

Eixo Temático ET-01-004 - Áreas de Atuação do Biólogo

## AVANÇOS NO DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE DISTROFIAS RELACIONADAS À JUNÇÃO NEUROMUSCULAR: UM ENFOQUE MOLECULAR

Yorran Hardman A. Montenegro<sup>1</sup>, Aline Ferreira de Araújo Jerônimo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Paraíba, e-mail: yorran\_montenegro@hotmail.com.

<sup>2</sup>Fisioterapeuta Mestre em Saúde Pública, Universidade Estadual da Paraíba, e-mail: aline.fje@gmail.com.

### RESUMO

A junção neuromuscular é uma região especializada na transmissão do potencial de ação do nervo periférico para a musculatura esquelética. Visto que se faz necessário entender os mecanismos atuantes na transmissão de informações neuromusculares e as patologias associadas a esse processo, o presente trabalho visa identificar e sintetizar os avanços recentes no campo genético e científico em relação ao tratamento de distrofias musculares associadas ao cromossomo X, distrofias autossômicas dominantes com fenótipo único e deleções esporádicas de DNA mitocondrial. Trata-se de uma revisão bibliográfica realizada durante o período de 08 a 12 de março de 2018, nas bases de dados ScienceDirect e NCBI, utilizando combinações de palavras-chave, sendo estas: “Neuromuscular dystrophy”, “Autoimmune disorders”, “Genetic and neuromuscular dystrophy”. Observou-se nos 10 artigos encontrados que as novas técnicas moleculares têm ganhado sua importância no contexto clínico por sua eficácia em patologias associadas a distúrbios moleculares e genéticos, se fazendo necessária uma análise cuidadosa por parte dos pesquisadores nas contribuições do conhecimento molecular e das técnicas de edição gênica no contexto atual.

**Palavras-chave:** Distúrbios neuromusculares; Distrofia; Doença autoimune.

### INTRODUÇÃO

A junção neuromuscular é uma região especializada na transmissão do potencial de ação do nervo periférico para a musculatura esquelética (THORNTON et al., 2017). Dada sua importância fundamental para o conhecimento acerca da natureza fisiológica humana, é necessário uma compreensão apurada da sua funcionalidade, e, principalmente, quais patologias estão associadas a uma desregulação nessa ferramenta fisiológica.

No presente estudo será demonstrado de forma pontual quais são as desordens, patologias e problemáticas mais comuns encontradas quanto às Junções Neuromusculares (JNM).

Entre as principais patologias associadas às JNM estão às doenças autoimunes que atingem cerca de 8,5 milhões de Americanos anualmente causando imobilidade e desordens quanto aos movimentos musculares (DALAKAS, 2004).

Outros fatores também se relacionam diretamente com as desordens nas junções neuromusculares, causando distrofias musculares. Historicamente, o termo *distrofia muscular* foi usado para descrever miopatias genéticas que sofrem patologias histológicas como as fibroses, variação no tamanho da fibra muscular e desordens musculares internas nas trocas de informação sistema nervoso-musculo (THORNTON et al., 2017).

A complexidade e magnitude da associação entre genética e distrofias é um forte ponto de discussão entre os ciclos acadêmicos de pesquisa. Há fatores hereditários e genes multados que influenciam diretamente no diagnóstico clínico (THORNTON et al., 2017). Uma das importâncias neste diagnóstico é a compreensão das vias metabólicas que regulam os substratos enzimáticos nas reações em cadeia para a manutenção neuromuscular, e, a partir dessa

compressão, é possível realizar a classificação adequada da distrofia em questão (SHIEH, 2013).

Atentando para a importância primordial da melhor compressão dos avanços recentes quanto ao diagnóstico, tratamento e prognóstico para pacientes que sofrem com síndromes e distrofias associadas às JNM, objetivamos identificar e sintetizar os avanços recentes no campo genético e científico em relação ao diagnóstico e tratamento de distrofias musculares associadas ao cromossomo X, distrofias autossômicas dominantes com fenótipo único e deleções esporádicas de DNA mitocondrial.

## METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão de literatura cuja pesquisa dos artigos foi realizada durante o período de 8 a 12 de março de 2018, buscando responder à seguinte pergunta condutora: quais os principais avanços e conquistas da ciência para o diagnóstico e tratamento quanto às doenças neuromusculares que afetam a atividade nas JNM?

As bases de dados utilizadas na presente revisão sistemática foram: SCIENCE DIRECT e *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), sendo esta escolha justificada pelo grande número de periódicos encontrados nas mesmas, na área de biologia celular, molecular e saúde. Para a busca dos artigos, foram utilizadas as seguintes palavras-chave: “Neuromuscular dystrophy”, “Autoimmune disorders” e “Genetic”, de modo que os descritores “Neuromuscular dystrophy” e “Genetic” foram também combinados utilizando o operador boleado “AND”.

Nesse contexto, optou-se por selecionar trabalhos com delineamento experimental publicados entre os anos de 2015 e 2018, garantindo assim um levantamento bibliográfico atualizado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionados 10 artigos para a revisão, sendo estes encontrados na relação da Tabela 1.

**Tabela 1.** Relação de artigos selecionados.

ARTIGO	AUTOR	ANO
Myotonic dystrophy: approach to therapy.	THORNTON et al.	2017
Intravenous immunoglobulin in autoimmune neuromuscular diseases.	DALAKAS	2014
Diabetes in Kearns-Sayre Syndrome: More Common than Anticipated.	FINSTERER; FRANK	2015
Mitochondrial dysfunction in myotonic dystrophy type 1.	GRAMEGNA et al.	2018
Molecular and clinical spectrum of type 1 myotonic dystrophy.	KUMAR et al.	2018
Routine echocardiography in patients with myotonic dystrophy type 1.	PAUNIC et al.	2017
CRISPR/Cas9-Mediated deletion of CTG expansions recovers normal phenotype in myogenic cells derived from myotonic dystrophy 1 patients.	PROVENZANO et al.	2017
Duchenne muscular dystrophy in a female with compound heterozygous contiguous exon deletions.	TAKESHITA al.	2017
Early involvement of the supinator muscle in Duchenne muscular dystrophy.	TARTAGLIONE et al.	2018
MELAS and Kearns-Sayre overlap syndrome due to the mtDNA m. A3243G mutation and large-scale mtDNA deletions.	YU et al.	2016

(Fonte: Dados da pesquisa)

### ***Distrofias musculares recessivas ligadas ao X – Distrofia Muscular de Duchenne***

A distrofia de Duchenne (DD) está associada a uma mutação no gene Xp21.2 afetando um número de homens que chega a aproximadamente 1:3.500, causando problemas neuromusculares progressivos. Como se não bastasse, os indivíduos portadores dessa patologia acabam abrindo uma janela passiva a mutações que podem causar a variância da DD: a Distrofia Muscular de Becker. O que une ambas são as mutações ocasionadas pelas deleções em regiões de exons específicos (60%-70% dos casos) ou até mesmo duplicações no material genético que podem ocasionar o quadro sintomático (5%-10% dos casos). O restante está relacionado com mutações pontuais ou a substituição de bases nucleotídicas no gene da distrofina (TAKESHITA et al., 2017).

O gene da distrofina é um dos maiores genes humano conhecido com um total de 79 exons, chegando a um tamanho aproximado de 2000 Kb. Esse gene é responsável pela produção da proteína distrofina que funciona como um componente primordial na proteção e estabilidade de células musculares atuando como ancorador para o citoesqueleto no plasma da membrana celular. Sem esse importante componente, as membranas tornam-se extremamente permeáveis aos componentes extracelulares e podem chegar a morrer (EBRAHIMZADEH-VERSAL et al., 2018).

Tartaglione et al. (2018) em seu estudo de caso relataram as anomalias encontradas no músculo supinador quanto aos sinais projetados pelas JNM e a atividade de supinação desse músculo, utilizando menos de 75% da atividade de força muscular do supinador. Este estudo envolveu jovens de 5 a 15 anos e a progressão do potencial de ação muscular. Este simples relato acaba demonstrando um dos exemplos na progressão de sintomas associados às desordens no gene da distrofina.

O diagnóstico precoce para essa patologia é essencial para a manutenção de vida dos indivíduos portadores. As novas tecnologias no âmbito genético têm sido desenvolvidas para que haja um diagnóstico precoce e uma melhor prospecção para a qualidade de vida desses pacientes. Um dos exemplos mais comuns é a utilização de biossensores para o diagnóstico precoce dessas patologias, uma vez que possuem uma alta sensibilidade e especificidade para o padrão proteico e imune da doença (DALAKAS, 2004).

### ***Distrofias autossômicas dominantes com fenótipo único - Distrofia miotônica***

A Distrofia Miotônica (DM) é subdividida em dois tipos, sendo a do tipo I a forma mais comum de distrofia autossomal dominante em adultos. Esta é causada por uma mutação localizada na extremidade 3' do gene miotonina proteína kinase que desestabiliza o gene pela adição de repetições em *tanden* de CTG de localização no cromossomo 19q13.3 (KUMAR et al., 2018).

Entre os principais problemas enfrentados pelos pacientes através dessa distrofia, há, principalmente, uma desordem multissistêmica afetando as cadeias musculares, olhos, sistema endócrino, sistema nervoso central e periférico e coração. A maioria dos portadores acabam falecendo por problemas cardiovasculares causados conduções neuromusculares anormais e até mesmo insuficiência cardíaca. Paunic et al. (2017) identificaram a presença de um prolapso na valva mitral em 23% dos casos em suas populações de estudo.

O tipo 2 de Distrofia Miotônica é conhecido por uma expansão intrônica de sequências CCTG em um gene conhecido como *CCHC-type zinc finger* codificador da proteína *nucleic acid binding protein* (CNBP). Sua sintomatologia é parecida com a DM1, o que subdivide ambas em grupos diferenciados é o ponto de mutação. Vale salientar que geralmente o quadro de resposta ao estímulo neuromuscular é comprometido em ambos os casos (KUMAR et al., 2018).

Além das JNM afetadas e sistema nervoso acometido por uma desregulação, a atividade mitocondrial também é afetada, especialmente na produção de fosfocreatina-fosfatase, indicando uma baixa produção de ATP mitocondrial, causando uma baixa na atividade mitocondrial dos pacientes acometidos (GRAMEGNA et al., 2018).

As novas tecnologias têm entrado no âmbito hospitalar a fim de buscar formas de tratamento eficazes contra anomalias gênicas. Pesquisas têm sido realizadas buscando possíveis candidatos terapêuticos e dentre estes encontram-se siRNA (*small interference RNA*) utilizados para não permitir a tradução ou expressividade de mRNA (RNA mensageiro) defeituosos gerados pelos genes multados. Outra tecnologia de interferência é a utilização de oligonucleotídeos *anti-sense* para o silenciamento no mRNA mutante através de regiões-alvo específicas denominadas de repetições CAG (THORNTON et al., 2017).

O destaque especial para terapias gênicas utilizadas em casos de DM vai para a técnica CRISPR/Cas9 utilizada hoje para a edição gênica direta no DNA do paciente. Esta técnica permite, com a utilização de enzimas específicas, deletar as regiões repetidas em *tanden* do gene mutante recuperando o fenótipo normal dos pacientes com DM1. Esse experimento foi realizado por Provenzano et al. (2017) e conseguiram reestabelecer a expressão gênica normal da proteína (Fig. 01) com as deleções das áreas afetadas (setas vermelhas: células dos pacientes não tratados *in vitro*, setas verdes: células dos pacientes que sofreram deleção pela CRISPR/Cas9).

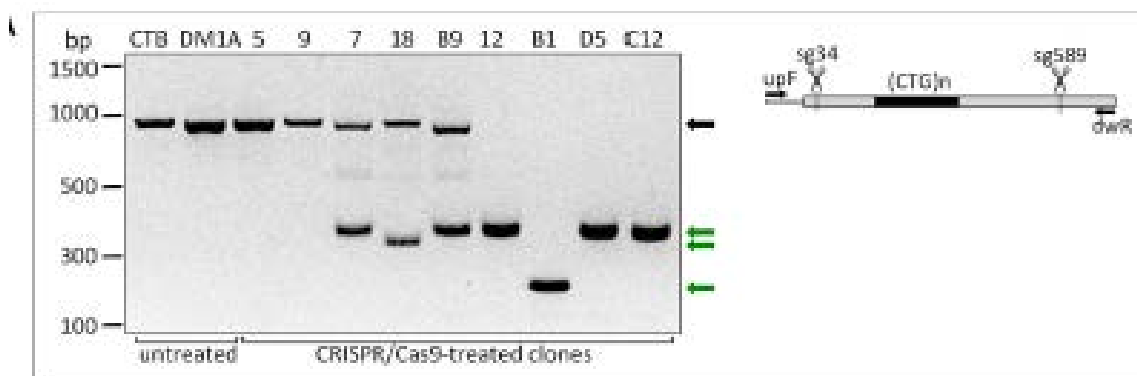


Figura 1. PCR. Fonte: Provenzano et al. (2017)

### ***Deleções esporádicas de DNA mitocondrial (mtDNA) - Síndrome de Kearns-Sayre (SKS)***

Quando falamos sobre patologias associadas a mutações no mtDNA não temos como dimensionar a escala monstruosa de possibilidades ocasionadas por mutações pontuais nesse pequeno DNA. Um importante ponto de discussão sobre a SKS é a pouca informação clínica publicada em periódicos científicos que possa ser considerada como “novidade”, e isso é preocupante.

Tem-se descoberto que pacientes acometidos com SKS revelam mutações pontuais geralmente associadas ao tRNA (RNA transportador) responsável pela transferência de aminoácidos na produção das proteínas. Quando nos portamos aos efeitos que essa mutação pode causar fenotipicamente, observamos em portadores uma oftalmoplegia ou uma retinopatia pigmentar como característica progressiva, acompanhado com sintomáticas de ataxia cerebelar, bloqueio cardíaco e elevadas concentrações de proteínas no fluido cerebrospinal (YU et al., 2016).

Kabunga et al. (2015) observaram de forma atenuada o que denominaram de “constelação de arritmias cardíacas” incluindo uma progressão acentuada de sua condição sistêmica ocasionando uma taquicardia ventricular.

Josef Finsterer em uma carta para a Revista *Cardian Diabetes Association* (2015) relatou que a predisposição desses indivíduos para Diabetes era extremamente comum em uma associação quase intrínseca com os problemas cardíacos. Como se ocasionasse um efeito em cascata.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de poder através de uma análise fenotípica adicionada com um diagnóstico molecular elucidar algum defeito proteico associado à patologias neuromusculares, pouco se têm visto sobre formas de aplicabilidade da engenharia genética para tratamento dessas doenças. Acredita-se que as novas tecnologias têm evoluído a passos largos para um dia solidificar o tratamento molecular, no entanto, seus impasses como a falta de investimento por parte dos governos na implementação de novas tecnologias de diagnóstico e tratamento, têm gerado atrasos significativos no quadro de tratamento de patologias.

Espera-se que a padronização de técnicas moleculares possa auxiliar na melhora de vida dos portadores de doenças associadas a defeitos gênicos. É de se esperar que o quadro de resoluções e padronização laboratorial possa ser efetuado e aplicado à sociedade o quanto antes.

## REFERÊNCIAS

- DALAKAS, M. C.. Intravenous immunoglobulin in autoimmune neuromuscular diseases. **Clinician's Corner**, v. 293, n. 19, p. 2567-2575, 2004.
- FINSTERER, J.; FRANK, M. Diabetes in Kearns-Sayre Syndrome: More common than anticipated. **Canadian Journal of Diabetes**, v. 39, n. 4, p.253-253, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcjd.2014.12.003>
- GRAMEGNA, L. L. et al. Mitochondrial dysfunction in myotonic dystrophy type 1. **Neuromuscular Disorders**, v. 28, n. 2, p. 144-149, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2017.10.007>
- KUMAR, A.; AGARWAL, S.; PRADHAN, S. Molecular and clinical spectrum of type 1 myotonic dystrophy. **Gene Reports**, v. 11, p. 34-41, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.genrep.2018.01.006>
- PAUNIC, T. et al. Routine echocardiography in patients with myotonic dystrophy type 1. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 80, n. 7, p. 408-412, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcma.2017.04.004>
- PROVENZANO, C. et al. CRISPR/Cas9-Mediated deletion of CTG expansions recovers normal phenotype in myogenic cells derived from myotonic dystrophy 1 patients. **American Society of Gene & Cell Therapy**, v. 9, p. 337-348, 2017.
- TAKESHITA, E. et al. Duchenne muscular dystrophy in a female with compound heterozygous contiguous exon deletions. **Neuromuscular Disorders**, v. 27, n. 6, p. 569-573, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2017.03.011>
- TARTAGLIONE, T. et al. Early involvement of the supinator muscle in Duchenne Muscular Dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, v. 28, n. 1, p. 62-63, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2017.09.011>
- THORNTON, C.; WANG, E.; CARRELL, E. M. Myotonic dystrophy: approach to therapy. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 44, p. 135-140, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2017.03.007>
- YU, N. et al. MELAS and Kearns-Sayre overlap syndrome due to the mtDNA m. A3243G mutation and large-scale mtDNA deletions. **Eneurologicalsci**, v. 4, p. 15-18, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ensci.2016.04.006>