated with different disorders[1]. Still, it is estimated that around 40% of patients afflicted with myopathies remain without a molecular diagnosis, supporting the implication of additional genes [6,7]. Further identification of these genes is the focus of a tremendous research effort at present, and will help understand pathological mechanisms and defining novel drug targets.

Next-generation sequencing (NGS) is a relatively new technology that enables massive parallel sequencing of a huge number of bases. It has revolutionized molecular diagnosis and genetic research, as it represents a cost-effective way of testing several genes at once in disorders with genetic heterogeneity, such as myopathies [8-10]. Moreover, exome sequencing (ES) or genome sequencing (GS) aid in the discovery of new genes associated with various diseases [11,12]. There has recently been a surge in publications that use NGS to discover new genes associated with diseases, including myopathies [13-20].

The biggest challenge of NGS is to cope with the complexity of analyzing the massive amount of variants generated by the approach. Indeed, comparing two unrelated individuals may lead to about 3 million matching variants in their genomes or about 20,000 in their exomes, but only one of these variants can cause a monogenic disease. The resolution of this issue demands good filtering pipelines to exclude common or meaningless variants, based on the biochemical function of genome location as studied through the ENCODE project[21], and on relationships between human variations and phenotype as in ClinVar and in locus specific databases[22,23]. In addition, ranking systems can help prioritize validation of the most promising variants. It makes sense to focus on genes presumably implicated in the disease process via functional, structural or phenotypical links with known genes. One of the approaches to collect and compare these data is via *in silico* analysis using a multitude of open-access knowledge information sources. This approach has been recently done successfully for some disorders but not yet for myopathies [24,25]. Lists of candidate genes thus generated can be ranked and used to prioritize variants resulting from NGS analysis.

Here, we propose ranked lists of candidate genes for individualized groups of inherited myopathies and related diseases that were obtained via data mining of online information databases. These lists can be coupled to NGS analyses pipelines to help filter and prioritize variants aiming at the discovery of novel genes. We also put forward a number of genetic and functional insights taken from the generation of signatures for such disease groups to suggest common pathological pathways between them that can be subject of further scrutiny.

Methods

Classification of myopathy genes into 9 overlapping disease groups

The disease groups and associated known genes were based on a modified version of the Gene Table of Neuromuscular Disorders (GTNMD) [26]. We selected the following disease groups, which are primarily related to skeletal

muscle pathology: Muscular Dystrophies, Congenital Muscular Dystrophies, Congenital Myopathies, Myotonic Syndromes, Ion Channel Muscle Diseases, Metabolic Myopathies, and Congenital Myasthenic Syndromes. To cope with an ill-defined classification of “Other Myopathies” in the GTNMD, we decided to cluster genes from this group into two new disease groups, Myofibrillar Myopathies and Vacuolar Myopathies. A literature search was performed to find recently published genes not yet listed in the Gene Table version that was used in our present study, which resulted in the addition of the following genes: *VMA21* [16] and *EPG5* [14] to the Vacuolar Myopathies group; *TRAPPC11* [13] and *TNPO3* [19,27] to the Muscular Dystrophies group; and *STIM1* [20], *CCDC78* [15] and *KLHL40* [17] to the Congenital Myopathies group.

The disease groups have some degree of overlap due to phenotypic heterogeneity of certain genes. For example, *SEPN1* is implicated in multi-minicore disease (a congenital myopathy), and in rigid-spine muscular dystrophy (a congenital muscular dystrophy); *CAV3* both causes limb-girdle muscular dystrophy 1C (a muscular dystrophy), and rippling muscle disease (a myotonic syndrome). The largest overlap is found between Muscular Dystrophies and Congenital Muscular Dystrophies, with 8 genes out of 34 muscular dystrophy-associated genes also found among 20 congenital muscular dystrophy-associated genes.

GTNMD's disease group "Distal Myopathies" was not included as a separate class in this work due to the lack of a gene uniquely associated with it - all genes were also found in other disease groups. Non-myopathy disease groups, such as ataxias, neuropathies, and motor neuron diseases, were also not included, as well as genes that, although listed in the GTNMD under included disease groups, do not lead to a skeletal muscle phenotype. This was the case of *MYBPC3*, implicated in cardiomyopathies, removed from the Congenital Myopathies group; *PRKAG2*, which causes a glycogen storage disease of the heart, not included in the Metabolic Myopathies group; and genes excluded from the Ion Channel Muscle Diseases group because they lead to various ataxia and cardiac arrhythmia syndromes, while not resulting in periodic muscle

paralysis. The full list of genes and disease groups used in this work can be found in Table 1.

Data-mining from online databases to address complex biological questions

We used the data mining system Manteia [28], a public resource available online (manteia.igbmc.fr) that retrieves and combines data from freely available online data sources such as Ensembl, Reactome, OMIM, NCBI, Human Phenotype Ontology (HPO), Gene Ontology (GO), Mouse Genome Informatics, and InterPro. Manteia makes it possible to address complex biological questions by running several queries at the same time to mine and statistically analyze gene sets to highlight their annotation specificities compared to the rest of the genome. This study was conducted with Manteia version 2 with data downloaded in June 2013 from the different databases used in the system.

Using Manteia's orthology module, we analyzed human gene sets and their mouse orthologs to find an enrichment on statistically significant terms within several annotation categories, including Gene Ontology (GO), Human Phenotype Ontology (HPO), Mammalian Phenotype Ontology (MPO), pathways (Reactome), protein motifs (Interpro) and interacting complexes (Reactome). Gene length was not taken into account as there is no clear enrichment of large genes mutated in myopathies; while some large genes are indeed implicated (TTN, NEB), smaller genes were found to accumulate mutations along their sequence (eg ACTA1). Manteia calculates the enrichment of each term in the gene set compared to all genes in the genome, and sorts the terms according to individual statistical significances.

The list of specific terms for each data set can then be used to screen the genome looking for genes that have similar properties. This is achieved using a query builder, which outputs a list of candidate genes ranked according to their similarity with the data set annotation signature and the weight given for each term.

Extraction of specific signatures for each disease group based on known genes

Statistical analysis for human genes in each disease group was individually performed for Gene Ontology (GO) terms, Human Phenotype Ontology (HPO) terms, pathways, complexes and protein motifs. Mouse orthologs were additionally used to get statistical breakdowns of Mammalian Phenotype Ontology (MPO) terms.

Signatures were represented by a weighted combination of GO terms, HPO terms, MPO terms, and what were collectively called "Interactions Annotation" (IA) terms - pathways and protein complexes descriptors from Reactome and descriptors of protein motifs from InterPro. For each disease group, terms were chosen from the various domains in order to obtain a signature of the disease group. We used the following criteria to select GO terms, HPO terms and MPO terms for each group: 1) significance p -value less than 0.05 (corrected using the Benjamini-Hochberg false discovery rate (FDR) procedure); 2) occurrence in the disease group gene set greater than 1; 3) occurrence in the genome <800; 4) GO level (or HPO level or MPO level) > 2.

The FDR-BH correction of the p -value was chosen because it reduced the large size of the list of resulting terms while not being as stringent as the Bonferroni correction. Terms with only one occurrence in the gene set were deemed not representative of the set. Criteria 3 and 4 enrich for specificity and are closely associated owing to less specific terms (higher ontology level) being associated with a large number of genes; such general terms would not only be unproductive in compounding a signature for a disease group, but also could degrade the performance of a complex query.

For IA terms, the restriction on the occurrence of only one gene in the set was dropped with the aim of improving the scores of new genes related to protein function linked to single known myopathy gene. Indeed, a large proportion of

significant terms have only one occurrence in any given disease group gene set. Finally, criteria 4 does not apply to Interpro and Reactome data, which are not structured in defined hierarchies as gene and phenotype ontologies.

Ranking formula based on weighted scores of signature terms

After experimenting with different signature definitions, we decided to define a signature as having an equal contribution of GO terms, phenotype terms (HPO and MPO terms) and IA terms (Figure 1), so as not to *a priori* give more importance to any term set. A signature with a stronger component of phenotype terms, for example, yields a list of purported candidates strongly biased to genes implicated in known diseases or for which mouse models have been extensively phenotyped. Likewise, if GO terms are the main component of the signature, genes with functional links are preferentially ranked. Finally, IA terms boost the interactome of the known genes to the top of the ranked lists.

Thus, in our approach, for each disease group, the weight of individual terms was calculated so that the added weights of all GO terms was the same as the total PO score (added HPO terms weights combined with added MPO terms weights) and as the added weights of all IA terms, which was arbitrarily set as 1000.

In the GO domain, we defined strata of term weights with percentile cutoffs so that terms with a higher significance would respond for a larger share of the total GO score. The top 20% of terms (p80) contributed to 40% of the total GO score, a middle tier comprising 40% of terms (p40-p80) contributed to an additional 40% of the total GO score, and the lower 40% of terms (p40) provided 20% of the total GO score.

A similar approach was used to calculate individual weights for HPO and MPO terms, with the exception that, as the total PO score reflects the combination of equal shares of HPO and MPO terms, the maximum score of either HPO terms or MPO terms was set at 500.

The weight of each IA term, on the other hand, was the same no matter its position on the corresponding list, and was simply calculated as 1000 divided by the number of significant IA terms for each disease group. This approach helped mine all genes that interacted with any single gene in the training set, provided pathways and interactions were statistically significant.

While the choice of percentile cutoffs that define the strata of weights was arbitrary, we observed that the modification of the cutoffs did not result in substantially different ranked candidate lists for each disease group, as long as the signature definition is the same. All terms for every domain in each disease group, with their corresponding calculated weights, can be found in Table S1.

Generation of ranked lists of candidate genes for each disease group

Manteia's query builder feature was used to filter genes in the human genome that matched the signature defined for each disease group. Queries combining terms that constitute the signature were run to obtain a list of genes ranked by a score represented by the sum of all matched term weights (Figure 1). More specifically, a gene score results as the sum of a GO score (sum of weights of the disease group's signature GO terms that match the gene's GO terms), a PO score (sum of weights of matching HPO and MPO terms), and an IA score (sum of weights of matching IA terms). The maximum total score a gene can receive is thus 3000 (1000 for GO score + 1000 for PO score + 1000 for IA score). To deal with MPO terms applied to murine orthologs, the predicted best human orthologs were selected using Manteia's ORTHO function after the ranking process. The ranked lists for each of the 9 disease groups, including annotation detailed in the next subsection, can be found in Table S2.

Additional filtering of ranked candidate genes using expression data and association with human diseases

The ranked lists for each disease group include the known genes of the group,

which were used to create the signatures, genes known to be associated with myopathies but implicated in other disease groups, and genes that are not listed in any disease group and thus represent potentially good candidate genes for myopathies. Among those, additional filtering was performed using tissue expression databases. Data from Illumina Body Map E-MAT513, established from mRNA-Seq of 16 human tissues, was downloaded for every gene, and genes with no expression in skeletal muscle or with an expression in skeletal muscle that was less than a cutoff of 10% of the maximum expression found in any other tissue were excluded. The rationale behind this filtering is that if a gene is expressed in a tissue other than skeletal muscle at a much higher level, one expects such a gene to be implicated in disorders primarily involving that tissue. The 10% cutoff was empirically determined due to the fact that all genes already implicated in myopathies have skeletal muscle expression levels above this cutoff. To deal with missing expression data and eventual heterogeneity in Illumina Body Map's expression database, genes ruled out by the 10% threshold and candidate genes within the 100 first positions in the rankings for each disease group were double checked using expression data from the Genotype-Tissue Expression Project (GTEx) [29].

For the Congenital Myasthenic Syndromes disease group, which includes diseases primarily related to neuromuscular junction protein defects, but also some peripheral nerve terminal protein defects, we decided to disregard the muscle expression filtering due to the fact that the implicated genes *AGRN*, *CHAT*, and *CHRNE* do not have significant skeletal muscle expression (they are instead expressed in the nerve terminal).

The lists of candidate genes after skeletal muscle expression filtration was further annotated with Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) data on existing human phenotype in the form of well-characterized diseases or syndromes, in order to easily identify genes biased by phenotype, such as *SMN1*, which results in a phenotype very similar to many myopathies, characterized by flaccid proximal limb weakness, but which gives rise instead to a motor neuron disease; or biased by interactions, as occurs to a number of

carbohydrate metabolism genes that share common pathways to metabolic myopathies but cause instead inborn errors of metabolism without a muscle phenotype.

Results

Myopathy groups are clustered by gene ontology and protein function

To identify novel candidate genes for myopathies, we established an integrated data mining approach aiming first to extract specific signatures for disease groups encompassing previously implicated genes, and then to use these signatures to search for additional matching genes in the human genome. As detailed in Figure 1 and the methods section, this approach consists of a weighted ranking of three main sets of data: gene ontology, human and mouse phenotypes ontologies, and “interactions annotation” incorporating pathways and protein motifs and complexes.

To test this approach and better visualize signature composition analysis, we first analyzed a training set that consisted in all myopathy-associated genes using the data mining system Manteia[28]. Figure 2 shows graphs with relationships between all known genes of the nine chosen disease groups. In particular, the combination of GO, PO and IA terms aggregate most genes that are part of the same myopathy group for metabolic myopathies, the congenital myasthenic syndromes, and the glycosylation components of congenital muscular dystrophies (Figure 2A). Of note, the gene *GFPT1*, which causes a congenital myasthenic syndrome with tubular aggregates, has mainly relationships with genes in the metabolic myopathy cluster, presumably because it codes for an enzyme in the metabolism of glycoproteins. Another large cluster in the graph encompasses the main genes implicated in muscular dystrophies and congenital or myofibrillar myopathies, without subdivision, suggesting a strong overlap in the function of the related genes and potentially in the pathogenesis. This approach can thus retrieve several phenotypic and pathologic clusters. However, applying only the human phenotype ontology analysis generates a single large, highly connected graph (Figure 2B), even

when the threshold for representing an edge in the graph - number of matching HPO term between two genes - is increased or decreased, or when HPO term hierarchy is taken into account. This means that genes implicated in myopathies share a common hierarchy of phenotype ontology terms, e.g. with most genes annotated with muscle weakness or abnormal muscle physiology related terms. While they do not help separate genes into disease groups, HPO terms are important to help emerge genes with phenotype annotation associated to skeletal muscle. GO terms and IA terms, on the other hand, are responsible for the final clustering. Different myopathy groups appear using only GO terms (Figure 2C), while IA terms, even considering a lower threshold of 5 terms shared between genes, create smaller clusters of genes that interact closely by sharing the same pathways, interactions complexes or motifs, such as constituents of collagen VI, genes responsible for the assembly of nicotinic cholinergic receptors, or conglomerated proteins involved with the sarcomere (Figure 2D). Only the combination of the different GO, PO and IA terms reaches the most precise clustering.

Characterization of disease groups via biological processes annotation

We next aimed to extract specific signatures for each disease group, classified based on the Gene Table of Neuromuscular Disorders[1]. Statistical analysis of known genes was conducted for each disease group.

GO terms include three types of ontologies: cellular components indicate the localization of gene products; molecular function refers to the normal roles of genes at the molecular level; and biological processes describe the higher-order roles of genes from a biological perspective. Four main general skeletal muscle-related biological processes were extrapolated from the hierarchy of GO terms: muscle contraction, calcium homeostasis, muscle development, and muscle intracellular organization (Table 2). Analysis of the breakdown of biological process-related GO terms that make up the signatures of different disease groups reveals differences in the implicated skeletal muscle processes

and hints on other important biological processes that do not primarily involve the skeletal muscle.

Vacuolar myopathies and myofibrillar myopathies did not receive in their signature GO terms associated with biological processes, because the training set genes for these groups were annotated with heterogeneous terms that did not attain statistical significance. Metabolic myopathies and congenital myasthenic syndromes inferred biological processes were, as expected, not primarily muscle related, but had mostly to do with glycogen metabolism and neuromuscular junction, respectively. Congenital muscular dystrophies, while having two GO terms associated with muscle development, were also primarily annotated with non muscle-specific biological processes, especially protein glycosylation. Myotonic myopathies and ion channel muscle diseases take the larger contribution from calcium homeostasis-related terms. Muscular dystrophies mainly involve muscle intracellular organization terms, but also receive some contribution from muscle development and muscle contraction terms. Other important biological processes for muscular dystrophies are associated with heart muscle contraction and development. Finally, for congenital myopathies, muscle development and calcium homeostasis seem to be the most significant processes, but muscle contraction-related terms also play a role, as well as processes not specific for skeletal muscle, such as catabolism of nucleotides - these appear enriched due to the association of *DNM2* to the catabolism of GTP, as well as *MYH7* and *TPM2* to the catabolism of ATP.

Training set genes appear at the top of the ranked lists of the disease groups

We used the signature specific to each disease group to screen the whole set of human genes and identify candidate genes for myopathies. The breakdown of the gene score for these training set genes shows that a similar contribution of the different term domains can be consistently found throughout the various disease groups. GO score, PO score and IA score respond for approximately

30 to 45%, 40 to 55%, and 10 to 15% of the gene score, respectively. Table 3 shows the ranked lists of known genes for three disease groups (Congenital Myopathies, Muscular Dystrophies and Metabolic Myopathies), along with each gene score and breakdown of partial scores. Table S3 shows similar additional data for all disease groups.

As expected, genes already known to be mutated in the various disease groups, which were used as the training set to create the mining signatures, appear at the top of the ranked lists of data mining. Considering congenital myopathies, out of the 22 genes chosen as the training set, 19 genes appeared in the data mining, while genes *CCDC78*, *KBTD13*, and *KLHL40* did not have annotation in the databases used at the time of this work. Thirteen of these genes were ranked within the first 100 genes, a coverage of 13/19 (68.4%). The muscular dystrophy group had 31 out of 34 genes of its training set appearing in the data mining list, and of these 23 were found within the first 100 ranked genes (79.3%). In the metabolic myopathy disease group, all 19 genes of the training set were ranked, and 18/19 were found within the top 100 genes in the rank (94.7%). Outliers among the known genes are mostly poorly annotated genes, and genes with no score are actually not annotated at all (see discussion). Thus, the high ranking of most previously implicated genes supports the signature choice having adequately defined the disease group.

Proposed candidate genes after filtration

A number of candidate genes sharing disease group signatures with known myopathy genes are barely expressed in skeletal muscle or sometimes mutated in other diseases not affecting skeletal muscle. We thus added filtering steps based on tissue expression and known implication in diseases (see methods for details). Table 4 shows the top 8 ranked genes for each disease group after filtration on skeletal muscle expression and absence of link with diseases in OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man, omim.org) database. Table S2 lists the full ranked list of genes for each disease group without filtration, but annotated with skeletal muscle expression and OMIM diseases, and can be linked to NGS filtering pipelines to help prioritization of novel gene discovery, as

shown in the discussion. In the following paragraphs, we discuss a few genes found as candidates in some of the disease groups, to illustrate the connections between the integrated data mining results and evidence from the literature.

Candidate genes for muscular dystrophies display strong links with muscle development, contraction and intracellular organization, expected subcomponents of skeletal muscle-related biological processes terms from the breakdown of GO terms. *ITGB1* codes for a subunit of ubiquitous fibronectin receptors and has a number of suggested functions in different tissues. In skeletal muscle, it has been proposed as a possible target for myostatin in mice myoblast differentiation [30] and is also critical for the development of neuromuscular junctions [31]. *TMOD1* encodes for tropomodulin, a protein that regulates tropomyosin and F-actin organization. Knockout mice present with age-dependent sarcomere misalignment and sarcoplasmic reticulum morphological defects [32]. *MYL1* is involved with early differentiation of fast muscle cells [33] and *TNNI1* codes for the slow-twitch skeletal muscle isoform of troponin I, which has yet to be associated with human diseases even though the fast-twitch isoform is responsible for a subtype of arthrogryposis and the cardiac isoform causes cardiomyopathy syndromes.

Candidate genes for congenital myopathies have a significant overlap with genes proposed for muscular dystrophies, for example for *TMOD1* and *TNNI1*. Among those with a high rank in congenital myopathies are *RYR3* and *MYH1*. *RYR3* codes for a ryanodine calcium release channel with a low Ca^{2+} sensitivity that has a physiologic role in the excitation-contraction coupling of neonatal skeletal muscles and is up regulated in steroid-associated muscle damage [34], while *MYH1* is one of the adult skeletal muscle isoforms of myosin heavy chain that predominates in 2B myofibers. *RYR3* high ranking is boosted by a strong contribution of calcium homeostasis terms, explaining why *RYR3* received a similarly high score in the Myotonic Syndromes and Ion Channel Muscle Diseases groups, which also have a strong component of calcium homeostasis terms. Also in the group of Ion Channel Muscle Diseases, the gene *CACNB1* encodes both the brain and skeletal muscle isoforms of the calcium channel

beta subunit, and its loss in mouse is associated to a phenotype similar to that seen in mice with mutations in the known genes *CACNA1S* or *RYR1* [35].

Within congenital muscular dystrophies, the gene *B3GALNT2*, ranked in the 97th place out of 4841 genes with annotation for this group's signature, was recently found to be associated with hypoglycosylation of alpha-dystroglycan and a congenital muscular dystrophy phenotype in humans [18]. Two other genes, *GMPPB*, ranked in 225th, and *B3GNT1*, ranked in 479th, were also implicated in a form of congenital muscular dystrophy with hypoglycosylation of alpha-dystroglycan and Walker-Warburg disease, respectively [36,37]. These genes had not been used in the training set of genes for congenital muscular dystrophies, and have since been annotated in OMIM, but their high placement in the ranking list validate the proposed data mining strategy and subsequent filtering steps.

Candidate genes within genomic regions linked to myopathies

A number of neuromuscular diseases have mapped loci awaiting gene identification[1]. Matching the genomic positions of the top 100 candidate genes of each disease group with such mapped loci reveals some interesting candidates (Table 5).

The gene *XIRP1*, matching the locus for hyalin body myopathy and congenital muscular dystrophy with joint hyperlaxity, was originally studied in relation to murine cardiac morphogenesis and later shown to bind skeletal muscle actin in *in vitro* assays [38]. Its product, the Xin protein, is skeletal muscle-specific and has recently been put forward as a potentially useful biomarker of muscle damage, which can be used to monitor disease progression and treatment effects in myopathies[39]. *OBSCN* encodes obscurin, a giant sarcomeric signaling protein similar to titin, which has a suspected role in myofibrillogenesis. It is also involved in dystrophin localization and maintenance of sarcolemma integrity [40], and is proposed here as a candidate for congenital muscular dystrophy with merosin deficiency (MDC1B). An additional candidate

gene mapped in the linked region is *GALNT2*, a glycosylating enzyme similar to *B3GALNT2* recently found mutated in another form of congenital muscular dystrophy [18], and also involved in the O-glycosylation of peptides in the Golgi apparatus.

Although not directly analyzed in this work, malignant hyperthermia susceptibility regions encompass *CACNG1* and *CACNA2D1*, which are associated with calcium homeostasis and calcium channels, are highly ranked for Ion Channel Muscle Diseases, and are thus interesting candidates. *CACNA2D1*, specifically, has been suggested at least as a modifier of hyperthermia susceptibility in association to other genes[41]. These genes have been excluded in a limited number of families not linked to *RYR1* mutations [42], results which may be revisited with the advent of NGS data. Additionally, another candidate gene, *CACNB1*, has no associated human disease. Indeed, *CACNG1*, *CACNB1* and *CACNA2D1* encode for subunits of the DHPR calcium channel, which is in direct contact and regulating RYR1 in skeletal muscle, and one mutation in the channel subunit *CACNA1S* of DHPR was linked to malignant hyperthermia [43].

The *CALR* and *AP1M1* genes both map to 19q13, the locus associated to autosomal muscular dystrophy with rimmed vacuoles. In a recent work, the product of the *CALR* gene, calreticulin, has been shown to localize in cardiomyocyte mitochondria, and its content increases in mouse models with dilated cardiomyopathy[44]. Strikingly, calreticulin was found to be highly expressed in GNE myopathy, a distal myopathy associated with rimmed vacuoles[45]. Also in distal myopathies with rimmed vacuoles, though not necessarily GNE myopathy, adaptin related-proteins subunits, which are normally not marked in the immunohistochemistry of normal muscle, appear inside or on the rims of vacuoles. The *AP1M1* gene codes for the mu subunit of adaptin related-proteins[46].

Discussion

In this study, an integrated data mining strategy was used to cluster and rank genes with known or potential importance for skeletal muscle, and to provide candidate genes for myopathies and some related diseases. Results from the clustering and ranking highlight pathological pathways specific for disease groups. The list of candidate genes was further filtered based on expression data and association with other diseases, and the ensuing identification of mutations in high-ranked genes for congenital muscular dystrophies (*B3GALNT2*, *GMPPB* and *B3GNT1*) illustrated the validity of this approach.

Gene clustering and ranking are dependent on database annotations

Proposed genes in the final ranked list have gene scores with a major contribution of GO and IA terms, and eventual contribution of MPO terms. Thus, they represent genes that have mostly functional links with known myopathy genes (IA terms and GO term ontologies for biological processes and molecular functions), but also some degree of product colocalization in the muscle cell, as expected from matching cellular component-related GO terms. When available, data on altered skeletal muscle function in mouse models also tend to contribute to higher scores for proposed candidate genes.

Database annotation can vary from one gene to another, as it is dependent on the history of research for each gene, including both the date when the gene was discovered and the amount of effort spent for its functional characterization. In addition, animal models are generally phenotyped with a specific organ system in mind.

To illustrate the effects of incomplete annotation, the genes *TRAPPC11* and *TNPO3*, recently implicated in muscular dystrophies, were used as components of this disease group training set, but did not impact the results of the gene ranking due to their poor database annotation. Likewise, they were themselves not captured by the signature used for the Muscular Dystrophies disease group. *TRAPPC11* does not appear in the ranking, as it was annotated with only two GO terms that are not significant for muscular dystrophies ("vesicle-mediated transport" and "Golgi apparatus"), it has no annotation for pathways or

phenotypes, and its two protein motifs are unique in the genome. Annotation biases also account for higher placements of better-annotated genes that have some kind of overlap with myopathy genes. Such is the case for motor neuron disease-associated genes, which give rise to human and mouse phenotypes that present some degree of phenotypic overlap with myopathies and tend to share many HPO or MPO terms with myopathy phenotypes. In the ranked list of muscular dystrophies, high scores with a predominant contribution of HPO terms were given to the genes *SMN1*, *SMN2*, *ALS2*, *IGHMBP2* and *AR*. These genes are linked to different types of motor neuron disease, which ultimately manifest with muscle weakness and atrophy.

In silico approaches need thus periodic revisits to adjust candidate lists based on association of new genes that impact training sets and discovery of new pathways or interactions that change corresponding database annotation, such as the recently published interactome of skeletal muscle proteins centered on proteins that cause limb-girdle muscular dystrophies [47].

Possible insights into pathological mechanisms

The integrated data mining identified gene signatures revealing common function within specific myopathy groups or between groups, and highlighting pathological mechanisms.

Known and candidate genes for metabolic myopathies, congenital myasthenic syndromes, myotonic syndromes, and ion channel muscle diseases define distinctive functions for each disease group (Table 2). Highly ranked genes for congenital myasthenic syndromes are associated to function not primarily linked to skeletal muscle but point as expected to the neuromuscular junction. The cellular basis of myotonic myopathies and ion channel muscle diseases consists in the alteration of ion homeostasis. Additional genes contributing to glycogen metabolism were identified as good candidate genes for the metabolic myopathies.

Muscle development, muscle contraction and calcium homeostasis are key pathways linked to congenital myopathies; indeed this myopathy group presents generally at or before birth, and is characterized by histological

hallmarks reflecting alteration and aggregation of proteins implicated in muscle contraction (nemaline myopathies) or due to primary defects in the excitation-contraction coupling (core myopathies and potentially the centronuclear myopathies).

Muscular dystrophies mainly involve muscle intracellular organization terms that reflect the structural importance of most proteins already reported mutated. However, other pathways may have been overlooked because the way the first genes were discovered; once the *DMD* gene was found, investigators started seeking mutations on genes from the dystrophin-glycoprotein complex. Of note, based on the terms breakdown and candidate genes identified, muscular dystrophies may have a larger contribution from the contractile apparatus than previously assumed, which would bring this disease group closer to congenital myopathies.

Allelic diseases

The integrated data mining reveals or confirms allelic diseases. Indeed, while proposed genes for metabolic myopathies or myasthenic syndromes are rather group-specific, a larger overlap occurred between congenital myopathies and muscular dystrophies than what was expected from the analysis of overlap between these groups' training sets. While only 2 genes out of 34 muscular dystrophy training set genes also appeared among the 22 congenital myopathy training set genes (*TTN* and *TRIM32*), the first positions on the ranked lists of candidate genes after filtering for known diseases encompass a large overlap of genes: 5 out of the top 8 candidate genes for muscular dystrophies are within the top 8 for congenital myopathies (Table 4), and 33 out of the top 50 candidate muscular dystrophy genes are also within the top 50 candidate genes for congenital myopathies (Figure 3 and Table S2). Overlaps are also substantial between both these lists and the one for myofibrillar myopathies, but in this case the overlap was expected as the training set for myofibrillar myopathies, despite being small (7 genes), included 2 genes also associated to muscular dystrophies and 1 gene associated to congenital myopathies. On the other hand, while the training sets of muscular dystrophies and congenital

muscular dystrophies overlap with a significant share of 8 genes, only 3 genes within the top 50 candidate genes is the same for both groups. The reasons for these results lie in the signature of the disease groups: the breakdown of biological processes terms (depicted in Table 2), which represent the larger share of GO terms, is more comparable between congenital myopathies and muscular dystrophies, with similar contributions of terms involving muscle contraction and development, as opposed to the absence of resemblance between these disease groups and the congenital muscular dystrophies breakdown, which is enriched with mainly non-skeletal muscle-related terms, especially glycosylation. Taken together, gene clustering and candidate genes retrieval suggest that mutations in the same genes will eventually be linked to both muscular dystrophies and congenital myopathies.

Table 4 presents the top 8 ranked genes after excluding genes with known disease annotation. Genes with known disease annotation (listed in Table S2) might still be good candidate genes for myopathies, considering that phenotypic variability is more a rule than an exception for known myopathy genes. This is the case for genes linked to both myopathy and cardiomyopathy. It is thus expected that known cardiomyopathy-associated genes may be found associated with a skeletal muscle phenotype. Such phenotypic variability may even transcend the realm of muscle alteration. *DNM2*, for example, is associated both with centronuclear myopathy, a congenital myopathy, and Charcot-Marie Tooth disease, a hereditary neuropathy [48,49]. *LMNA*, in addition to multiple myopathic phenotypes, also causes Charcot-Marie Tooth disease or progeria [50,51], and *SYNE1* can cause one type of Emery-Dreifuss muscular dystrophy, a dilated cardiomyopathy syndrome, a form of autosomal recessive arthrogryposis, and autosomal recessive spinocerebellar ataxia [52-55]. The origin of the variability may stem from varying impacts of mutations in different protein domains. For example, in *DNM2*, mutations giving rise to a centronuclear myopathy phenotype are enriched in the interface between the middle domain and the pleckstrin homology domain, while mutations implicated in Charcot-Marie-Tooth disease tend to cluster in other parts of the pleckstrin homology domain[56].

After we carried out this work, a form of vacuolar myopathy was associated to *CLN3*, implicated in neuronal ceroid lipofuscinosis, ranked 343rd for vacuolar myopathies [57]. In addition, *LRP4*, a gene associated with Cenani-Lenz syndactyly syndrome and sclerosteosis, and ranked high (54th) for congenital muscular dystrophies, was implicated in a patient with a CMS disease [58]. We therefore suggest that genes with disease annotation in the ranked lists should be considered with caution in analyzing NGS results, but not *a priori* excluded when using filtering pipelines.

Example of the usage of the ranked lists

We found the ranked lists to be helpful in our own analysis of exome data to prioritize the scrutiny of potential novel genes implicated in myopathies. The gene ranks in the Excel file sheets in Table S2 can be easily used as additional genomic annotation.

Consider this exome of a sporadic patient affected with nemaline myopathy, a congenital myopathy, from unaffected parents (Table S4). Out of an initial 86,333 variants called in the exome data, 250 remained after variants filtering to exclude purported sequencing errors and polymorphisms. The first variants we analyze closely are the ones found in genes with known implication in myopathies. The heterozygous variants in *DMD* and *CACNA1S* were subsequently found in the unaffected father, while the missense variant in *ANO5*, associated with autosomal recessive limb girdle dystrophy 2L, would require an association to a second mutation to cause disease. We can thus exclude the implication of these known genes.

We next focus on the candidate genes for congenital myopathies (Table 4 and Table S2). If a gene has more than 10% expression in skeletal muscle and is not associated to a disease, it receives a flag as a “candidate”. Only 29 variants, a significant reduction from the original 250, survive this additional filtering and are shown in Table 6.

The gene with the highest rank was *PXN*, which codes for paxillin, a protein believed to have a function related to integrins and cytoskeletal localization in

multiple tissues, skeletal muscle included [59]. The second best gene was *MYBPH*, which codes for myosin-binding protein H, the second most abundant protein of the family of myosin-associated proteins [60]. Except for its cloning, not much is known about its specific function. The third gene, *PPARGC1A*, has regulatory functions on glucose and fat oxidation in muscle cells and protects skeletal muscle fibers against atrophy in mouse models [61]. However, in all these genes, single mutations were found in a heterozygous state, thus a putative dominant negative effect or haploinsufficiency would be required for a pathogenicity call. The next gene in the list, *SYNPO*, produces synaptopodin, a protein whose name stems from its involvement in synapses involving dendritic spines, in addition to renal podocytes [62]. In spite of its name, skeletal muscle is actually the tissue where it is most strongly expressed. Furthermore, synaptopodin directly binds actin, one of the proteins known to be involved in nemaline myopathy. The missense variant found in this gene was homozygous, in a highly evolutionary conserved position, with prediction of pathogenicity in multiple tools, and was Sanger confirmed to be homozygous in the patient and heterozygous in her parents. We believe *SYNPO* is the best candidate gene for this family, based on a recessive scenario. While we cannot discard the other genes, the ranking of candidate genes based on our integrative data mining quickly highlights the best genes to proceed further in functional analysis.

Conclusions

The above integrated data mining approach was successfully used to retrieve both specific signatures for different myopathy groups and to uncover and rank interesting candidate genes for myopathies. Recent discoveries of gene implications that were correctly identified by the disease group's signature validated this approach. *In silico* approaches allow for systematic, but modifiable criteria to be used in generating ranked candidate lists and have the added benefit of automation, whereby such lists can be updated on the fly as new knowledge is incorporated in genomic databases.

Signatures and candidate genes highlighted both potential common pathological mechanisms and overlap between several disease groups. In

addition, the ranked candidate gene lists are helpful to prioritize functional validation of filtered variants from overwhelming NGS data.

References

1. Kaplan JC, Hamroun D (2013) The 2014 version of the gene table of monogenic neuromuscular disorders (nuclear genome). *Neuromuscul Disord* 23: 1081-1111.
2. Mercuri E, Muntoni F (2013) Muscular dystrophies. *Lancet* 381: 845-860.
3. Nance JR, Dowling JJ, Gibbs EM, Bonnemann CG (2012) Congenital myopathies: an update. *Curr Neurol Neurosci Rep* 12: 165-174.
4. Mercuri E, Muntoni F (2012) The ever-expanding spectrum of congenital muscular dystrophies. *Ann Neurol* 72: 9-17.
5. Heatwole CR, Statland JM, Logigian EL (2013) The diagnosis and treatment of myotonic disorders. *Muscle Nerve* 47: 632-648.
6. Amburgey K, McNamara N, Bennett LR, McCormick ME, Acsadi G, et al. (2011) Prevalence of congenital myopathies in a representative pediatric united states population. *Ann Neurol* 70: 662-665.
7. Cuisset JM, Maurage CA, Carpentier A, Briand G, Thevenon A, et al. (2013) [Muscle biopsy in children: Usefulness in 2012]. *Rev Neurol (Paris)* 169: 632-639.
8. Bohm J, Vasli N, Malfatti E, Le Gras S, Feger C, et al. (2013) An integrated diagnosis strategy for congenital myopathies. *PLoS One* 8: e67527.
9. Vasli N, Laporte J (2013) Impacts of massively parallel sequencing for genetic diagnosis of neuromuscular disorders. *Acta Neuropathol* 125: 173-185.
10. Nigro V, Piluso G (2012) Next generation sequencing (NGS) strategies for the genetic testing of myopathies. *Acta Myol* 31: 196-200.
11. Boycott KM, Vanstone MR, Bulman DE, MacKenzie AE (2013) Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation. *Nat Rev Genet* 14: 681-691.

12. Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, Bigham AW, Tabor HK, et al. (2010) Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet* 42: 30-35.
13. Bogershausen N, Shahrzad N, Chong JX, von Kleist-Retzow JC, Stanga D, et al. (2013) Recessive TRAPPC11 Mutations Cause a Disease Spectrum of Limb Girdle Muscular Dystrophy and Myopathy with Movement Disorder and Intellectual Disability. *Am J Hum Genet* 93: 181-190.
14. Cullup T, Kho AL, Dionisi-Vici C, Brandmeier B, Smith F, et al. (2013) Recessive mutations in EPG5 cause Vici syndrome, a multisystem disorder with defective autophagy. *Nat Genet* 45: 83-87.
15. Majczenko K, Davidson AE, Camelo-Piragua S, Agrawal PB, Manfready RA, et al. (2012) Dominant mutation of CCDC78 in a unique congenital myopathy with prominent internal nuclei and atypical cores. *Am J Hum Genet* 91: 365-371.
16. Ramachandran N, Munteanu I, Wang P, Ruggieri A, Rilstone JJ, et al. (2013) VMA21 deficiency prevents vacuolar ATPase assembly and causes autophagic vacuolar myopathy. *Acta Neuropathol* 125: 439-457.
17. Ravenscroft G, Miyatake S, Lehtokari VL, Todd EJ, Vornanen P, et al. (2013) Mutations in KLHL40 Are a Frequent Cause of Severe Autosomal-Recessive Nemaline Myopathy. *Am J Hum Genet* 93: 6-18.
18. Stevens E, Carss KJ, Cirak S, Foley AR, Torelli S, et al. (2013) Mutations in B3GALNT2 cause congenital muscular dystrophy and hypoglycosylation of alpha-dystroglycan. *Am J Hum Genet* 92: 354-365.
19. Torella A, Fanin M, Mutarelli M, Peterle E, Del Vecchio Blanco F, et al. (2013) Next-generation sequencing identifies transportin 3 as the causative gene for LGMD1F. *PLoS One* 8: e63536.
20. Bohm J, Chevessier F, Maues De Paula A, Koch C, Attarian S, et al. (2013) Constitutive activation of the calcium sensor STIM1 causes tubular-aggregate myopathy. *Am J Hum Genet* 92: 271-278.
21. Consortium EP (2012) An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489: 57-74.

22. Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, Jang W, Rubinstein WS, et al. (2014) ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res* 42: D980-985.
23. Fokkema IF, Taschner PE, Schaafsma GC, Celli J, Laros JF, et al. (2011) LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. *Hum Mutat* 32: 557-563.
24. Accetturo M, Creanza TM, Santoro C, Tria G, Giordano A, et al. (2010) Finding new genes for non-syndromic hearing loss through an in silico prioritization study. *PLoS One* 5.
25. Chang S, Zhang W, Gao L, Wang J (2012) Prioritization of candidate genes for attention deficit hyperactivity disorder by computational analysis of multiple data sources. *Protein Cell* 3: 526-534.
26. Kaplan JC GeneTable of Neuromuscular Disorders. Available: <http://muscle.genetable.fr/>. Accessed 17 Jan 2014.
27. Melia MJ, Kubota A, Ortolano S, Vilchez JJ, Gamez J, et al. (2013) Limb-girdle muscular dystrophy 1F is caused by a microdeletion in the transportin 3 gene. *Brain* 136: 1508-1517.
28. Tassy O, Pourquie O (2014) Manteia, a predictive data mining system for vertebrate genes and its applications to human genetic diseases. *Nucleic Acids Res* 42: D882-891.
29. Consortium GT (2013) The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat Genet* 45: 580-585.
30. Wicik Z, Sadkowski T, Jank M, Motyl T (2011) The transcriptomic signature of myostatin inhibitory influence on the differentiation of mouse C2C12 myoblasts. *Pol J Vet Sci* 14: 643-652.
31. Schwander M, Shirasaki R, Pfaff SL, Muller U (2004) Beta1 integrins in muscle, but not in motor neurons, are required for skeletal muscle innervation. *J Neurosci* 24: 8181-8191.
32. Gokhin DS, Fowler VM (2011) Cytoplasmic gamma-actin and tropomodulin isoforms link to the sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle fibers. *J Cell Biol* 194: 105-120.

33. Burguiere AC, Nord H, von Hofsten J (2011) Alkali-like myosin light chain-1 (myl1) is an early marker for differentiating fast muscle cells in zebrafish. *Dev Dyn* 240: 1856-1863.
34. Mohaupt MG, Karas RH, Babiychuk EB, Sanchez-Freire V, Monastyrskaya K, et al. (2009) Association between statin-associated myopathy and skeletal muscle damage. *CMAJ* 181: E11-18.
35. Gregg RG, Messing A, Strube C, Beurg M, Moss R, et al. (1996) Absence of the beta subunit (cchb1) of the skeletal muscle dihydropyridine receptor alters expression of the alpha 1 subunit and eliminates excitation-contraction coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13961-13966.
36. Carss KJ, Stevens E, Foley AR, Cirak S, Riemersma M, et al. (2013) Mutations in GDP-mannose pyrophosphorylase B cause congenital and limb-girdle muscular dystrophies associated with hypoglycosylation of alpha-dystroglycan. *Am J Hum Genet* 93: 29-41.
37. Buysse K, Riemersma M, Powell G, van Reeuwijk J, Chitayat D, et al. (2013) Missense mutations in beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 1 (B3GNT1) cause Walker-Warburg syndrome. *Hum Mol Genet* 22: 1746-1754.
38. Pacholsky D, Vakeel P, Himmel M, Lowe T, Stradal T, et al. (2004) Xin repeats define a novel actin-binding motif. *J Cell Sci* 117: 5257-5268.
39. Nilsson MI, Nissar AA, Al-Sajee D, Tarnopolsky MA, Parise G, et al. (2013) Xin is a marker of skeletal muscle damage severity in myopathies. *Am J Pathol* 183: 1703-1709.
40. Randazzo D, Giacomello E, Lorenzini S, Rossi D, Pierantozzi E, et al. (2013) Obscurin is required for ankyrinB-dependent dystrophin localization and sarcolemma integrity. *J Cell Biol* 200: 523-536.
41. Robinson RL, Curran JL, Ellis FR, Halsall PJ, Hall WJ, et al. (2000) Multiple interacting gene products may influence susceptibility to malignant hyperthermia. *Ann Hum Genet* 64: 307-320.
42. Iles DE, Segers B, Sengers RC, Monsieurs K, Heytens L, et al. (1993) Genetic mapping of the beta 1- and gamma-subunits of the human skeletal muscle L-type voltage-dependent calcium channel on

- chromosome 17q and exclusion as candidate genes for malignant hyperthermia susceptibility. *Hum Mol Genet* 2: 863-868.
43. Monnier N, Procaccio V, Stieglitz P, Lunardi J (1997) Malignant-hyperthermia susceptibility is associated with a mutation of the alpha 1-subunit of the human dihydropyridine-sensitive L-type voltage-dependent calcium-channel receptor in skeletal muscle. *Am J Hum Genet* 60: 1316-1325.
44. Zhang M, Wei J, Li Y, Shan H, Yan R, et al. (2014) Novel distribution of calreticulin to cardiomyocyte mitochondria and its increase in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 449: 62-68.
45. Li H, Chen Q, Liu F, Zhang X, Li W, et al. (2013) Unfolded protein response and activated degradative pathways regulation in GNE myopathy. *PLoS One* 8: e58116.
46. Kumamoto T, Ito T, Horinouchi H, Ueyama H, Toyoshima I, et al. (2000) Increased lysosome-related proteins in the skeletal muscles of distal myopathy with rimmed vacuoles. *Muscle Nerve* 23: 1686-1693.
47. Blandin G, Marchand S, Charton K, Daniele N, Gicquel E, et al. (2013) A human skeletal muscle interactome centered on proteins involved in muscular dystrophies: LGMD interactome. *Skelet Muscle* 3: 3.
48. Bitoun M, Maugenre S, Jeannet PY, Lacene E, Ferrer X, et al. (2005) Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nat Genet* 37: 1207-1209.
49. Zuchner S, Nouredine M, Kennerson M, Verhoeven K, Claeys K, et al. (2005) Mutations in the pleckstrin homology domain of dynamin 2 cause dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Genet* 37: 289-294.
50. De Sandre-Giovannoli A, Chaouch M, Kozlov S, Vallat JM, Tazir M, et al. (2002) Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *Am J Hum Genet* 70: 726-736.

51. De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Cau P, Navarro C, Amiel J, et al. (2003) Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 300: 2055.
52. Gros-Louis F, Dupre N, Dion P, Fox MA, Laurent S, et al. (2007) Mutations in SYNE1 lead to a newly discovered form of autosomal recessive cerebellar ataxia. *Nat Genet* 39: 80-85.
53. Zhang Q, Bethmann C, Worth NF, Davies JD, Wasner C, et al. (2007) Nesprin-1 and -2 are involved in the pathogenesis of Emery Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity. *Hum Mol Genet* 16: 2816-2833.
54. Attali R, Warwar N, Israel A, Gurt I, McNally E, et al. (2009) Mutation of SYNE-1, encoding an essential component of the nuclear lamina, is responsible for autosomal recessive arthrogryposis. *Hum Mol Genet* 18: 3462-3469.
55. Puckelwartz MJ, Kessler EJ, Kim G, Dewitt MM, Zhang Y, et al. (2010) Nesprin-1 mutations in human and murine cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 48: 600-608.
56. Bohm J, Biancalana V, Dechene ET, Bitoun M, Pierson CR, et al. (2012) Mutation spectrum in the large GTPase dynamin 2, and genotype-phenotype correlation in autosomal dominant centronuclear myopathy. *Hum Mutat* 33: 949-959.
57. Cortese A, Tucci A, Piccolo G, Galimberti CA, Fratta P, et al. (2014) Novel CLN3 mutation causing autophagic vacuolar myopathy. *Neurology*.
58. Ohkawara B, Cabrera-Serrano M, Nakata T, Milone M, Asai N, et al. (2014) LRP4 third beta-propeller domain mutations cause novel congenital myasthenia by compromising agrin-mediated MuSK signaling in a position-specific manner. *Hum Mol Genet* 23: 1856-1868.
59. Fernandez-Valle C, Tang Y, Ricard J, Rodenas-Ruano A, Taylor A, et al. (2002) Paxillin binds schwannomin and regulates its density-dependent localization and effect on cell morphology. *Nat Genet* 31: 354-362.
60. Vaughan KT, Weber FE, Ried T, Ward DC, Reinach FC, et al. (1993) Human myosin-binding protein H (MyBP-H): complete primary sequence,

genomic organization, and chromosomal localization. Genomics 16: 34-40.

61. Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, et al. (2006) PGC-1alpha protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 16260-16265.
62. Mundel P, Heid HW, Mundel TM, Kruger M, Reiser J, et al. (1997) Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. J Cell Biol 139: 193-204.

Figure Legends

Figure 1. Integrated data mining workflow. A signature of a disease group, composed of weighted terms, is generated from statistical analyses of genes already implicated in diseases of the group. Terms come from the three main annotation groups, GO (Gene Ontology), PO (Phenotype Ontology, an aggregate of Human Phenotype Ontology and Mammalian Phenotype

Ontology) and IA (Interactions Annotation), are mined using Manteia and receive weights proportional to their enrichment in the set of genes implicated in the disease group, as compared to the set of all genes in the human genome. Weights are attributed to terms so that annotation groups contribute equally to the composition of the signature. The signature of the disease group is then used to mine the genome for additional genes. Every gene in the genome receives a score equal to the sum of weights of terms that describe the gene if they match terms that define the disease group signature, for a maximum possible score of 3000. Further filtering steps mark genes that have low relative skeletal muscle expression or are annotated with known diseases.

Figure 2. Graph representation of relationships of known genes. All known genes for the different disease groups were concurrently analyzed for matching terms in different ontologies. Nodes represent genes, and edges between two given nodes are depicted when the number of terms shared by the two connected genes is greater than a certain threshold. Edge width is proportional to the number of terms shared between two genes, and node size and color in a scale from green (lowest) to red (highest) is proportional to the number of associations of a gene in the graph. Closely related genes appear clustered together, and hubs in the graph appear centrally located. A: graph for combined terms from Gene Ontology (GO), Human Phenotype Ontology (HPO) and Interactions Annotation (IA), with a threshold of 30 matching terms. The cluster with a yellow background includes genes implicated in metabolic myopathies, the one with a red background groups congenital muscular dystrophy genes, and the cluster with a gray background represents genes associated with congenital myasthenic syndromes. B: graph for HPO terms with a threshold of 20 matching terms. C: graph for GO terms, with a threshold of 10 matching terms. Background colors correspond to clusters represented in A. D: IA terms with a threshold of 5 matching terms. The gray background highlights a cluster with gene that code subunits of cholinergic receptors, implicated in congenital myasthenic syndromes, the green one groups components of collagen VI, and the cluster with a blue background links elements of the contractile apparatus.

Figure 3. Venn diagrams of gene set overlaps. A: Venn diagram showing the overlap of training set genes between muscular dystrophies (MD), congenital myopathies (CM) and congenital muscular dystrophies (CMD). B: Venn diagram showing the overlap of genes found within the top 50 ranked candidate genes in the three disease groups.

Table 1. Breakdown of disease groups and known associated genes.

Disease group	Main diseases	Associated genes
Muscular dystrophies	Duchenne and Becker muscular dystrophies, Emery-Dreifuss muscular dystrophy, Limb-girdle muscular dystrophies	<i>ANO5, CAPN3, CAV3, DAG1, DES, DMD, DNAJB6, DPM3, DUX4, DYSF, EMD, FHL1, FKRP, FKTN, LMNA, MYOT, PABPN1, PLEC, POMGNT1, POMT1, POMT2, PTRF, SGCA, SGCB, SGCD, SGCG, SYNE1, SYNE2, TCAP, TMEM43, TNPO3, TRAPPC11, TRIM32, TTN</i>
Congenital muscular dystrophies	Merosin-deficient CMD, Dystroglycanopathies, Ulrich and Bethlem myopathies	<i>CHKB, COL6A1, COL6A2, COL6A3, DNM2, DPM2, FHL1, FKRP, FKTN, GTDC2, ISPD, ITGA7, LAMA2, LARGE, LMNA, POMGNT1, POMT1, POMT2, SEPN1, TCAP</i>
Congenital myopathies	Centronuclear myopathy, Nemaline myopathy, Central core disease	<i>ACTA1, BIN1, CCDC78, CFL2, CNTN1, DNM2, KBTBD13, KLHL40, MEGF10, MTM1, MTMR14, MYH2, MYH7, NEB, RYR1, SEPN1, STIM1, TNNT1, TPM2, TPM3, TRIM32, TTN</i>
Metabolic myopathies	Glycogen storage diseases (Pompe, McArdle), Lipid storage diseases (CPTII deficiency)	<i>ACADVL, AGL, CPT2, ENO3, GAA, GBE1, GYG1, GYS1, LDHA, LPIN1, PFKM, PGAM2, PGK1, PGM1, PHKA1, PNPLA2, PYGM, SLC22A5, SLC25A20</i>
Congenital myastenic syndromes	Acetylcholine receptor deficiency, Choline acetyl transferase deficiency, Escobar syndrome	<i>AGRN, CHAT, CHRNA1, CHRNB1, CHRND, CHRNE, CHRNG, COLQ, DOK7, DPAGT1, GFPT1, LAMB2, MUSK, RAPSN, SCN4A</i>
Myotonic syndromes	Myotonic dystrophy type 1 (Steinert disease), Schwartz-Jampel disease	<i>ATP2A1, CAV3, CNBP, DMPK, HSPG2</i>
Ion channel muscle diseases	Myotonia congenita, Hyperkalemic periodic paralysis, Paramyotonia congenita	<i>CACNA1S, CLCN1, SCN4A</i>
Vacuolar myopathies	Myopathy with excessive autophagia, Danon disease, Inclusion body myopathy with Paget disease of bone and frontotemporal dementia	<i>EPG5, GNE, LAMP2, VCP, VMA21</i>
Myofibrillar myopathies	Alpha-B-crystallin related myofibrillar myopathy, Desmin myofibrillar myopathy	<i>BAG3, CRYAB, DES, FLNC, LDB3, MYOT, SEPN1</i>

Table 2. Composition of biological processes GO terms that make up the signature of each disease group.

Disease Group	Muscle contraction	Calcium homeostasis	Muscle development	Muscle intracellular organization	Other terms	Total	Other term categories
Congenital myopathy	7	10	12	3	13	45	Cardiac development, catabolism of nucleotides
Muscular dystrophy	9	1	14	23	30	77	Glycosylation, cardiac development, cardiac contraction
Congenital muscular dystrophy	0	0	2	0	20	22	Cardiac development, glycosylation
Metabolic myopathy	1	1	0	0	73	75	Glycogen metabolism
Congenital myasthenic syndrome	2	7	18	2	64	93	Neuromuscular junction, synapses
Myotonic myopathy	7	21	11	2	9	50	Heart contraction, circulation
Ion channel muscle disease	1	4	0	0	2	7	Ion transport

Table 3. Score breakdown for training sets of congenital myopathies, muscular dystrophies and metabolic myopathies disease groups. Gene score is the sum of GO, HPO, MPO and IA scores. Relative contributions of GO, HPO, MPO and IA scores to the gene score are shown in the columns %GO, %HPO, %MPO and %IA, respectively. Training set genes without database annotation received a gene score of 0 and are not shown.

Muscular dystrophies											
Rank	Gene	Gene Score	GO score	%GO	HPO score	%HPO	MPO score	%MPO	%PO	IA score	%IA
1	<i>DMD</i>	1115	352	31.57	180	16.14	375	33.63	49.78	208	18.65
2	<i>TTN</i>	1064	520	48.87	224	21.05	208	19.55	40.60	112	10.53
3	<i>LMNA</i>	997	208	20.86	361	36.21	284	28.49	64.69	144	14.44
4	<i>TCAP</i>	915	508	55.52	209	22.84	86	9.40	32.24	112	12.24
5	<i>DES</i>	814	252	30.96	195	23.96	223	27.40	51.35	144	17.69
6	<i>CAV3</i>	777	384	49.42	181	23.29	196	25.23	48.52	16	2.06
11	<i>SYNE2</i>	599	340	56.76	83	13.86	16	2.67	16.53	160	26.71
13	<i>SYNE1</i>	577	236	40.90	87	15.08	110	19.06	34.14	144	24.96
17	<i>FKRP</i>	560	48	8.57	333	59.46	163	29.11	88.57	16	2.86
18	<i>DAG1</i>	553	288	52.08	0	0.00	233	42.13	42.13	32	5.79
19	<i>PLEC</i>	552	140	25.36	65	11.78	171	30.98	42.75	176	31.88
20	<i>CAPN3</i>	539	176	32.65	123	22.82	176	32.65	55.47	64	11.87
22	<i>TRIM32</i>	518	92	17.76	299	57.72	95	18.34	76.06	32	6.18
23	<i>SGCB</i>	518	112	21.62	245	47.30	145	27.99	75.29	16	3.09
24	<i>SGCA</i>	503	136	27.04	163	32.41	156	31.01	63.42	48	9.54
25	<i>EMD</i>	487	196	40.25	180	36.96	79	16.22	53.18	32	6.57
28	<i>SGCG</i>	471	112	23.78	136	28.87	207	43.95	72.82	16	3.40
32	<i>MYOT</i>	446	176	39.46	270	60.54	0	0.00	60.54	0	0.00
36	<i>DYSF</i>	416	36	8.65	155	37.26	161	38.70	75.96	64	15.38
80	<i>POMT1</i>	278	96	34.53	116	41.73	18	6.47	48.20	48	17.27
89	<i>FHL1</i>	270	32	11.85	238	88.15	0	0.00	88.15	0	0.00
92	<i>SGCD</i>	266	112	42.11	0	0.00	138	51.88	51.88	16	6.02
94	<i>POMGNT1</i>	265	76	28.68	92	34.72	81	30.57	65.28	16	6.04
114	<i>ANO5</i>	243	0	0.00	227	93.42	0	0.00	93.42	16	6.58
130	<i>FKTN</i>	226	84	37.17	112	49.56	14	6.19	55.75	16	7.08
193	<i>PABPN1</i>	181	40	22.10	77	42.54	0	0.00	42.54	64	35.36
262	<i>POMT2</i>	154	88	57.14	0	0.00	18	11.69	11.69	48	31.17
282	<i>PTRF</i>	149	16	10.74	124	83.22	8	5.37	88.59	0	0.00
443	<i>DPM3</i>	112	80	71.43	0	0.00	0	0.00	0.00	32	28.57
	Average	502.24	170.21	32.68	154.31	34.51	115.90	20.30	54.81	61.79	12.48
Congenital myopathies											
Rank	Gene	Gene Score	GO score	%GO	HPO score	%HPO	MPO score	%MPO	%PO	IA score	%IA
1	<i>TTN</i>	1309	641	48.97	206	15.74	315	24.06	39.80	147	11.23
2	<i>ACTA1</i>	1291	555	42.99	441	34.16	169	13.09	47.25	126	9.76
3	<i>RYR1</i>	1162	349	30.03	292	25.13	332	28.57	53.70	189	16.27
4	<i>NEB</i>	1146	364	31.76	370	32.29	160	13.96	46.25	252	21.99
5	<i>TPM3</i>	1090	425	38.99	371	34.04	0	0.00	34.04	294	26.97
7	<i>TPM2</i>	998	393	39.38	311	31.16	0	0.00	31.16	294	29.46
11	<i>MYH7</i>	917	635	69.25	198	21.59	0	0.00	21.59	84	9.16

16	<i>TRIM32</i>	758	234	30.87	279	36.81	203	26.78	63.59	42	5.54
22	<i>MTM1</i>	702	53	7.55	211	30.06	354	50.43	80.48	84	11.97
27	<i>TNNT1</i>	663	333	50.23	141	21.27	0	0.00	21.27	189	28.51
33	<i>DNM2</i>	618	89	14.40	200	32.36	224	36.25	68.61	105	16.99
44	<i>MYH2</i>	527	443	84.06	0	0.00	0	0.00	0.00	84	15.94
55	<i>BIN1</i>	454	101	22.25	209	46.04	60	13.22	59.25	84	18.50
103	<i>SEPN1</i>	333	0	0.00	0	0.00	333	100.00	100.00	0	0.00
209	<i>CNTN1</i>	216	34	15.74	141	65.28	20	9.26	74.54	21	9.72
313	<i>STIM1</i>	170	122	71.76	33	19.41	15	8.82	28.24	0	0.00
354	<i>MTMR14</i>	160	53	33.13	0	0.00	65	40.63	40.63	42	26.25
	Average	736.12	283.76	37.14	200.18	26.20	132.35	21.47	47.67	119.82	15.19
Metabolic myopathies											
Rank	Gene	Gene Score	GO score	%GO	HPO score	%HPO	MPO score	%MPO	%PO	IA score	%IA
1	<i>GAA</i>	875	410	46.86	136	15.54	309	35.31	50.86	20	2.29
2	<i>PFKM</i>	840	225	26.79	162	19.29	353	42.02	61.31	100	11.90
3	<i>PHKA1</i>	831	395	47.53	236	28.40	150	18.05	46.45	50	6.02
4	<i>GBE1</i>	822	330	40.15	59	7.18	333	40.51	47.69	100	12.17
6	<i>ACADVL</i>	747	140	18.74	275	36.81	222	29.72	66.53	110	14.73
7	<i>GYS1</i>	746	370	49.60	0	0.00	296	39.68	39.68	80	10.72
8	<i>PGM1</i>	709	450	63.47	159	22.43	0	0.00	22.43	100	14.10
12	<i>AGL</i>	666	480	72.07	136	20.42	0	0.00	20.42	50	7.51
14	<i>PYGM</i>	624	385	61.70	159	25.48	0	0.00	25.48	80	12.82
19	<i>GYG1</i>	590	480	81.36	0	0.00	0	0.00	0.00	110	18.64
24	<i>LDHA</i>	575	200	34.78	190	33.04	95	16.52	49.57	90	15.65
25	<i>CPT2</i>	571	205	35.90	316	55.34	0	0.00	55.34	50	8.76
28	<i>PGAM2</i>	551	265	48.09	216	39.20	0	0.00	39.20	70	12.70
37	<i>PGK1</i>	477	260	54.51	157	32.91	0	0.00	32.91	60	12.58
47	<i>ENO3</i>	441	245	55.56	106	24.04	0	0.00	24.04	90	20.41
77	<i>PNPLA2</i>	354	10	2.82	0	0.00	334	94.35	94.35	10	2.82
84	<i>LPIN1</i>	344	25	7.27	141	40.99	158	45.93	86.92	20	5.81
87	<i>SLC25A20</i>	340	190	55.88	120	35.29	0	0.00	35.29	30	8.82
116	<i>SLC22A5</i>	311	60	19.29	123	39.55	108	34.73	74.28	20	6.43
	Average	600.74	269.74	43.28	141.63	25.05	124.11	20.89	45.93	65.26	10.78

Table 4 - Top 8 ranked candidate genes for each disease group. Candidate genes are not associated with disease (as per annotation in OMIM) and are expressed in skeletal muscle with at least 10% of the maximum expression in any tissue, except for congenital myasthenic syndromes, where there was no expression filtering.

Muscular dystrophies			
Rank	Gene	Name	Score
33	<i>ITGB1</i>	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	437
42	<i>TMOD1</i>	tropomodulin 1	391
48	<i>MYL1</i>	myosin, light chain 1, alkali; skeletal, fast	368
53	<i>TNNI1</i>	troponin I type 1 (skeletal, slow)	356
62	<i>MYH4</i>	myosin, heavy chain 4, skeletal muscle	332
67	<i>UTRN</i>	utrophin	325
72	<i>TNNC2</i>	troponin C type 2 (fast)	304
81	<i>SRF</i>	serum response factor (c-fos serum response element-binding transcription factor)	278
Congenital muscular dystrophies			
Rank	Gene	Name	Score
36	<i>GCNT4</i>	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 4, core 2	458
44	<i>GALNT1</i>	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1 (GalNAc-T1)	444
47	<i>ST8SIA2</i>	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 2	444
51	<i>OGT</i>	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase	444
53	<i>GALNT2</i>	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 (GalNAc-T2)	444
55	<i>SDF2</i>	stromal cell-derived factor 2	443
57	<i>ST8SIA6</i>	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 6	442
62	<i>MGAT1</i>	mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase	426
Congenital myopathies			
Rank	Gene	Name	Score
17	<i>MYH4</i>	myosin, heavy chain 4, skeletal muscle	755
29	<i>MYL1</i>	myosin, light chain 1, alkali; skeletal, fast	640
31	<i>TNNI1</i>	troponin I type 1 (skeletal, slow)	634
37	<i>RYR3</i>	ryanodine receptor 3	587
38	<i>TMOD1</i>	tropomodulin 1	570
43	<i>TNNC2</i>	troponin C type 2 (fast)	527
51	<i>MYH1</i>	myosin, heavy chain 1, skeletal muscle, adult	458
58	<i>MYL6B</i>	myosin, light chain 6B, alkali, smooth muscle and non-muscle	438
Metabolic myopathies			
Rank	Gene	Name	Score
10	<i>PRKAA2</i>	protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit	672
18	<i>PPP1R3C</i>	protein phosphatase 1, regulatory subunit 3C	593
21	<i>MTOR</i>	mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)	588
26	<i>PRKAB2</i>	protein kinase, AMP-activated, beta 2 non-catalytic subunit	560

39	<i>ACACB</i>	acetyl-CoA carboxylase beta	470
40	<i>PHKG1</i>	phosphorylase kinase, gamma 1 (muscle)	470
44	<i>PPARGC1A</i>	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha	459
48	<i>GSK3A</i>	glycogen synthase kinase 3 alpha	441
Congenital myasthenic syndromes			
Rank	Gene	Name	Score
11	<i>CHRNA4</i>	cholinergic receptor, nicotinic, beta 4 (neuronal)	817
15	<i>CHRNA6</i>	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 6 (neuronal)	680
19	<i>CHRNA3</i>	cholinergic receptor, nicotinic, beta 3 (neuronal)	636
21	<i>CACNA2D2</i>	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 2	628
22	<i>CHRNA9</i>	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 9 (neuronal)	616
40	<i>ITGB1</i>	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	441
52	<i>CHRNA10</i>	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 10 (neuronal)	413
61	<i>HTR3B</i>	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3B, ionotropic	399
Ion channel muscle diseases			
Rank	Gene	Name	Score
12	<i>SCN3A</i>	sodium channel, voltage-gated, type III, alpha subunit	1416
13	<i>CACNB1</i>	calcium channel, voltage-dependent, beta 1 subunit	1378
40	<i>RYR3</i>	ryanodine receptor 3	1019
52	<i>CACNG1</i>	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 1	936
55	<i>CACNA2D1</i>	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 1	930
63	<i>CACNA2D3</i>	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 3	915
70	<i>KCNQ5</i>	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 5	888
71	<i>KCNA7</i>	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 7	888
Myotonic syndromes			
Rank	Gene	Name	Score
7	<i>CASQ1</i>	calsequestrin 1 (fast-twitch, skeletal muscle)	1079
8	<i>RYR3</i>	ryanodine receptor 3	954
15	<i>JPH1</i>	junctophilin 1	806
21	<i>MYL1</i>	myosin, light chain 1, alkali; skeletal, fast	703
26	<i>CAMK2D</i>	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta	658
32	<i>SYPL2</i>	synaptophysin-like 2	611
34	<i>ITGB1</i>	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	610
47	<i>MYH4</i>	myosin, heavy chain 4, skeletal muscle	559
Myofibrillar myopathies			
Rank	Gene	Name	Score
27	<i>MYL1</i>	myosin, light chain 1, alkali; skeletal, fast	984
33	<i>MYH4</i>	myosin, heavy chain 4, skeletal muscle	924
35	<i>MYL12B</i>	myosin, light chain 12B, regulatory	921
41	<i>TNNI1</i>	troponin I type 1 (skeletal, slow)	909
42	<i>TNNC2</i>	troponin C type 2 (fast)	909
50	<i>PDLIM3</i>	PDZ and LIM domain 3	862
51	<i>MYO18B</i>	myosin XVIIIIB	845
52	<i>PDLIM5</i>	PDZ and LIM domain 5	844
Vacuolar myopathies			
Rank	Gene	Name	Score

4	<i>CD63</i>	CD63 molecule	1160
8	<i>AP1G1</i>	adaptor-related protein complex 1, gamma 1 subunit	1006
18	<i>VAMP7</i>	vesicle-associated membrane protein 7	1006
20	<i>MARCH8</i>	membrane-associated ring finger (C3HC4) 8, E3 ubiquitin protein ligase	1006
22	<i>ZNRF1</i>	zinc and ring finger 1, E3 ubiquitin protein ligase	1006
26	<i>AP1M1</i>	adaptor-related protein complex 1, mu 1 subunit	1006
27	<i>AP1B1</i>	adaptor-related protein complex 1, beta 1 subunit	1006
40	<i>ABCC4</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4	817

Table 5 - Candidate genes within genomic regions linked to myopathies and related diseases.

Linked region	Phenotypes and associated disease symbols	Candidate genes
1q42	Congenital muscular dystrophy with merosin deficiency - MDC1B	<i>OBSCN</i> , <i>GALNT2</i>
3p22.2-p21.32	Hyalin body myopathy - HBM	<i>XIRP1</i>
3p23-21	Congenital muscle dystrophy with joint hyperlaxity	<i>XIRP1</i>
7q21-q22	Malignant hyperthermia susceptibility 3 - MHS3	<i>CACNA2D1</i>
17q11.2-q24	Malignant hyperthermia susceptibility 2 - MHS2	<i>SDF2</i> , <i>SYNRG</i> , <i>CACNB1</i> , <i>CACNG1</i>
19p13	Muscular dystrophy, autosomal dominant, with rimmed vacuoles - MDRV	<i>CALR</i> , <i>PRKACA</i> , <i>AP1M1</i>

Table 6 – Resulting 29 variants after filtration of exome data of a patient affected with nemaline myopathy. An initial 86,333 variants were reduced to 250 using criteria on the variant level, which resulted in the 29 variants after exclusion of genes already ascribed to diseases and based on specificity of skeletal muscle expression. Variants are then sorted according to the gene ranking calculated for the congenital myopathy group.

CM Rank	Flag	VariantID	State	Gene	Spec%
208	candidate	12_120660719_C_T	Heterozygous	PXN	22
355	candidate	1_203139425_T_A	Heterozygous	MYBPH	16
446	candidate	4_23803919_C_T	Heterozygous	PPARGC1A	30
586	candidate	5_150028613_T_C	Homozygous	SYNPO	100
610	candidate	5_138160333_G_A	Heterozygous	CTNNA1	34
786	candidate	10_115374035_A_T	Heterozygous	NRAP	100
856	candidate	1_87208087_A_G	Heterozygous	SH3GLB1	100
951	candidate	6_36076169_A_G	Heterozygous	MAPK14	18
1044	candidate	11_1901435_C_T	Heterozygous	LSP1	36
1044	candidate	11_1901435_C_T	Heterozygous	LSP1	36
1199	candidate	9_125863896_C_T	Heterozygous	RABGAP1	38
1758	candidate	12_95604081_G_A	Heterozygous	FGD6	17
1902	candidate	14_103420979_G_A	Heterozygous	CDC42BPB	32
1976	candidate	9_124522285_C_T	Heterozygous	DAB2IP	43
2066	candidate	22_19865895_A_C	Heterozygous	TXNRD2	16

2231	candidate	5_95116054_A_T	Heterozygous	RHOBTB3	32
2245	candidate	22_41652800_A_C	Heterozygous	RANGAP1	25
2263	candidate	2_159477732_C_A	Heterozygous	PKP4	10
2360	candidate	2_152980460_G_T	Heterozygous	STAM2	26
2679	candidate	1_46472006_A_G	Heterozygous	MAST2	100
3075	candidate	10_68138967_C_T	Heterozygous	CTNNA3	19
3434	candidate	7_156976610_G_A	Heterozygous	UBE3C	100
3530	candidate	9_32407367_C_T	Heterozygous	ACO1	16
3627	candidate	1_19453077_C_T	Heterozygous	UBR4	100
4029	candidate	20_35632140_C_G	Heterozygous	RBL1	40
4235	candidate	22_50356432_A_T	Heterozygous	PIM3	47
4375	candidate	11_75115893_C_A	Heterozygous	RPS3	14
5062	candidate	1_204494668_G_A	Heterozygous	MDM4	47
5084	candidate	7_21469915_C_T	Heterozygous	SP4	36