

## DISTROFINOPATIILE: DIAGNOSTIC CLINICO-PARACLINIC

Irene Damian<sup>1</sup>, Mariana Așchie<sup>2</sup>, N. Cârciumar<sup>3</sup>, Marilena Alexianu<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Clinica de Neurologie, Spitalul Universitar CFR, Constanța

<sup>2</sup>Catedra de Morfopatologie, Facultatea de Medicină „Ovidius“, Constanța

<sup>3</sup>Catedra de Neurologie, Facultatea de Medicină „Ovidius“, Constanța

<sup>4</sup>Laboratorul de Neuropatologie, Spitalul Clinic Colentina, București

### REZUMAT

Distrofinopatiile (distrofia musculară Duchenne, distrofia musculară Becker, cardiomiopatia dilatativă legată de cromozomul X) sunt miopatii datorate unor mutații ale genei care codează proteina sarcolemală denumită distrofină. Diagnosticul, evocat pe baza datelor anamnestice, a examenului clinic și a testelor paraclinice clasice (dozarea CPK serice, examenul electromiografic etc) trebuie să fie completat prin tehnici de analiză genetică și/sau metode cantitative și calitative de analiză a proteinelor, prin imunohistochimie sau imunoblotare.

**Cuvinte cheie:** distrofinopatii; tablou clinic; teste paraclinice; diagnostic diferențial

### ABSTRACT

Dystrophinopathies (Duchenne muscular dystrophy, Becker muscular dystrophy, X-linked dilated cardiomyopathy) include a spectrum of muscle disease caused by mutations in the gene that encodes the sarcolemmal protein called dystrophin. Molecular genetic testing of dystrophin gene (Xp21.2) can establish the diagnosis of a dystrophinopathy without muscle biopsy in the majority of cases. In the remaining cases, a combination of clinical findings, family history, serum CK concentration, and muscle biopsy with dystrophin studies confirms the diagnosis.

**Key words:** dystrophinopathies; clinical features; paraclinical testing; differential diagnosis

Distrofinopatiile (DFP) reprezintă o categorie de distrofii musculare având drept mecanism etio-patogenic comun mutații ale genei distrofinei (situată pe cromozomul Xp21) care produc absența, prezența în cantități scăzute sau modificarea structurală a acestei proteine citoscheletale sarcolemale de mari dimensiuni.

Dintre DFP fac parte (1):

- Distrofia musculară Duchenne (DMD);
- Distrofia musculară Becker (DMB);
- Cardiomiopatia dilatativă legată de cromozomul X (CMDLX).

DFP sunt cele mai frecvente forme de distrofii musculare. DMD constituie cea mai frecventă boală letală legată de cromozomul X, având o incidență cumulativă la naștere estimată în diverse regiuni ale lumii între 1/3500 și 1/5618 nou născuți de sex masculin. DMB apare cu o frecvență de aproximativ trei ori mai mică decât DMD (2).

### TABLOU CLINIC

DFP au un spectru de intensitate a manifestărilor clinice care variază de la forme ușoare la forme foarte severe.

Formele ușoare includ fenotipuri care se manifestă prin creșteri asimptomatice ale creatin-fosfokinazei (CPK) serice, crampe musculare și mioglobulinurie sau prin miopatie izolată la nivelul cvadricepsului.

Formele severe sunt reprezentate de DMD și DMB (în care predomină afectarea musculaturii scheletice) și CMDLX (în care predomină afectarea miocardului).

Unii specialiști includ în formele ușoare de DMB și pacienții cu niveluri serice crescute de CPK și concentrații scăzute ale D pe piesele de biopsie musculară, dar cu afectare „subclinică“ a musculaturii scheletice. Când acești pacienți cu forme atipice de boală dezvoltă cardiomiopatie severă devine imposibilă distincția între DMB și CMDLX (1).

DMD debutează clinic de obicei în copilăria mică, prin întârzierea achizițiilor motorii: menținerea poziției în șezut și a ortostațiunii, ulterior mersul (vârsta medie de apariție a mersului la acești copii este de 18 luni, cu variații între 12-24 luni).

Primele simptome observate de părinți sunt (3):

- Întârzierea achizițiilor motorii (62% dintre cazuri);
- Tulburări ale mersului (mers pe vârfuri, mers „legănat“) 30% dintre cazuri;
- Dificultăți în activitatea școlară (5% dintre cazuri);
- Tulburări de vorbire (3% dintre cazuri).

Vârsta medie de diagnosticare a DMD la băieții fără istoric familial s-a dovedit a fi de 4 ani și 10 luni (16 luni-8 ani).

Scăderea de forță musculară predominant proximală determină hiperlordoză și dificultăți de ridicare din poziția ghemuit. Astfel, pacienții folosesc manevra Gowers pentru trecerea din clino- în ortostațiune (ri-

dicarea de pe podea), ajutându-se de brațe pentru a suplini scăderea de forță la nivelul centurii pelviene. Musculatura gambieră este mărită de volum și fermă la palpare, iar ocazional pot apărea dureri la acest nivel, crampe musculare.

Boala evoluează rapid, majoritatea bolnavilor devenind dependenți de scaunul cu roțile până la vârsta de 13 ani.

Incidența cardiomiopatiei la acești pacienți crește constant în timpul adolescenței, 33% dintre ei devenind simptomatici până la 14 ani, 50% până la 18 ani și practic toți după această vârstă. Fibroza miocardică este frecvent prezentă, afectând mai ales regiunea postero-bazală a ventriculului drept (4).

Alte manifestări clinice (5):

- retracții tendinoase, ankiloze (secundare imobilizării);
- scolioză;
- aritmii grave, stop cardiac sau hipertermie malignă apărute ca urmare a folosirii succinilcolinei ca inductor al anesteziei;
- cataractă congenitală;
- tulburări ale vederii în lumină slabă (datorită localizării la nivelul stratului plexiform al retinei a trei izoforme ale distrofinei: Dp 427, Dp 260, Dp 70);
- pot apărea semne de afectare a musculaturii netede a tractului digestiv (dilatatie gastrică acută, cu vomisme, dureri abdominale mimând ocluzia intestinală).

Decesul survine de regulă în decada a 3-a de viață, cele mai comune cauze ale acestuia fiind complicațiile respiratorii și cardiomiopia. Un grad de deficit cognitiv cu caracter neevolutiv este frecvent la copiii cu DMD, afectând mai ales funcția verbală.

*DMB* se caracterizează prin deficit de forță musculară cu debut la vârste mai mari decât în DMD, pacienții păstrându-și autonomia de mișcare până în decada a doua de viață. În pofida afectării relativ ușoare a musculaturii scheletice, insuficiența cardiacă datorată cardiomiopatiei dilatative este frecventă și reprezintă principala cauză de deces (care survine de regulă în decada a patra de viață).

Odată cu perfecționarea metodelor de diagnosticare, au fost descrise forme ușoare de boală la pacienți de sex masculin, cu debut după vârsta de 30 de ani și cu menținerea autonomiei ambulatorii până după vârsta de 60 de ani.

Pacienții cu simptome ușoare, confirmați prin imunohistochimie sau metode de genetică moleculară sunt încadrați într-una dintre următoarele categorii (6):

- DMB cu afectare „subclinică“ a musculaturii scheletice (hipertrofia musculaturii gambiere, crampe musculare, mialgii, niveluri crescute ale

CPK serice și mioglobulinurie provocată de efortul fizic);

- DMB cu afectare „benignă“ a musculaturii scheletice când la cele de mai sus se adaugă scăderea de forță musculară la nivelul centurii pelviene și/sau scapulare.

*CMDLX* se manifestă clinic prin insuficiență cardiacă congestivă secundară dilatației ventriculare și alterării fracției de ejecție, însoțită sau nu de afectarea clinic manifestă a musculaturii scheletice.

Descrierea sa ca entitate morbidă a pornit (în 1987) de la un raport asupra unei familii cu 68 de membri (5 generații) care prezentau cardiomiopatie dilatativă, dar fără semne clinice de miopatie scheletică (7).

În 1993 (8) a fost demonstrată asocierea *CMDLX* cu mutații la nivelul locusului distrofinei (Xp21.2), la membrii acestei familii (și ai unei alteia, identificate ulterior). Studii subsecvente au arătat că la pacienții cu afectare cardiacă severă, miocardul distrofina este absentă la nivelul miocardului, în timp ce fibrele musculare scheletice sunt indemne.

Debutul simptomelor survine la bărbați în decada a doua sau a treia de viață, au o evoluție rapidă și asociază frecvent aritmii ventriculare. Femeile purtătoare dezvoltă cardiomiopatie ușoară, în decadele 4-5 de viață, cu evoluție lentă. Singura anomalie biochimică decelabilă este creșterea nivelului seric de CPK.

Unii autori consideră pacienții cu *CMDLX* drept forme „subclinice“ sau „benigne“ de DMB, în timp ce alții îi desemnează sub termenul de „cardiomiopatie dilatativă cu nivel crescut de CPK serică“ (9).

Într-un studiu efectuat asupra a 28 de pacienți cu DMB „subclinică“ (cu vârste cuprinse între 6 și 48 de ani) 19 (68%) dintre aceștia prezentau afectare miocardică, deși doar 2 erau simptomatici. Într-un studiu similar, efectuat pe 21 de pacienți (cu vârste cuprinse între 3 și 63 de ani, vârsta medie 40 ani) 33% prezentau insuficiență cardiacă, în pofida afectării relativ ușoare a musculaturii scheletice (10).

Ocazional, femeile pot prezenta DMD rezultând din remanieri ale cromozomului X, care afectează locusul distrofinei sau din lipsa parțială sau totală a unui cromozom X (sindrom Turner) sau inactivării acestuia. Studiile efectuate nu au relevat o corelație semnificativă între rata de inactivare a cromozomului X (determinată la nivelul leucocitelor) și semnele clinice, nivelul seric de CPK sau proporția de fibre musculare negative pentru distrofină (11).

## DIAGNOSTIC PARACLINIC (12, 13, 14, 15, 16)

### A. Biochimie serică

CPK este întotdeauna crescută la pacienții cu DFP, probabil încă de la naștere, frecvent la niveluri ce

depășesc de 50-100 de ori valorile normale. Concentrații serice normale de CPK prezente la un pacient de vârstă pediatrică sau adultă exclud DFP.

Troponina I poate prezenta niveluri serice mărite, dar mult inferioare celor din ischemia miocardică; de asemenea pot crește transaminazele serice (TGO, TGP).

## B. Examenul electromiografic

Examenul electromiografic evidențiază potențiale de unitate motorie cu amplitudine scăzută, durată scurtă, polifazice, cu recrutare rapidă. Pe măsură ce boala evoluează, interferența devine incompletă datorită reducerii fenomenului de recrutare, putând ajunge până la silențiu electric.

Toate aceste elemente sunt însă nespecifice DFP, ele regăsindu-se în toate afecțiunile de origine miogenă.

## C. Explorări imagistice

- Radiografiile coloanei vertebrale sunt utile pentru depistarea precoce și monitorizarea tulburărilor de statică vertebrală secundare bolii;
- Radiografii și radioscopii toraco-pulmonare pentru supravegherea complicațiilor respiratorii.

## D. Examenul electrocardiografic

Examenul electrocardiografic evidențiază frecvent aritmii sinusale, unde Q patologice și amplitudini crescute ale unde R în derivațiile precordiale drepte. ECG cardiografia transtoracică permite evaluarea mai precisă a afectării cardiace, relevând frecvent prelungirea perioadei de relaxare diastolică ventriculară.

## E. Electroretinograma

Electroretinograma relevă anomalii ale neurotransmisiei retiniene, traduse prin reducerea amplitudinii unde b.

## F. Biopsia musculară

În pofida mării specificități a testelor genetice, aproximativ o treime dintre pacienții cu DFP nu prezintă mutații detectabile prin analiza ADN-ului; de aceea, biopsia musculară rămâne un instrument esențial pentru diagnosticarea bolnavilor și purtătorilor de DFP.

Sediul optim de prelevare este constituit de mușchii ușor accesibili și moderat afectați clinic (în general, cu o scădere de forță de cca 20%).

Examenul histopatologic clasic relevă modificări structurale nespecifice; ele confirmă totuși fondul miogen al leziunii. Acestea se referă la modificări dimensionale, coeficientul de dispersie a diametrelor fibrelor

musculare depășind limitele normalului. Sunt descrise hipertrofia fibrelor asociată cu creșterea densității populației de miofibrile, tendință la centralizare a nucleilor, frecvente fibre „despicate“. Uneori există o reducere a fibrelor de tip 2 cu preponderența fibrelor de tip 1.

Necroza hialină este un aspect constant întâlnit. Fenomenul de regenerare este confirmat de prezența unor mici grupuri de fibre cu citoplasmă bazofilă, evidente mai ales în stadiile inițiale ale DFP. Infiltratul celular polimorf este moderat, predominând fenomenul de fibroză S-a propus chiar o stadializare a leziunilor tisulare în DMD:

- *stadiul precoce*: caracterizat prin degenerescență hialină, asociată cu fenomene regenerative evidente;
- *stadiul intermediar*: dominat de inegalitatea diametrelor fibrelor, fenomenele degenerative și regenerative fiind minime;
- *stadiul final*: caracterizat printr-o depopulare masivă a parenchimului, fibrele restante având leziuni variate.

Pentru identificarea și dozarea distrofinei sunt disponibile două metode:

- a. Metoda imunohistochimică, care folosește anticorpi ce recunosc diferite regiuni ale moleculei de distrofină;
- b. Metoda imunoblotării omogenatului muscular (Western blott), metoda cu cea mai mare specificitate și sensibilitate în diferențierea DMD de DMB.

La bolnavii cu DMD, imunocolorarea pentru distrofină la nivel sarcolemal este absentă, în timp ce la femeile purtătoare există o dispunere „în mozaic“ a fibrelor normale alternând cu cele lipsite de distrofină. Bolnavii cu DMB prezintă o imunocolorare neuniformă, fragmentată a regiunii sarcolemale.

Examenul imunohistochimic poate de asemenea releva în DFP scăderea cantitativă a altor proteine sarcolemale (sarcoglicani, aquaporina 4).

Testul prin imunoblotare poate determina cantitativ și calitativ distrofina. La bolnavii cu DMD acest test relevă absența distrofinei, spre deosebire de bolnavii cu DMB, la care sunt prezente cantități variabile de distrofină cu structură anormală. Purtătoarele de DMD dovedesc un mozaicism de expresie a distrofinei și de obicei, prezintă cantități suficiente de distrofină pentru ca imunoblotarea să indice valori normale; de aceea, metoda nu poate fi folosită pentru detectarea purtătoarelor.

Exceptând testarea genetică prin linkage, imunocolorarea este singura metodă de a identifica starea de purtător într-o familie fără o mutație cunoscută a genei distrofinei.

## G. Testele genetice

Testele genetice, deși dețin specificitatea maximă între metodele de diagnostic pentru DFP, în aproximativ o treime din cazuri nu pot evidenția mutația cauzatoare de boală (mai ales în cazul mutațiilor punctiforme) deoarece foarte puține laboratoare testează întregul spectru de mutații posibile la nivelul unei gene de mari dimensiuni cum este cea a distrofinei.

Testele de genetică moleculară utilizate în diagnosticul DFP sunt: polymerase chain reaction (PCR), hibridizare in situ prin fluorescență (FISH), scanare mutațională, analiză secvențială etc.

## H. Testarea prenatală

Testarea prenatală se poate realiza pentru sarcinile cu risc înalt.

Procedura uzuală este determinarea sexului fetal (prin efectuarea cariotipului sau prin tehnici speciale de determinare a cromozomilor sexuali) din celule obținute prin biopsia vilozităților corionice (la 10-12 săptămâni de gestație) sau prin amniocenteză (la 16-18 săptămâni de gestație). Dacă fătul prezintă cariotipul 46XY, ADN-ul extras din celulele fetale va fi analizat prin metode de genetică moleculară.

Înainte de efectuarea testării prenatale însă trebuie identificată alela cauzatoare de boală la un membru afectat al familiei sau existența unui linkage pozitiv în familia respectivă.

## DIAGNOSTIC DIFERENȚIAL

- Alte tipuri de distrofii musculare
  - *forma centurilor*: are manifestări clinice similare DMD, dar apare la ambele sexe, fiind transmisă autozomal dominant sau autozomal recesiv; se datorează mutațiilor ce afectează sarcoglicanii și alte proteine sarcolemale;
  - *tip Emery-Dreyfuss*: prezintă similitudini clinice cu DFP, se transmite în principal în mod recesiv legat de cromozomul X, dar și autozomal dominant sau autozomal recesiv, fiind determinată de mutații ale genei LMNA (ce codifică emerină).
- Amiotrofia spinală: boală cauzată de mutații ale genei SMN care produc degenerarea motoneuronilor spinali;
- Alte tipuri de cardiomiopatie dilatativă (sporadică sau familială).

În pofida specificității ridicate a metodelor diagnostice de genetică moleculară, aproximativ o treime dintre pacienții cu distrofinopatii nu prezintă deleții genice detectabile prin analiza ADN-ului. Acest aspect, alături de costul ridicat și disponibilitatea încă limitată a testelor genetice, fac din biopsia musculară (prelucrată prin metode moderne) cheia de diagnostic a diferitelor tipuri de DFP (cu implicații terapeutice și prognostice importante) și de detectare a purtătorilor asimptomatici (în scopul profilaxiei primare prin sfat genetic a acestor maladii).

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Bruce RK, Basil TD, David KU – Dystrophinopathies. *Gene Reviews*, 2003; 41: 11-20.
2. Bushby KM, Thambyayah M, Gardner-Medwin D – Prevalence and incidence of Becker muscular dystrophy. *Lancet*, 2001, 337: 1022-1024.
3. Zalaudek I, Bonelli RM, Koltringer P, Reisecker F, Wagner K – Early diagnosis in Duchenne muscular dystrophy. *Lancet*, 1999, 353: 1975.
4. Nigro G, Comi LI, Politano L, Bain RJ – The incidence and evolution of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. *Int J Cardiol*, 1990, 26: 271-277.
5. Marshall PD and Galasko CS – No improvement in delay in diagnosis of Duchenne muscular dystrophy (letter). *Lancet*, 1995, 345: 590-591.
6. Yazaki M, Yoshida K, Nakamura A, Koyama J, Nanba T, Ohori N, Ikeda S – Clinical characteristics of aged Becker muscular dystrophy patients with onset after 30 years. *Eur Neurol*, 1999, 42: 145-149.
7. Berko BA and Swift M – X-linked dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 1987, 316: 1186-1191.
8. Towbin JA, Hejtmancik JF, Brink P, Gelb B, Zhu XM, Chamberlain JS, McCabe ER, Swift M – X-linked dilated cardiomyopathy. Molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus. *Circulation*, 2003, 87: 1854-1865.
9. Ferlini A, Sewry C, Melis MA, Mateddu A, Muntoni F – X-linked dilated cardiomyopathy and the dystrophin gene. *Neuromuscul Disord*, 1999, 9: 339-346.
10. Melacini P, Fanin M, Danieli GA, Villanova C, Martinello F, Miorin M, Freda MP, Miorelli M, Mostacciuolo ML, Fasoli G, Angelini C, Dalla Volta S – Myocardial involvement is very frequent among patients affected with subclinical Becker's muscular dystrophy. *Circulation*, 1996, 94: 3168-3175.
11. Hoogerwaard EM, van der Wouwe PA, Wilde AA, Bakker E, Ippel PF, Oosterwijk JC, Majoor-Krakauer DF, van Essen AJ, Leschot NJ, de Visser M – Cardiac involvement in carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*, 1999, 9:347-51
12. Bushby KM and Gardner-Medwin D – The clinical, genetic and dystrophin characteristics of Becker muscular dystrophy. I. Natural history (published erratum appears in *J Neurol* 1993 Jul; 240(7): 453) *J Neurol*, 2002, 240: 98-104.
13. Bennett RR, den Dunnen J, O'Brien KF, Darras BT, Kunkel LM – Detection of mutations in the dystrophin gene via automated DHPLC screening and direct sequencing. *BMC Genet*, 2001, 2: 17.
14. Darras BT, Koenig M, Kunkel LM, Francke U – Direct method for prenatal diagnosis and carrier detection in Duchenne/Becker muscular dystrophy using the entire dystrophin cDNA. *Am J Med Genet*, 1988, 29: 713-726.
15. Jennekens FG, ten Kate LP, de Visser M, Wintzen AR – Diagnostic criteria for Duchenne and Becker muscular dystrophy and myotonic dystrophy. *Neuromuscul Disord*, 2001, 1: 389-391.
16. Mendell JR, Buzin CH, Feng J, Yan J, Serrano C, Sangani DS, Wall C, Prior TW, Sommer SS – Diagnosis of Duchenne dystrophy by enhanced detection of small mutations. *Neurology*, 2001, 57: 645-650.