



Splaiul Independenței 99-101, Sector 5,
050096 București, ROMANIA
Tel.: +40-21-319.27.32; 319.27.33; 319.45.30; 319.27.34;
Fax.: +40-21-319.45.28; 319.27.34
E-mail: info@vbabes.ro

MINISTERUL SANATATII
INSTITUTUL NATIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE IN DOMENIUL PATOLOGIEI SI
STIINTELOR BIOMEDICALE
"VICTOR BABEȘ"

IDENTIFICARE DELETHI SI DUPLICATII IN DIFERITE GENE IMPLICATE IN DISTROFII MUSCULARE PRIN TEHNICA MLPA

Modificările în gene conduc la apariția de proteine anormale, care produc aproximativ 85% din bolile genetice cunoscute. Tehnica **MLPA** (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) este una dintre cele mai eficiente metode de analiză genetică a mutațiilor mari de tipul delețiilor și duplicațiilor în diferite gene implicate în distrofii musculare.

Gene care pot fi analizate:

Gena	Boala asociată	Pret analiza
<i>DMD</i>	Distrofie musculară Duchenne/Becker	800 Lei
<i>CAPN3</i>	Distrofie musculară forma centurilor 2A (calpainopatie)	800 Lei
<i>Cav3</i>	Distrofie musculară forma centurilor 1C (caveolinopatie)	800 Lei
<i>DYSF</i>	Distrofie musculară forma centurilor 2B (disferlinopatie)	800 Lei
<i>SGCA</i>	Distrofie musculară forma centurilor 2D (α -sarcoglicanopatie)	800 Lei
<i>SGCB</i>	Distrofie musculară forma centurilor 2E (β -sarcoglicanopatie)	
<i>SGCG</i>	Distrofie musculară forma centurilor 2C (γ -sarcoglicanopatie)	

DISTROFINOPATIILE (DISTROFIA MUSCULARA DUCHENNE SI DISTROFIA MUSCULARA BECKER) OMIM #310200, #300376

Caracteristici: *Distrofia musculară Duchenne (DMD)* este cea mai comună formă de distrofie musculară cu o incidență de 1 la 3500 băieți. Deși boala există încă de la naștere, ea devine simptomatică în jurul vârstei de 3-5 ani (Emery AE., 1991), prin afectarea musculaturii centurii pelviene și a celei scapulare. Între 2 și 5 ani, bolnavii încep să prezinte semne de oboseală și slăbiciune musculară, căderi frecvente, și dificultăți de mers la urcatul scării. Până la această vârstă ridicarea în ortostatism se face prin sprijin pe ambele mâini, extensia brațelor și împingerea trunchiului în sus, urmată de ridicarea corpului cu sprijinul mâinilor pe coapse - semnul Gowers.

Simptomele *distrofiei musculare Becker (BMD)* sunt similare cu cele ale distrofiei musculare Duchenne dar boala debutează mai târziu și progresează într-un ritm mai lent.

Cardiomiopatia dilatativă a fost observată la aproape toți pacienții de sex masculin afectați cât și la multe femei purtătoare.

Incidență: DMD 1 la 3500 băieți; BMD 1 la 19000 băieți

Modul de transmitere ereditară: x-linka; La o treime din cazuri sunt mutații de novo.

Cauze: Mutații patogene în gena *DMD* care codifică proteina citoscheletală - distrofina.

Există mai multe tipuri de mutații care pot afecta funcția distrofinei:

- delețiile - dacă unul sau mai mulți exoni ai genei lipsesc
- duplicațiile - dacă o parte a genei este repetată
- mutațiile punctiforme - dacă o singură pereche de baze este schimbată
- inserții, microdeleții, etc.

Cele mai frecvente mutații aparute în gena *DMD* sunt de tipul delețiilor (65-70%), duplicațiilor 5% și mutațiilor punctiforme (35%). Delețiile și duplicațiile pot apărea oriunde în gena, dar sunt mai concentrate între exonii 45-55 și exonii 2-10, cunoscute ca zonele "hot spot" ale genei.

Ipo-teza cadrului de citire propu-sa de Monaco A.P. si col., in anul 1988 explica aparitia celor doua fenotipuri DMD si DMB, rezultate din producerea unor mutatii in aceea-si gena. Conform acestei teorii, mutatiile pot avea diferite efecte asupra cadrului de citire al mesajului genetic. Mutatiile care deplaseaza cadrul de citire (mutatii *frame-shift*) au ca rezultat absenta totala a proteinei din muschiul scheletic, caracteristic fenotipului sever Distrofia Musculara Duchenne. Mutatiile care mentin cadrul de citire (mutatii *in frame*) conduc la sinteza unei proteine anormale, dar partial functionala, caracteristic distrofiei musculare Becker. Corelarea fenotipului cu mutatiile identificate in gena *DMD* confirma aceasta ipoteza la aproximativ 90% din cazuri. 10% din pacienti prezinta o neconcordan-ta genotip fenotip.

DISTROFII MUSCULARE DE TIP FORMA CENTURILOR (LGMDs) (LGMD 1C, LGMD 2A, LGMD 2B, LGMD 2C-D)

Caracteristici: Distrofiile musculare de tip forma centurilor (LGMD - limb girdle muscular dystrophy) reprezinta un grup complex de boli genetice, care afecteaza in principal musculatura centurii pelviene si scapulare; debuteaza in a doua sau a treia decada de viata si au o rata de progresie mult mai mica fata de distrofinopatii. Studiile recente de biologie moleculara au aratat ca exista mai mult de 20 subtipuri diferite de LGMD. Cele mai comune si mai raspandite tipuri de distrofii musculare forma centurilor la noi in tara sunt: calpainopatiile (LGMD2A), sarcoglicanopatiile (LGMD 2C-D) si cu o incidenta mai mica disferlinopatiile (LGMD 2B) si caveolinopatiile (LGMD 1C).

Incidenta: la nivel mondial de 1:15.000

Mod de transmitere ereditara: Distrofiile musculare de tip forma centurilor sunt boli genetice cu transmitere autosomal dominanta sau recesiva.

Cauze: Mutatii patogene de tipul deletiilor, duplicatiilor in genele: CAPN3, CAV3, DYSF, SGCA, SGCB, SGCG care codifica pentru proteinele: calpaina3, caveolina, disferlina, sarcoglicani – α , - β , - γ .

Metoda de analiza: Testele moleculare pentru distrofiile musculare implica o amplificare multipla dependenta de ligare (MLPA) pentru identificarea mutatiilor exonice mari de tipul deletiilor si duplicatiilor din gena.

Specimen recoltat – sange venos

Recipient recoltare – vacutainer ce contine EDTA ca anticoagulant;

Cantitate recoltata – minim 4 mL sange.

Temperatura de transport °C - 2-8 °C (pe gheata)

Raportarea si interpretarea rezultatelor

Vor fi comunicate deletiile si duplicatiile identificate in gena si asocierea la un fenotip pe baza corelatiei dintre mutatia identificata si a analizei respectarii teoriei cadrului de citire a mesajului genetic.

Un rezultat negativ pentru o mutatie la testul MLPA nu exclude diagnosticul la persoanele cu tablou clinic sugestiv.

Limitele metodei

Tehnica poate detecta pana la 98% din toate deletiile si duplicatiile din gena. Cand mutatiile apar la nivelul unui singur exon, este necesara confirmarea mutatiei prin secventiere. Avand in vedere faptul ca aproximativ 35% din cazurile de distrofinopatie Duchenne/Becker si peste 40 % din cazuri de LGMD se datoreaza mutatiilor punctiforme, se recomanda fie secventierea completa a genelor fie biopsia musculara pentru analiza expresiei proteinei deficient prin imunofluorescenta si western blot.

Utilitatea testului: Analiza deletiilor si duplicatiilor este recomandata in mod special pacientilor cu tablou clinic de distrofie musculara pentru confirmarea diagnosticului si alegerea conduitei terapeutice. Totodata cunoasterea exacta a mutatiei permite inscrierea pacientului in trialurile clinic pentru terapiile genetice in curs de dezvoltare.

Bibliografie:

1. Monaco, A.P. (1989). *Dystrophin, the protein product of the Duchenne/Becker muscular dystrophy gene*. Trends Biochem. Sci. **14**:412-415.
2. Aartsma-Rus A, I B Ginjaar, Bushby K. *The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy*, J Med Genet. 2016 Mar; 53(3): 145–151.
3. Ferlini A, Neri M, Gualandi. *The medical genetics of dystrophinopathies: Molecular genetic diagnosis and its impact on clinical practice*, Neuromuscular Disorders 23 (2013) 4–1
4. Winnard AV, Klein CJ, Coover DD, Prior T, Papp A, Snyder P, Bulman DE, Ray PN, McAndrew P, King W, et al. *Characterization of translational frame exception patients in Duchenne/Becker muscular dystrophy*. Hum Mol Genet. 1993 Jun; 2(6):737-44.
5. Liechti-Gallati S, Koenig M, Kunkel LM, Frey D, Boltshauser E, Schneider V, Braga S, Moser H. *Molecular deletion patterns in Duchenne and Becker type muscular dystrophy*. Hum Genet 1989; 81: 343–348.

Mai multe informatii:

Cercetator stiintific III Dr. Gisela Gaina
email: giselagaina@yahoo.com