

NAZAH CHERIF MOHAMAD YOUSSEF

**MIOPATIA NEMALINICA: ACHADOS CLÍNICOS,
ELETRONEUROMIOGRÁFICOS E ANÁLISE DA HISTOQUÍMICA E
IMUNOHISTOQUÍMICA NA BIÓPSIA MUSCULAR**

Dissertação apresentada ao colegiado do Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna – Mestrado do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Herminia Scola

CURITIBA

2009

DEDICATÓRIA

*Aos meus sobrinhos Kassem e Ale,
alegria e razão da minha existência.*

*À minha mãe,
pelo incansável apoio, estímulo,
carinho e força de viver.*

À memória de meu pai.

À Deus.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos especiais à **Professora Dra. Rosana Hermínia Scola**, minha orientadora, pelo profissionalismo, estímulo à pesquisa científica, e apoio incondicional fundamental para conclusão desta dissertação.

Ao **Professor Dr. Lineu Cesar Werneck**, mentor da Neurologia no Paraná, exemplo de excelência em educação, assistência e pesquisa. Obrigado por acreditar na minha pessoa e pela oportunidade da realização da dissertação.

Ao **Professor Dr. Paulo José Lorenzoni**, pelo estímulo, pela ajuda e tempo dispensados na revisão e realização do texto e das fotos deste estudo.

A **Dra. Claudia Kamoi Kay**, pelo exemplo de profissionalismo, de real conciliação entre família e trabalho, pelo apoio nas horas difíceis e principalmente pela amizade de todos estes anos.

Ao **Prof. Dr. Hélio Afonso G. Teive**, **Prof. Dr. Edison Matos Novak**, **Prof. Dr. Carlos Eduardo Silvado**, professores que contribuíram para a minha formação profissional durante a residência de neurologia.

As Sras **Nyvia M. C. Hrysay e Eunice Recheleto**, técnicas do laboratório de histoquímica, pelo apoio, pela disponibilidade e auxílio na realização da histoquímica e imunohistoquímica deste estudo.

A minha irmã, **Dra. Nariman Cherif Mohamad Youssef**, pela amizade e paciência durante a conclusão deste projeto.

A todos que estão comigo no caminho da vida, transformando esta passagem num momento doce.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	III
LISTA DE TABELAS.....	IV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 HISTÓRICO.....	4
2.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	6
2.3 CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA.....	9
2.4 EXAMES COMPLEMENTARES.....	10
2.5 OUTROS EXAMES COMPLEMENTARES.....	11
2.6 HISTOLOGIA E HISTOQUÍMICA.....	11
2.6.1 Estrutura protéica das fibras musculares.....	11
2.6.1.1 Proteínas dos filamentos contráteis.....	14
2.6.1.2 Proteínas estruturais.....	16
2.6.1.3 Proteínas ligadas à membrana muscular.....	17
2.6.2 Corpos nemalínicos.....	17
2.6.3 Alterações das fibras musculares.....	18
2.7 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	19
2.8 GENÉTICA.....	21
3 OBJETIVOS.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 CASUÍSTICA.....	26
4.2 CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA.....	29
4.3 ENZIMAS MUSCULARES.....	29
4.4. ELETRONEUROMIOGRAFIA.....	30

4.5	BIÓPSIA MUSCULAR.....	30
4.5.1	Técnica da biópsia muscular.....	31
4.5.2	Técnica de corte e de preparação.....	31
4.6	HISTOQUÍMICA.....	31
4.6.1	Proporção do tipo de fibras.....	32
4.6.2	Percentagem de fibras contendo <i>rods</i>	32
4.6.3	Distribuição dos <i>rods</i>	32
4.6.4	Presença de fibras em sacabocado.....	32
4.6.5	Atividade da fosfatase ácida.....	32
4.7	IMUNOHISTOQUÍMICA.....	32
4.7.1	Anticorpos utilizados.....	33
4.7.2	Procedimento.....	33
4.7.3	Classificação.....	34
5	RESULTADOS.....	35
5.1	CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA.....	35
5.2	ENZIMAS MUSCULARES.....	35
5.3	ELETRONEUROMIOGRAFIA.....	36
5.4	HISTOQUÍMICA.....	37
5.5	IMUNOHISTOQUÍMICA.....	40
6	DISCUSSÃO.....	43
6.1	CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA.....	43
6.2	ENZIMAS MUSCULARES.....	44
6.3	ELETRONEUROMIOGRAFIA.....	45
6.4	HISTOQUÍMICA.....	45
6.5	IMUNOHISTOQUÍMICA.....	46
7	CONCLUSÕES.....	49
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
	ANEXOS.....	57

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	- CONSTITUIÇÃO DO SARCÔMERO.....	12
FIGURA 2	- CONSTITUIÇÃO PROTÉICA DO SARCÔMERO.....	13
FIGURA 3	- ASPECTOS CLÍNICOS DO CASO 8, MOSTRANDO LORDOSE, DEFORMIDADES DE MÃO E PÉ CAVO	29
FIGURA 4	- A PRESENÇA DE FIBRAS MUSCULARES COM VARIAÇÃO NO TAMANHO NA COLORAÇÃO HE.....	38
FIGURA 5	- PERCENTAGEM DE <i>RODS</i> NAS FIBRAS MUSCULARES. GOMORI.....	38
FIGURA 6	- DISTRIBUIÇÃO DOS <i>RODS</i> NAS FIBRAS MUSCULARES GOMORI.....	38
FIGURA 7	- PREDOMÍNIO E ATROFIA DE FIBRAS TIPO I. ATPase PH 4,3	39
FIGURA 8	- COMPARAÇÃO ENTRE COLORAÇÃO NORMAL E PRESENÇA DE SACABOCADOS NAS FIBRAS MUSCULARES. NADH.....	39
FIGURA 9	- ATIVIDADE DE FOSFATASE ÁCIDA AUMENTADA. FOSFATASE ÁCIDA	39
FIGURA 10	- EXPRESSÃO NORMAL, HETEROGÊNEA E AUSENTE DA PROTEÍNA NEBULINA À IMUNOHISTOQUÍMICA.....	41
FIGURA 11	- EXPRESSÃO NORMAL E AUSENTE DA PROTEÍNA MIOSINA À IMUNOHISTOQUÍMICA.....	41
FIGURA 12	- EXPRESSÃO FORTEMENTE POSITIVA, NORMAL E AUSENTE DA PROTEÍNA DESMINA À IMUNOHISTOQUÍMICA.....	41

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- RESULTADO DAS ENZIMAS NEUROMUSCULARES.....	36
TABELA 2	- ELETRONEUROMIOGRAFIA.....	36
TABELA 3	- BIÓPSIA MUSCULAR.....	37
TABELA 4	- IMUNOHISTOQUÍMICA.....	40
TABELA 5	- ACHADOS CLÍNICOS, LABORATORIAIS, HISTOQUÍMICOS E IMUNOHISTOQUÍMICOS NA MIOPATIA NEMALÍNICA.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTA 1	- Gene da actina isoforma músculo esquelético
ACTC	- Gene da actina isoforma músculo cardíaco
ACTN 2	- Gene da alfa-actinina
ALT	- Alanina aminotransferase
AST	- Aspartato aminotransferase
ATPase	- Adenosina trifosfatase
CFL2	- Cofilin-2
CK	- Creatinaquinase
ENMG	- Eletroneuromiografia
HC-UFPR	- Hospital de Clínicas – Universidade Federal do Paraná
HIV	- Virus da imunodeficiência humana
LDH	- Desidrogenase láctica
MN	- Miopatia nemalínica
MN 1	- Miopatia nemalínica tipo 1
MN 2	- Miopatia nemalínica tipo 2
MN 3	- Miopatia nemalínica tipo 3
MN 4	- Miopatia nemalínica tipo 4
µm	- Micrômetro
mV	- Milivolts
NADH	- NADH-tetrazolium redutase
NEB	- Gene da nebulina
PAS	- Ácido periódico de Schiff
PAUM	- Potencial de ação de unidade motora
SH3	- SRC homology 3
TNNT 1	- Gene da troponina 1
TPM 1	- Gene da alfa-tropomiosina rápida
TPM 2	- Gene da beta-tropomiosina
TPM 3	- Gene da alfa-tropomiosina lenta
TPM 4	- Gene da tropomiosina

RESUMO

A miopatia nemalínica é uma miopatia congênita rara, descrita desde 1963 e que caracteriza-se por heterogeneidade genética. Atualmente, é classificada em 6 formas clínicas: congênita grave, congênita intermediária, típica, juvenil, adulta e outras formas. A dosagem de enzimas musculares e a eletroneuromiografia pouco contribuem para o diagnóstico desta entidade. A biópsia muscular, através da coloração tricromo de Gomori modificado revela a presença de *rods* nas fibras musculares. A imunohistoquímica revela a natureza dos defeitos estruturais da doença através da expressão positiva e negativa das proteínas musculares. Geneticamente, há identificação de mutações em 6 genes responsáveis pela codificação das proteínas de filamento fino: NEB, , ACTA1, TPM3, TPM 2, TNNT1 e CFL2. Os objetivos do estudo foram a avaliação da expressão das proteínas musculares nebulina, miosina e desmina através da imunohistoquímica nos casos de miopatia nemalínica assim como a correlação destes achados com o padrão da eletroneuromiografia e a localização e percentagem de *rods* existentes nas fibras musculares. Foram incluídos 8 pacientes com idade que variou de 2 meses a 6 anos, sendo 2 do gênero masculino e 6 do feminino, 5 com a forma típica, 2 com a forma congênita intermediária e 1 com a forma congênita grave. Somente 1 caso apresentou elevação da CK e LDH, enquanto os demais casos tinham dosagem de enzimas musculares normais. A eletroneuromiografia foi normal em 2 casos, apresentou padrão miopático em 2 e padrão neuropático em 3 casos. A distribuição dos corpos nemalínicos foi mista em todas as biópsias musculares sendo que a percentagem dos mesmos foi maior que 50% em 2 casos e menor que 50% em 6 casos. A expressão da proteína nebulina foi heterogênea em 4 casos e ausente nos demais. A expressão da miosina foi normal (padrão mosaico) em 7 casos sendo que 1 apresentou expressão ausente. A desmina apresentou expressão fortemente positiva em 3 casos, heterogênea em 1 deles, normal em 3 e ausente em 1 caso. Conclui-se que o padrão de expressão das proteínas musculares através da técnica da imunohistoquímica na miopatia nemalínica pode ser ausente, normal ou de expressão anômala. Não houve relação entre o padrão da eletroneuromiografia com a expressão da nebulina e miosina, no entanto, a expressão da proteína desmina apresentou-se fortemente positiva nos casos de pacientes com eletroneuromiografia de padrão neuropático, enquanto aqueles com padrão normal e miopático têm expressão normal. Não houve relação entre a distribuição de *rods* e percentagem dos mesmos na fibra muscular com o tipo de expressão proteica à imunohistoquímica.

Palavras chave: Miopatia nemalínica; Histoquímica; Imunohistoquímica; Eletroneuromiografia.

ABSTRACT

Nemaline myopathy is a rare congenital myopathy, reported since 1963, characterised by clinical and genetic heterogeneity. It is classified in 6 clinical forms: severe, intermediate, typical, mild or juvenile, adult and other forms. Muscle enzymes levels and electromyography few contributed to diagnosis. Muscle biopsy, at modified Gomori-thricrome, reveals the presence of rods in muscle fibers. Immunohistochemistry reveals the nature of disease structural defects through positive or negative expression of muscle proteins. Genetically, there is identification of 6 genes mutation, responsible of thin filament codification: NEB, ACTA1, TPM3, TPM 2, TNNT1 and CFL2. Study goals were the analysis of the expression of muscle proteins nebuline, miosine and desmine as well as their correlation with electromyography pattern, rod localization and rod percentage in the fibers. Eight patients were included; age from 2 months to 6 years; two male and 6 female; 5 with typical, 2 with intermediate and one with severe form. Only one case presented CPK and LDH elevation, while the others presented normal muscle enzymes levels. Electromyography was normal in 2 cases, myopathic in 2 cases and neuropathic in 3 cases. Nemaline bodies distribution was mixed in all muscle biopsies, presented in more than 50% of fibers in 2 cases and less than 50% of fibers in 6 cases. Nebulin expression was heterogeneous in 4 cases and absent in the others. Myosin expression was normal in 7 cases and absent in 1. Desmin expression was strongly positive in 3 cases, heterogeneous in 1, normal in 3 and absent in 1 case. In conclusion, nemaline myopathy may have muscle protein expression in immunohistochemistry as absent, normal or abnormal. There wasn't relation among electromyography pattern and nebuline and miosine expression. But, desmin expression was strongly positive in patients with neuropathic pattern at electromyography while patients with normal or myopathic pattern had normal expression. There wasn't relation among rods distribution and rods percentage in muscle fiber and immunochemistry protein expression.

Key words: Nemaline myopathy; Histochemistry; Immunohistochemistry; Electromyography.

1 INTRODUÇÃO

A miopatia nemalínica (MN) é uma miopatia congênita descrita simultaneamente por Conen *et al.* e Shy *et al.*, em 1963. Inicialmente foi apresentada como afecção muscular não-progressiva, cuja manifestação clínica mais evidente é a hipotonia, sendo a característica histológica a presença de estruturas em forma de bastões (*rods*) no interior das fibras musculares, também denominados corpos nemalínicos. A incidência estimada é de 1 para cada 500.000 nascidos vivos (WALLGREN-PETTERSSON *et al.*, 1990). Desde sua primeira descrição, em 1963, surgiram mais e mais casos com diferentes formas de evolução: das rápidas e fatais às lentas, quando manifestadas somente na vida adulta (CONEN *et al.*, 1963; SHY *et al.*, 1963; WERNECK *et al.*, 1983; WALLGREN-PETTERSSON, 1989; BAROHN *et al.*, 1994; FARDEAU e TOMÉ, 1994; NORTH *et al.*, 1997; SASAKI *et al.*, 1997; JOHNSTON *et al.*, 2000; GOMMANS *et al.*, 2002).

A exteriorização mais evidente da MN é a hipotonia generalizada, descrita como fraqueza muscular pelos pacientes. O comprometimento predomina nos músculos faciais, flexores cervicais, flexores do tronco, dorsiflexores dos pés e extensores dos dedos. Esses indivíduos tem, por conseguinte, dificuldade na deambulação, escoliose, disfagia, palato arqueado, insuficiência ventilatória, deformidades nos pés, deformidades torácicas e contratatura dos membros superiores e inferiores.

Em 2000, surgiu a classificação atual da MN, baseada nas manifestações clínicas e na idade de seu aparecimento (WALLGREN-PETTERSON e LAING, 2000). A MN é classificada em formas congênita grave, típica, congênita intermediária, leve escolar ou juvenil, adulta, e outras formas associadas à cardiomiopatia, à oftalmoplegia e à presença de corpos nemalínicos à biópsia muscular.

A dosagem de enzimas musculares é de pouca ajuda para o diagnóstico da MN já que os níveis séricos podem ser normais. A creatinaquinase (CK), quando

elevada, pode chegar a cinco vezes o valor normal (WALLGREN-PETTERSSON, 1989; FARDEAU e TOMÉ, 1994; WALLGREN-PETTERSSON, 1996; NORTH *et al.*, 1997).

A eletroneuromiografia pode ser normal, apresentar padrão miopático ou neuropático, conforme a evolução da doença (WALLGREN-PETTERSSON, 1989; DUMITRU, 1995).

A biópsia muscular, observada pela técnica de coloração Tricromo de Gomori modificado, revela os bastões violeta típicos da MN (CONEN *et al.*, 1963; SHY *et al.*, 1963; WERNECK, 1981; WERNECK *et al.*, 1983; DUBOWITZ, 1985; SHIMOMURA e NONAKA, 1989; FARDEAU e TOMÉ, 1994; NORTH *et al.*, 1997) em meio às miofibrilas azul-esverdeadas, podendo estar agregados ao subsarcolema ou entre miofibrilas. Esses bastões característicos não são visualizados através da hematoxilina-eosina e com as técnicas da ATPase. Na técnica ATPase, a MN tipicamente apresenta predominância de fibras tipo I (MARTIN e RENIERS, 1968; RADU e IONESCU, 1972; WALLGREN-PETTERSSON *et al.*, 1988; SRETER *et al.*, 1976; NONAKA *et al.*, 1989_a; NONAKA *et al.*, 1989_b; SHIMOMURA e NONAKA, 1989; WALLGREN-PETTERSSON, 1996; NORTH *et al.*, 1997; IMOTO e NONAKA, 2001).

A imunohistoquímica tem um papel importante e crescente no estudo da MN, informando a natureza dos defeitos estruturais. Há diversas publicações que revelam a expressão positiva e negativa das proteínas musculares nebulina, alfa-actinina, miosina, titina, desmina e distrofina na fibra muscular e nos bastões (YAMAGUCHI, 1982; van der VEN *et al.*, 1995; NORTH *et al.*, 1997; SEWRY, 1998; IMOTO e NONAKA, 1999; SEWRY *et al.*, 2000; GURGEL-GIANETTI *et al.*, 2001).

O estudo genético da MN foi fundamental na década de 90, caracterizando a doença como heterogênea e identificando mutações em genes específicos de proteínas do filamento fino (WALLGREN-PETTERSSON, 2001). Até o presente momento, foram identificados os genes da alfa-tropomiosina (TPM3), da nebulina (NEB), da alfa-actina (ACTA1), da beta-tropomiosina (TPM2), da troponina 1 (TNNT1) e da cofilin-2 (CFL2). As mutações do gene da nebulina são as mais freqüentes e correlacionadas principalmente com a forma clínica típica. As mutações no gene da actina correspondem a 15% dos casos e as mutações dos

genes TPM2, TPM3 e CFL2 são raras. A forma ligada à TNNT1 está relacionada à MN descrita nos membros da comunidade Amish.

O presente estudo tem como finalidade a avaliação da expressão das proteínas musculares nebulina, miosina e desmina através de imunohistoquímica, relacionando os achados com o padrão da eletroneuromiografia e com a localização e percentual dos *rods* nas fibras musculares.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

Miopatias congênitas, descritas desde 1956 (FARDEAU e TOMÉ, 1994), são desordens musculares que se apresentam precocemente na infância com hipotonia, fraqueza muscular generalizada e pouco desenvolvimento muscular, acompanhadas de alterações dismórficas como fácies alongada, escoliose, deformidades das coxas e dos pés.

Em 1963, Conen *et al.* descreveram um novo tipo de miopatia congênita, não-progressiva, associada com grande quantidade de estruturas minúsculas, em forma de bastões, dentro das fibras musculares. Tratava-se de um menino, atendido aos quatro anos de idade por fraqueza muscular generalizada. Apresentou dificuldade prévia de sugar e incapacidade de deambular até os 22 meses. Progrediu com dificuldade de subir escadas, de correr e até de se levantar, além de apresentar disfagia. Ao exame físico, havia fraqueza muscular generalizada, com comprometimento da musculatura proximal de membros inferiores. Os reflexos profundos eram normais. Apresentava palato arqueado e deformidade do tórax. Foi acompanhado por um ano, durante o qual os parâmetros clínicos não se deterioraram. A eletroneuromiografia apresentava padrão miopático. Na biópsia muscular observa-se pequenas partículas que ocupavam 1/4 a 1/2 do diâmetro da fibra muscular. Os autores as denominaram de miogrânulos. No mesmo ano, Shy *et al.* (1963) descreveram um caso semelhante, denominando as partículas anormais da histologia de corpos nemalínicos por serem estruturas filamentosas (*nema* em grego significa fio). O termo utilizado por Shy *et al.* (1963) preponderou e atualmente essa miopatia congênita recebe o nome de miopatia nemalínica (MN), cujas estruturas filamentosas anormais recebem o nome de corpos nemalínicos ou *rods*.

Martin e Reniers (1968) descreveram um paciente masculino de 16 anos de idade, que aos dois anos e meio tinha dificuldade de deambular, sendo que aos seis ou sete anos a fraqueza muscular generalizada era evidente, simétrica e

predominante nos membros superiores e inferiores. Os reflexos profundos eram normais. Neste período não houve progressão da doença. A eletroneuromiografia apresentava o padrão miopático. A biópsia muscular enfatizou os bastões (*rods*) e o predomínio de fibras do tipo I sobre as raras do tipo II.

Após este período muitos casos de MN de curso lento ou não-progressivo foram descritos, todos com fraqueza muscular, hipotonia, retardo no desenvolvimento motor, face alongada, palato arqueado e deformidades ósseas, porém sempre com inteligência normal (SRETER *et al.*, 1976).

Werneck *et al.* (1983) descreveram o primeiro caso de miopatia nemalínica no Brasil. Tratava-se de criança do gênero masculino que evoluiu com hipotonia e disfagia a partir do terceiro dia de vida, necessitando de gastrostomia permanente. Apresentava retardo no desenvolvimento motor. A eletromiografia sugeria envolvimento muscular primário. A biópsia muscular, processada a fresco, com histoquímica e microscopia eletrônica, revelou corpos nemalínicos em até 2/3 das fibras, deficiência de fibras tipo II e espessamento variável das linhas Z numa mesma miofibrila.

Na década de 90, baseando-se na progressão da doença nos diferentes casos descritos até então, vários pesquisadores sugeriram a primeira classificação clínica da miopatia nemalínica (NONAKA *et al.*, 1989_a; NONAKA *et al.*, 1989_b; SHIMOMURA e NONAKA, 1989; WALLGREN-PETTERSSON, 1989). Reconheceram-se três formas: a) miopatia neonatal grave; b) miopatia congênita não-progressiva ou lentamente progressiva; c) forma de início na vida adulta.

Em 1995, foram descritos detalhadamente 10 afetados de uma família australiana com MN (LAING *et al.*, 1995). Os sintomas iniciaram por volta de dez anos de idade, evoluindo com fraqueza muscular de predomínio distal, forma de herança autossômica dominante e o estudo molecular detectou mutação no gene da tropomiosina-3.

North *et al.* (1997) sugeriram uma nova classificação clínica que então descrevia quatro formas de miopatia nemalínica: neonatal grave, congênita moderada (clássica), forma de início tardio na infância e forma adulta. A forma de início tardio na infância corresponde à descrição dos casos da família australiana. A forma clássica foi destacada e chamada de *mainstream form* por ser a mais frequente. Nessa forma, as manifestações clínicas (hipotonia, distúrbio na

deglutição e distúrbios respiratórios) aparecem ao nascer ou no primeiro ano de vida. O curso da doença é estável ou lentamente progressivo.

Em 1998, no Workshop Internacional de Miopatia Nematínica (WALLGREN-PETTERSSON *et al.*, 1998) mostrou-se que a acinesia fetal pode ser causada por miopatia nematínica. Relataram-se oito casos com morte fetal, apresentando deformidade craniofacial e pulmonar, e artrogripose associada à presença de corpos nematínicos à biópsia muscular.

Baseando-se em novas descrições e sugestões de nova classificação, em 2000, membros do Consórcio Internacional de Miopatia Nematínica (WALLGREN-PETTERSSON e LAING, 2000) sugeriram a classificação clínica atual:

- a) Forma congênita grave;
- b) Forma típica;
- c) Forma congênita intermediária;
- d) Forma leve escolar ou juvenil;
- e) Forma adulta;
- f) outras formas.

Em 2000, foi caracterizada uma nova forma em membros da comunidade Amish (JOHNSTON *et al.*, 2000). Os pacientes apresentavam hipotonia, contraturas e tremores ao nascimento, evoluíam com fraqueza muscular progressiva, associada ao *pectus carinatum* e óbito no segundo ano de vida. Nessa forma o defeito foi descrito no gene da troponina.

Em 2002, Gommans *et al.* descreveu uma família composta de 24 doentes com MN e 22 pessoas sadias. A manifestação clínica caracterizou-se por movimentos lentos, motivo pelo qual os doentes eram incapazes de correr e pular, mas conseguiam caminhar por horas. Além disso, havia as manifestações típicas da MN como fraqueza nos músculos flexores do pescoço e proximais dos membros. A musculatura facial, dorsiflexora dos pés e respiratória era normal. A MN foi progressiva, especialmente após a quinta década de vida, mas nenhum paciente perdeu a capacidade de realizar suas atividades diárias ou ficou restrito à cadeira de rodas.

2.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A MN é definida como uma desordem neuromuscular caracterizada por fraqueza muscular e presença de corpos nemalínicos nas fibras musculares, na ausência de outras entidades associadas a esses miogrânulos, como miopatias mitocondriais, miopatia congênita tipo *central core*, distrofia muscular, polimiosite e miopatia pelo HIV (WALLGREN-PETTERSSON, 1996; FEINBERG *et al.*, 1998; PALLAGI *et al.*, 1998). É uma forma rara de miopatia congênita cuja incidência é estimada em um a cada 500 mil nascidos vivos (WALLGREN-PETTERSSON *et al.*, 1990).

A distribuição da fraqueza muscular é constante: predomina nos músculos faciais, flexores cervicais e do tronco, dorsiflexores dos pés e extensores dos dedos. O comprometimento da musculatura distal das cinturas escapular e pélvica é muito mais evidente do que na musculatura proximal dos membros. Os pacientes apresentam hipotonia generalizada, dificuldade para deambulação, disfagia, insuficiência respiratória e distúrbios como as deformidades dos pés, hipomímia, palato arqueado, língua pequena, hiper mobilidade de articulações, escoliose, tórax em pombo, síndrome da espinha rígida, contraturas nos membros superiores e/ou inferiores e artrogripose (MARTIN e RENIERS, 1968; SRETER *et al.*, 1976; WALLGREN-PETTERSSON, 1989; RIFAI *et al.*, 1993; BAROHN *et al.*, 1994; TOPALOGU *et al.*, 1994; van der VEN *et al.*, 1995; NORTH *et al.*, 1997; SASAKI *et al.*, 1997; WALLGREN-PETTERSSON *et al.* 1998; WALLGREN-PETTERSSON e LAING, 2000; WALLGREN-PETTERSSON e LAING, 2001).

A miopatia neonatal grave afeta lactentes, nos primeiros meses de vida, e se caracteriza por fraqueza muscular generalizada. O parto é frequentemente difícil, sendo necessária a assistência ventilatória imediata para o neonato. Há hipotonia com pouca atividade muscular espontânea, contraturas articulares e deformidades nos pés, clinodactilia e pregas simiescas, arreflexia e ausência do reflexo de Moro. Há dificuldade em sugar e deglutir, com infecções broncopulmonares de repetição, que ainda podem ser exacerbadas por refluxo esofagogástrico. Falência respiratória, cardiomiopatia dilatada e infecções pulmonares de repetição causam a morte nas primeiras semanas ou meses de vida (CONEN *et al.*, 1963; SHY *et al.*, 1963; WERNECK *et al.*, 1983; NONAKA *et al.*, 1989a; SHIMOMURA e NONAKA, 1989; RIFAI *et al.*, 1993; BAROHN *et al.*, 1994; NORTH *et al.*, 1997; SASAKI *et al.*, 1997; GURGEL-GIANETTI *et al.*, 2001; RYAN *et al.*, 2001).

A miopatia não-progressiva ou lentamente progressiva é a forma típica e mais frequente da miopatia nemalínica. A hipotonia e a dificuldade de alimentação são frequentes na fase neonatal, mas não são tão importantes como na forma neonatal grave. Os músculos são pequenos e as extremidades finas. O envolvimento muscular é difuso e simétrico. A fraqueza muscular proximal causa marcha anserina e o sinal de Gower. Há fraqueza muscular distal nos membros, nos músculos flexores do pescoço e musculatura do tronco. Os músculos faciais e mastigatórios são marcadamente afetados, conferindo à face um aspecto fino e de boca aberta. Os músculos extraoculares são preservados, motivo da rara descrição de ptose e oftalmoplegia (WRIGHT *et al.*, 1997; RIGGS *et al.*, 1994). A voz é anasalada. A capacidade vital está diminuída. Há arreflexia ou hiporreflexia. Não há anormalidades sensitivas ou disfunção cognitiva. Há dismorfismo: palato arqueado, micrognatia ou prognatismo, deformidades torácicas, contraturas dos dedos, pés cavos e equinovaros. Em muitos casos, a astenia não é progressiva e permanece compatível com um bom grau de atividade. Entretanto, as crianças mostram pequena deterioração em suas habilidades motoras. Cifoesciose grave pode desenvolver-se na adolescência e piorar a dificuldade respiratória. Pode haver associação com síndrome da espinha rígida. Anormalidades cardíacas não são raras, manifestando-se abruptamente. Uma em cada cinco crianças morrem nos primeiros seis anos de vida (MARTIN e RENIERS, 1968; RADU e IONESCU, 1972; SRETER *et al.*, 1976; NONAKA *et al.*, 1989_a; SHIMOMURA e NONAKA, 1989; WALLGREN-PETTERSSON, 1989; NORTH *et al.*, 1997; RIFAI *et al.*, 1993; SASAKI *et al.*, 1997; TOPALOGLU *et al.*, 1994; GURGEL-GIANETTI *et al.*, 2001; RYAN *et al.*, 2001).

A miopatia de início na fase adulta inclui casos com diferentes apresentações clínicas. Em alguns pacientes, há fraqueza muscular mínima, durante a adolescência, que progride lentamente e resulta em um déficit motor mais marcado na velhice. Em outros pacientes, o envolvimento da musculatura permanece assintomático, sendo descoberto quando há investigação de alguma miocardiopatia ou investigação genética na família. Em outros casos, a fraqueza muscular proximal e distal começa na quarta ou na quinta década da vida, sem nenhum sintoma precedente ou história familiar (NONAKA *et al.*, 1989_b; SHIMOMURA e NONAKA, 1989; RYAN *et al.*, 2001). A forma adulta conhecida como Miopatia Nemalínica Esporádica de Início Tardio é associada ao HIV e

gamopatia monoclonal (SANTICS *et al*, 2008; CHAHIN *et al.*, 2005). A MN associada ao HIV pode apresentar-se precocemente no curso da AIDS quando outros achados típicos da infecção ainda não são aparentes. A razão da associação com gamopatia monoclonal e o papel da gamopatia na patogenese da MN não é conhecida.

2.3 CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA

Atualmente, classifica-se a MN em seis formas clínicas, conforme o Consórcio Internacional de Miopatia Nematínica (WALLGREN-PETTERSSON e LAING, 2000). Cada forma tem as características específicas descritas abaixo:

- a) Forma congênita grave: caracteriza-se por ausência de movimentos respiratórios e em membros, associados à presença de contraturas e fraturas ao nascimento. Cardiomiopatia, oftalmoplegia e presença de corpos nemalínicos intranucleares constituem critérios de exclusão dessa forma;
- b) Forma típica: apresenta início precoce na infância, com atraso nas aquisições motoras, chegando, porém, a atingi-las. Presença de fraqueza muscular predominante na musculatura facial, bulbar, respiratória e flexora cervical. Nos membros, nota-se fraqueza, inicialmente proximal, e posterior comprometimento distal. O curso clínico é lento ou sem progressão. Critérios de exclusão são os mesmos para forma congênita grave;
- c) Forma congênita intermediária: tem início nos dois primeiros anos de vida. Os pacientes apresentam movimentos normais da respiração e dos membros ao nascerem, mas, na idade escolar, evoluem com insuficiência respiratória, incapacidade para sentar ou andar, parando de deambular geralmente antes dos onze anos de idade. Desenvolvem retrações fibrotendíneas precocemente;
- d) Forma leve escolar ou juvenil: tem início na idade escolar ou juvenil. Não apresenta comprometimento da musculatura facial ou distal de membros;
- e) Forma adulta: tem início na idade adulta e não apresenta comprometimento da musculatura facial;

- f) outras formas: são as formas associadas à cardiomiopatia, à oftalmoplegia, à distribuição não usual da fraqueza muscular e à presença de corpos nemalínicos intranucleares à biópsia muscular.

Dados do consórcio mostram que a forma típica é a mais frequente. A menor incidência dos casos neonatais graves e das formas leves, no entanto, deve ser analisada com cautela, uma vez que há dificuldade no seu diagnóstico. Os casos graves evoluem rapidamente para a morte, enquanto as formas leves podem passar despercebidas por causa da escassez de sinais e sintomas.

2.4 EXAMES COMPLEMENTARES

Os exames laboratoriais são muito limitados e de pouca ajuda ao diagnóstico da miopatia nemalínica. Destacam-se a dosagem de enzimas musculares e a eletroneuromiografia (ENMG).

Em relação às enzimas musculares, a mais utilizada é a CK, que pode ser normal ou pouco elevada, chegando até a cinco vezes o valor normal (WALLGREN-PETTERSSON, 1989; FARDEAU e TOMÉ, 1994; WALLGREN-PETTERSSON, 1996; NORTH *et al.*, 1997). Dosam-se também aldolase, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e desidrogenase láctica (LDH).

O exame de ENMG mostra um variado espectro de achados nos pacientes acompanhados durante a evolução da doença (WALLGREN-PETTERSSON, 1989; DUMITRU, 1995). As velocidades de condução nervosa sensitiva e motora são normais. Na eletromiografia de agulha (EMG), geralmente, há discretas anormalidades em pacientes antes dos três anos de idade. Poucos pacientes têm padrão miopático: potenciais de ação de unidade motora (PAUM), polifásicos, de curta duração e pequena amplitude. Atividade muscular espontânea, como fibrilações e ondas positivas, são raras. Entre quatro e dez anos de idade, há um aumento na incidência de anormalidades: a maioria dos pacientes tem presença de PAUM polifásicos, de curta duração e de baixa amplitude. Há muitos PAUM normais, mas os anormais são predominantes. Após os 11 anos de idade, há poucos PAUM normais, predominando os PAUM de longa duração e amplitudes aumentadas. O padrão de recrutamento está diminuído (DUMITRU, 1995).

2.5 OUTROS EXAMES COMPLEMENTARES

São descritas alterações na tomografia computadorizada de músculos, como infiltração gordurosa difusa em abdome, tronco e cintura escapular em pacientes idosos (GOMMANS *et al.*, 2002). Achados de ressonância magnética evidenciam o envolvimento seletivo da musculatura da coxa e do compartimento anterior das pernas, poupando o gastrocnêmio (JUNGBLUTH *et al.*, 2004). Nos pacientes com mutação do gene da nebulina, há descrição desde o envolvimento seletivo dos músculos tibial anterior e soleus (casos leves de MN) até o envolvimento dos retos femorais, vastos laterais, tibial anterior e soleus (casos moderados de MN). Nos pacientes com mutação do gene da alfa-actina, há envolvimento difuso da musculatura da coxa e das pernas (JUNGBLUTH *et al.*, 2004).

2.6 HISTOLOGIA E HISTOQUÍMICA

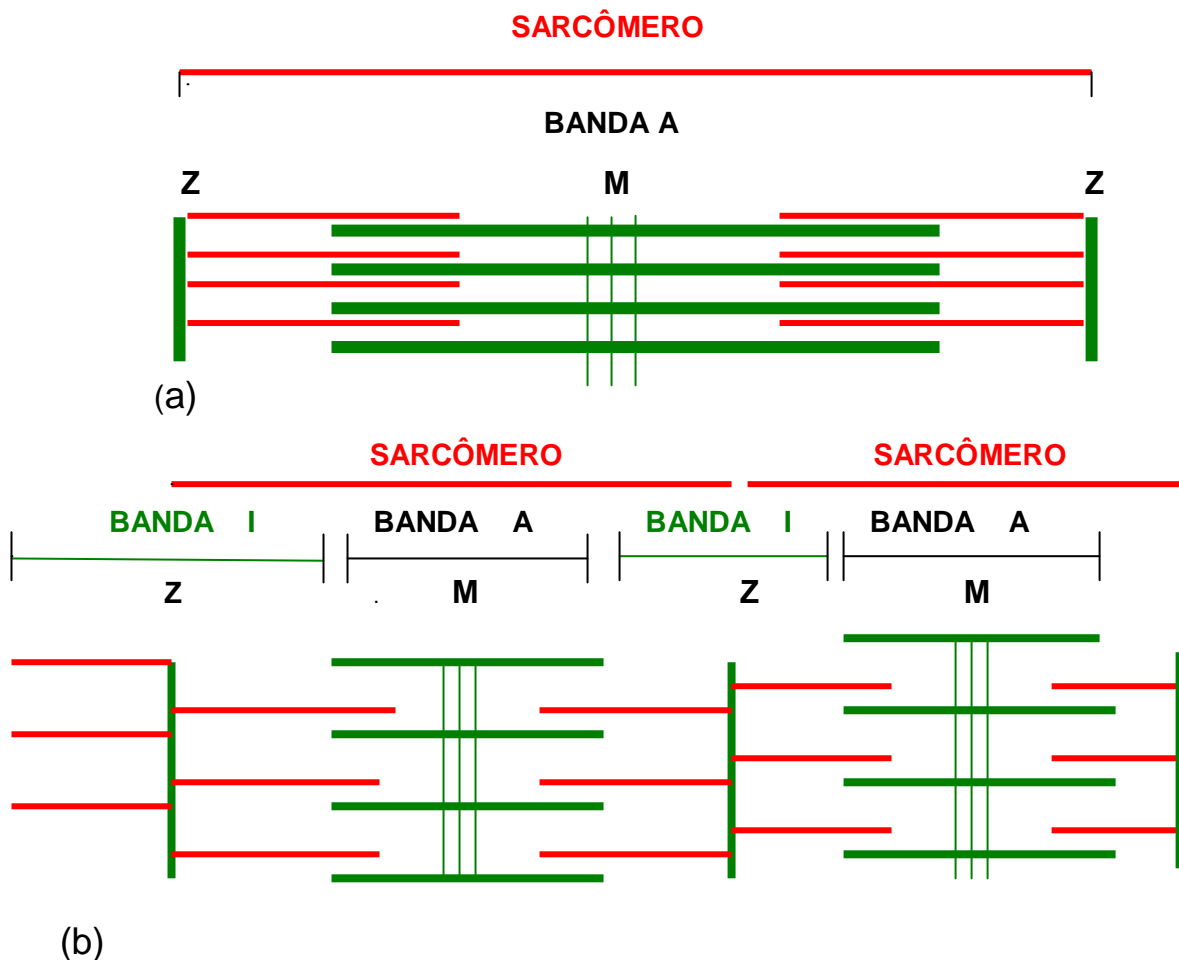
A avaliação da reação do tecido muscular à doença é realizada através da análise histoquímica da biópsia muscular. A técnica permite a determinação do tipo de fibras musculares, das alterações morfológicas dessas fibras e as alterações estruturais que são típicas de determinadas doenças (FARDEAU e TOMÉ, 1994).

2.6.1 Estrutura protéica das fibras musculares

A estrutura organizada e bem definida do músculo estriado reflete sua função: contração muscular (geração de movimento e força numa direção específica).

As fibras musculares estriadas são células únicas, multinucleadas e rodeadas de uma membrana, que possuem alguns centímetros de extensão e 10 a 100 μm de diâmetro. As fibras são formadas de numerosas miofibrilas com aproximadamente 1 a 3 μm de diâmetro, sendo que cada uma delas é envolvida pelo retículo endoplasmático e dispostas paralelamente ao eixo da fibra muscular.

As fibrilas são estriadas, configurando o aspecto estriado ao músculo como um todo. O padrão estriado se repete numa periodicidade de 1 a 3 μm . Esta unidade repetida denomina-se sarcômero e é considerada a unidade contrátil fundamental do músculo estriado. O sarcômero tem, em cada extremidade, uma região escura e fina chamada linha Z. Essa linha Z fica no meio de uma região chamada banda I, que é uma região clara da qual cada metade pertence a um dos sarcômeros adjacentes. O centro do sarcômero é escuro e constitui a banda A, cujo centro abriga uma região mais clara, chamada zona H. Este padrão de distribuição de bandas é caracterizado desta forma devido ao arranjo das miofibrilas. A banda A contém miofilamentos grossos dispostos paralelamente ao eixo da fibra. Cada metade da banda I contém miofilamentos finos que se prendem a linha Z, dirigindo-se à banda A e se sobrepondo aos miofilamentos grossos. A zona H é menos densa do que o restante da banda A pela ausência da sobreposição desses miofilamentos (figura 1) (CRAIG, 2004).



(b)
Figura 1 – Constituição do à microscopia elêtronica – unidade funcional do músculo estriado – no gráfico superior (a), e representação de dois sarcômeros no gráfico inferior (b), as linhas Z limitantes e as várias bandas. Modificado de CRAIG, R. *Molecular Structure of the Sarcomere*. In: ENGEL, G.A.; FRANZINI-ARMSTRONG, C., *Myology*, 3. ed. New York: McGraw-Hill, 2004. p. 130.

Os filamentos finos e grossos são ambos polímeros de moléculas protéicas não covalentes. A miosina é a maior constituinte dos filamentos grossos enquanto que a actina é a maior constituinte dos filamentos finos. Juntas, actina e miosina, constituem 70% das proteínas miofibrilares. Os filamentos grossos ainda são formados por outras proteínas: proteína C, proteína H, proteína X, AMP deaminase, proteína M, creatinaquinase e são associados à proteína gigante titina, que estende-se até a banda I e chega à linha Z. Os filamentos finos também contêm outros componentes, além da actina, como a troponina, a tropomiosina e a proteína gigante nebulina. Há, provavelmente, duas moléculas de nebulina para cada filamento fino, acompanhando-o em toda sua extensão, desde a linha Z até sua extremidade final. Parece que a atuação da nebulina está no controle preciso da contração muscular independente da espessura da fibra muscular, mas intimamente relacionado ao comprimento da fibra (nebulina de diferente tamanho para diferentes comprimentos) (figura 2) (CRAIG, 2004).

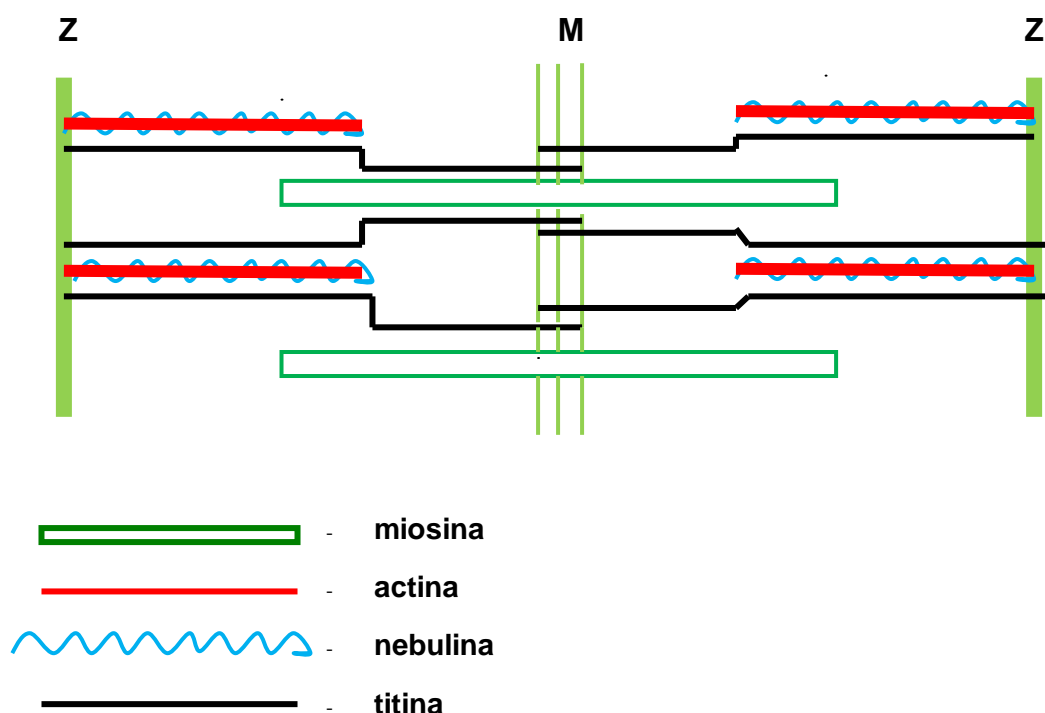


Figura 2 – Constituição protéica do sarcômero. Modificado de CRAIG, R. *Molecular Structure of the Sarcomere*. In: ENGEL, G.A.; FRANZINI-ARMSTRONG, C., *Myology*. 3. ed. New York: McGraw-Hill, 2004. p. 131.

As proteínas podem ser divididas em três grupos: proteínas que constituem os filamentos contráteis, estruturais e ligadas à membrana muscular. Vamos discutir alguns aspectos relativos às principais proteínas musculares.

2.6.1.1 Proteínas dos filamentos contráteis

a) Filamento fino:

I) Actina

Principal componente do filamento fino, corresponde a 20% das proteínas miofibrilares e é essencial para manutenção da estrutura e motilidade da célula. Sua função na fibra muscular é participar do mecanismo de contração muscular (DUBOWITZ, 1985; WALLGREN-PETTERSSON *et al.*, 1995).

Constituída por uma sequência de 364 aminoácidos, o seu funcionamento provém do equilíbrio entre duas isoformas: G-actina (globular) e F-actina (filamentar). Existem isoformas de actina para o músculo esquelético, músculo cardíaco, músculo liso e ainda isoformas não musculares. Duas isoformas são expressas no músculo esquelético humano: alfaesquelética e alfacardíaca. No músculo esquelético embriônico, a actina cardíaca é a principal isoforma, sendo rapidamente substituída pela forma esquelética, no período pós-natal. No músculo cardíaco fetal, a isoforma cardíaca é prevalente, enquanto, no músculo cardíaco adulto, a isoforma esquelética compreende 60% da actina desse tecido. O gene codificador da isoforma músculo esquelético é o ACTA 1, localizado no cromossomo 1q42.1, enquanto o gene codificador da isoforma cardíaca é ACTC, localizado no cromossomo 15q13.2. Mutações no gene ACTC relacionam-se à miocardiopatia dilatada. Mutações no gene ACTA 1 estão relacionadas a miopatia congênita com excesso de filamentos finos e com a miopatia nemalínica (PALLAGI *et al.*, 1998).

II) Tropomiosina

Sua função é estabilizar o filamento de actina e posicionar a molécula de troponina, sensível ao cálcio, em relação ao filamento de actina, durante a

interação actinmiosina. É uma molécula de dupla hélice correspondendo a uma sequência de 284 aminoácidos (DUBOWITZ, 1985). Os vertebrados tem pelo menos quatro genes para tropomiosina, que são nomeados TPM1, TPM2, TPM3 e TPM4. O TPM1 codifica a alfa-tropomiosina rápida (15q21), o TPM3 relaciona-se à alfa-tropomiosina lenta (1q22-q23) e o TPM2 codifica a beta-tropomiosina (9p13.2-p13.1). A dupla hélice da tropomiosina é formada por uma isoforma alfa e uma isoforma beta, e reage com sete moléculas de actina. A expressão das isoformas de tropomiosina é diferente nos tipos de fibras musculares: nas fibras musculares de contração lenta, há a isoforma alfa-tropomiosina lenta e a beta-tropomiosina; nas fibras de contração rápida, encontram-se as isoformas alfa-tropomiosina rápida e beta-tropomiosina. Mutações nos genes TPM3 e TPM2 estão relacionadas com a miopatia nemalínica (LAING *et al.*, 1995; MICHELE *et al.*, 1999; TAN *et al.*, 1999).

b) Filamento grosso:

l) Miosina

É o maior constituinte do filamento grosso e corresponde a 54% das proteínas miofibrilares.

É constituída por duas cadeias pesadas e quatro cadeias leves e é concomitantemente uma proteína estrutural e uma enzima. Sendo responsável pela atividade ATPase (DUBOWITZ, 1985).

As fibras musculares podem ser classificadas por meio de sua propriedade contrátil e pela histoquímica na reação ATPase pH 4,3 e pH 9,4. As fibras tipo I tem como característica serem fibras de contração lenta; com capacidade oxidativa alta e anaeróbica baixa; com grande volume de mitocôndrias; alto de enzimas oxidativas e baixo de enzimas glicolíticas; com coloração escura na reação ATPase pH 4,3 e clara na ATPase pH 9,4. As fibras tipo II tem como característica serem fibras de contração rápida e podem ser divididas em tipo IIA e IIB. As fibras tipo IIA são fibras de contração rápida; com capacidade oxidativa e anaeróbica moderadas; com moderado volume de mitocôndrias, enzimas oxidativas e glicolíticas; com coloração intermediária na reação ATPase pH 4,3 e pH 9,4. As fibras tipo IIB

são também de contração rápida; com capacidade oxidativa baixa e anaeróbica alta; com pequeno volume de mitocôndrias, baixo de enzimas oxidativas e alto de glicolíticas; com coloração clara na ATPase pH 4,3 e escura na ATPase pH 9,4 (WATRAS, 2004).

2.6.1.2 Proteínas estruturais

a) Nebulina

É uma proteína gigante do citoesqueleto da fibra muscular que corresponde a 3-4% das proteínas miofibrilares e tem a função de regular o comprimento do filamento fino e manter a posição da banda Z no sarcômero (LBEIT e KOLMERER, 1995; PFUHL *et al.*, 1996; MILLEVOI *et al.*, 1998; IMOTO *et al.*, 1999; PELIN *et al.*, 1999; GURGEL-GIANETTI *et al.*, 2001; PELIN *et al.*, 2002; WALLGREN-PETTERSSON *et al.*, 2002). Sua extremidade C-terminal ancora na banda Z, e sua extremidade N-terminal se projeta para dentro da banda I, formando o suporte para organização do filamento fino. A nebulina é codificada pelo gene NEB, localizado no cromossomo 2q24.2 e as mutações neste gene estão relacionadas com as formas recessivas de miopatia nemalínica (PFUHL *et al.*, 1996; PELIN *et al.*, 2002).

b) Alfa-actinina

Localiza-se na banda Z e ajuda a ancorar os filamentos de actina e tem expressão em ambos tipos de fibras (tipo I e tipo II). É codificada pelo gene ACTN2 no cromossomo 1q42-q43 (NOWAK, 1999).

c) Alfa-actinina 3

É expressa somente nas fibras tipo II, e é codificada pelo gene ACTN3 no cromossomo 11q13-q14 (NOWAK, 1999).

d) Desmina

É uma subunidade músculo específica, pois forma os filamentos intermediários. É presente em grandes quantidades nas fibras musculares no período fetal. Depois há redução progressiva, persistindo em pequenas quantidades após o período gestacional. Apresenta também modificações

em sua distribuição, no interior da fibra muscular, formando inicialmente filamentos livres no citoplasma para, depois, localizar-se em torno das miofibrilas na região da banda Z (van der VEN *et al.*, 1995).

A presença de áreas de acúmulo dessa proteína na fibra muscular tem conotação patológica e pode representar uma imaturidade ou um processo de regeneração da fibra muscular.

É codificada em um gene localizado no cromossomo 2q35. Mutações neste gene estão relacionados a uma forma de miopatia e cardiomiopatia associada com depósitos de desmina no tecido muscular (GOEBEL, 2003).

2.6.1.3 Proteínas ligadas à membrana muscular

a) Distrofina

Representa 0,002% de toda proteína do músculo esquelético (DUBOWITZ, 1985; FARDEAU e TOMÉ, 1994). Apresenta as isoformas muscular e não muscular. No tecido muscular, localiza-se na região sub-sarcolemal. Sugere-se que tenha como função ancorar o citoesqueleto interno à membrana da fibra, bem como manter a distribuição espacial das proteínas do complexo de glicoproteínas associadas.

É codificada pelo gene distrofina localizado no cromossomo Xp21.2. Mutações deste gene levam às distrofias musculares progressivas tipo Duchenne e Becker.

2.6.2 **Corpos nemalínicos**

Os corpos nemalínicos ou *rods* são o marco da miopatia nemalínica, sendo que a melhor técnica para sua detecção em biópsias é a coloração pelo tricromo de Gomori modificado (CONEN *et al.*, 1963; SHY *et al.*, 1963; WERNECK, 1981; SHIMOMURA e NONAKA, 1989; FARDEAU e TOMÉ, 1994; NORTH *et al.*, 1997). Nas colorações enzimáticas histoquímicas, eles não se destacam e apresentam coloração negativa à ATPase.

Na coloração Tricromo de Gomori modificado há identificação de bastões vermelhos ou violeta em meio às miofibrilas azul-esverdeadas. Aparecem em fibras do tipo I ou tipo II, porém, mais comumente, em fibras tipo I. À microscopia

eletrônica, os bastões chegam a ter 1 a 7 μm em comprimento e 0,3 a 2 μm em largura e são distribuídos aleatoriamente na fibra muscular, mas têm a tendência de ficar em agregados abaixo do sarcolema (localização subsarcolemal), ou, senão, como pontilhados difusos no interior da fibra (localização intermiofibrilares) ou, em padrão misto combinando as duas primeiras localizações. A localização dos *rods* parece estar correlacionada com a idade dos pacientes, mostrando predomínio de *rods* no subsarcolema de pacientes mais jovens, enquanto, nos mais velhos, há predomínio de *rods* intermiofibrilares (WALLGREN-PETTERSSON, 1989). Há descrições de bastões intranucleares (coloração de azul de toluidina) nas formas neonatal severa e adulta (RIFAI *et al.*, 1993; BAROHN *et al.*, 1994; GOEBEL e WARLO, 1997). Os *rods* intranucleares são maiores que os sarcoplasmáticos, usualmente solitários, e têm uma aparência cristalina com padrão ultra-estrutural típico das linhas Z. Estão associados com maior envolvimento muscular e pior prognóstico.

À microscopia eletrônica (YAMAGUCHI *et al.*, 1982; DUBOWITZ, 1985; WALLGREN-PETTERSSON *et al.*, 1995), os *rods* se continuam estruturalmente com as linhas Z, são penetrados por filamentos finos que correm paralelos ao seu eixo longitudinal e possuem alfa-actinina (que é o principal componente das linhas Z). Na sua periferia também há acúmulo de desmina, proteína filamentar estrutural, que entra, da mesma forma, na estrutura das linhas Z. Na miopatia nemalínica há espessamento focal das bandas Z, provavelmente, no estágio inicial da formação dos corpos nemalínicos (van der VEN *et al.*, 1995).

2.6.3 Alterações das fibras musculares

À histopatologia da doença, verifica-se que há substituição das fibras musculares por tecido adiposo ou fibrose. A predominância das fibras tipo I é um achado comum na MN, sendo que alguns pacientes mostram exclusivamente fibras do tipo I ou pobre diferenciação entre as fibras (MARTIN e RENIERS, 1968; RADU e IONESCU, 1972; SRETER *et al.*, 1976; WALLGREN-PETTERSSON *et al.*, 1988; NONAKA *et al.*, 1989_a; NONAKA *et al.*, 1989_b; WALLGREN-PETTERSSON, 1996; NORTH *et al.*, 1997; IMOTO e NONAKA, 2001). Essa predominância e atrofia tendem a serem mais proeminentes com a idade e há uma completa deficiência de fibras tipo IIB e pobre diferenciação das tipo IIC. Menos

frequente é a descrição de aumento da fosfatase ácida relacionada aos casos de progressão rápida, o que sugere processo autodegenerativo, induzindo à ativação de enzimas lisossomiais que promovem a destruição celular (NONAKA *et al.*, 1989_a ; NONAKA *et al.*, 1989_b; SHIMOMURA e NONAKA, 1989; FARDEAU e TOMÉ, 1994).

2.7 IMUNOHISTOQUÍMICA

A imunohistoquímica tem um papel crescente e importante no campo das miopatias congênitas. Não tem o mesmo valor diagnóstico apresentado nas distrofias musculares, mas fornece informações importantes sobre a natureza dos defeitos estruturais que definem cada miopatia congênita, como identificação de defeitos primários, dependendo do efeito da mutação na expressão protéica, a natureza das anomalias estruturais dos componentes miofibrilares e compreensão do processo de maturação protéica (SEWRY, 1998).

As expressões das proteínas nebulina, alfa-actinina 2 e 3, miosina, titina, desmina e distrofina foram amplamente estudadas na década de 90, inclusive procurando a correlação entre a expressão positiva ou negativa das mesmas com a forma clínica da MN e o tipo de mutação genética (YAMAGUCHI *et al.*, 1982; van der VEN *et al.*, 1995; NORTH *et al.*, 1997; SEWRY, 1998; IMOTO *et al.*, 1999; SEWRY *et al.*, 2000; GURGEL-GIANETTI *et al.*, 2001).

A maioria dos estudos é a respeito da expressão da proteína nebulina, que é a proteína com gene localizado no cromossoma 2q.21-2q.22 e está relacionada à forma autossômica recessiva da MN. Em 1998, Sewry, publicou os achados da imunohistoquímica em vários tipos de miopatia congênita. Anticorpos antinebulina (anticorpos específicos para o terminal carboxila (terminal C), ancorado na linha Z) tiveram expressão positiva, não diferenciando as fibras musculares de pacientes com MN com pessoas normais. Aproximadamente um ano depois, em 1999, Imoto *et al.* publicaram um estudo da expressão da nebulina, através da imunofluorescência indireta, em cinco pacientes com MN. Foram utilizados anticorpos monoclonais e policlonais. Nesse estudo, também, os pacientes com MN e as pessoas normais mostraram expressão positiva para a nebulina na banda I, sem diferença entre fibras tipo I e fibras tipo II. Nos dois casos de MN forma congênita grave, porém, houve expressão discretamente reduzida da nebulina,

refletindo a degradação protéica nesses casos. Em 2000, Sewry *et al.* voltaram a publicar trabalhos relacionados a expressão da nebulina, em onze casos de MN, sabidamente com mutações no cromossoma 2q.22, sendo que oito casos tinham mutações confirmadas no gene da nebulina. Dessa vez, foram utilizados anticorpos antinebulina para o terminal C, região M176-181, região M 101-102 e região SH₃. Nenhum dos casos mostrou expressão completamente ausente da nebulina para o terminal C. Alguns pacientes mostraram expressão mais exacerbada para região M176-181, em fibras com miosina lenta, e outros pacientes mostraram expressão uniforme para região M 101-102 e região SH₃. Os dois casos de gêmeos mostraram ausência completa da expressão para região SH₃. Em 2001, Gurgel-Giannetti *et al.* publicaram a expressão da nebulina para terminal C, região M 176-181 e região 101-102, em 13 casos de miopatia nemalínica (dez com a forma típica, três com a forma congênita grave e um com a forma juvenil). Todos os pacientes tiveram expressão positiva, mas, distinto dos estudos até então publicados, foram observadas diferenças na estrutura dos *rods*. A maioria dos *rods* subsarcolemais tiveram expressão negativa para nebulina terminal C e expressão indiferente para região M176-181 e M 101-102. Os *rods* difusos tiveram expressão completamente negativa. Os pequenos *rods* tiveram expressão positiva. Duas irmãs com MN apresentaram padrões de expressão para terminal C diferentes, embora ambas tivessem mutação confirmada no gene da nebulina. Tais achados sugerem que as modificações na distribuição da nebulina, dentro dos *rods*, podem ocorrer com a progressão da doença.

Em relação à expressão protéica dos *rods*, sabe-se que são constituídos de alfa-actinina e rodeados de desmina (WALLGREN-PETTERSSON *et al.*, 1995; NORTH *et al.*, 1997; SEWRY, 1998). A imunomarcação com anticorpos para alfa-actinina, porém, não mostra aumento de expressão no local dos *rods*. Yamaguchi *et al.* (1982) sugeriram que isso se dá devido à alfa-actinina dos *rods* ser tão densa que não permite penetração dos anticorpos na estrutura. Sewry (1998) e Dubowitz (1985) mostraram que os *rods* têm expressão negativa para proteínas titina e nebulina, mas outros estudos não mostraram diferenças entre as fibras musculares normais e as fibras de pacientes com MN (NORTH *et al.*, 1997).

O gene da proteína titina também está localizado no cromossoma 2q e alterações de sua expressão podem estar associadas à MN. Estudos, porém, não mostraram alterações de expressão de titina em MN.

Em relação à miosina, o predomínio de fibras tipo I na MN está associado com a expressão aumentada e anormal de miosina fetal, miosina lenta e miosina rápida nas mesmas fibras musculares (NORTH *et al.*, 1997).

A expressão da distrofina é normal, mas a beta-espectrina tem expressão reduzida refletindo a imaturidade ou anormalidade na formação do citoesqueleto muscular (SEWRY, 1998).

2.8 GENÉTICA

A MN é uma doença hereditária e, desde 1965, as publicações a seu respeito se restringem a relatos de casos de famílias afetadas, sugerindo ser de natureza autossômica dominante ou autossômica recessiva (WALLGREN-PETTERSSON *et al.*, 1990; WALLGREN-PETTERSSON, 1998).

Laing *et al.* (1995) publicaram a relação entre a mutação no gene alfa-tropomiosina (TPM3) com a MN autossômica dominante, em uma família australiana com dez afetados vivos. Todos tinham fraqueza muscular com início na infância, antes dos dez anos de idade. A mutação, localizada no cromossoma 1p13-q25, substituiu a arginina por metionina no terminal nitrogenado da TPM3 e fortalece a ligação da tropomiosina com a actina, sendo responsável pela formação de *rods*. Em 1999, Michelle *et al.* estudaram a expressão da alfatropomiosina mutante da MN em miócitos de ratos adultos. O primeiro defeito detectado foi a diminuição da sensibilidade à contração muscular ativada pelo cálcio, que pode explicar a hipotonia que aparece na doença e interessantemente não resulta diretamente na formação de *rods*. Tan *et al.* (1999) descreveram uma mutação recessiva no gene TPM3 em paciente com a forma congênita grave, que faleceu aos 21 meses de idade. A mutação está no exon 1 da TPM3 (troca de CAG por TAG, no códon 31).

Em 1995, paralelamente à publicação de Laing *et al.*, Wallgren-Pettersson *et al.* apresentaram um estudo com sete famílias europeias com MN da forma autossômica recessiva, localizando o gene responsável no cromossoma 2q21.2-2q22. O gene candidato à mutação nesta região é o gene referente à proteína nebulina.

Em 1998, Millevoi *et al.* descreveram a estrutura da nebulina. A nebulina é uma proteína específica do músculo estriado, que está ligada à actina e regula o

comprimento do filamento fino. O terminal carbono da molécula está ligado ao disco Z enquanto o terminal nitrogenado se projeta na banda I. Localiza-se no cromossomo 2q22.

Desde então, têm sido publicados estudos com anticorpos antinebulina (monoclonais e policlonais) e técnica de imunofluorescência. Em março de 1999, Pelin *et al.* descreveram seis mutações do gene nebulina, associadas com a MN forma autossômica recessiva, em 22 famílias de origem étnica diferente. Todos os pacientes tinham a forma típica da doença e correlação com o cromossomo 2q. As mutações estavam localizadas no segmento M162-M185 do gene da nebulina e causavam uma perda na região do terminal carbono da proteína. Essa alteração, por consequência, leva a um distúrbio na ligação com a banda Z e à formação de *rods*. No mesmo ano, há descrição de expressão normal da nebulina em casos de miopatia nemalínica forma congênita progressiva e discretamente reduzida na forma neonatal severa (IMOTO *et al.*, 1999). Também em 1999, Walgreen-Pettersson *et al.* publicaram um estudo de MN, em 45 famílias de dez países diferentes. Nesse estudo, quarenta e uma famílias (forma típica, forma neonatal grave e outras formas de MN) apresentaram alteração do gene nebulina no cromossomo 2q22. Nas quatro demais famílias, não houve correlação com o *locus* da nebulina, nem com os genes da alfa-tropomiosina e alfa-actina.

Em outubro de 1999, Nowak *et al.* descreveram mutações no gene da alfa-actina, localizado no cromossomo 1q42, em pacientes com miopatia nemalínica. Dentre os 15 doentes estudados, onze tinham a forma congênita severa e quatro a forma típica. Foram identificadas 15 mutações, resultando em 14 alterações de aminoácidos.

Logo, de 1995 a 1999, foram identificados três genes que se correlacionam com a MN. Conforme a mutação identificada é dita MN1, MN2 ou MN3 como está descrito abaixo:

- a) Gene da alfa-tropomiosina (TPM3) localizado no cromossomo 1q21-23 e relacionado com a forma autossômica dominante (MN1);
- b) Gene da nebulina (NEB) localizado no cromossomo 2q22 e relacionado com a forma autossômica recessiva (MN2);
- c) Gene da alfa-actina (ACTA1) localizado no cromossomo 1q42.1 e relacionado com ambas as formas autossômica recessiva e dominante (MN3).

A partir de 2000, foram descritas mais mutações em mais dois genes relacionados à MN: o gene da beta-tropomiosina (TPM2) e o gene da troponina T1 (TNNT1).

A TPM2 foi encontrada em dois casos de 66 pacientes com MN forma típica estudados de 16 diferentes países (DONNER *et al.*, 2002). Entre eles, dezessete tinham a forma congênita grave, doze a forma típica, sete a forma leve escolar, quatro a forma congênita intermediária, treze outras formas e 13 não puderam ser classificados por dados insuficientes. As mutações afetavam a região da TPM2 do cromossomo 9p13.2-p13.1 no exon 4, posição 147, na paciente de origem alemã, e no exon 3, posição 117, no paciente de origem bosniano. É considerada uma forma rara de MN, autossômica dominante e dita MN4.

Em relação a T1, a mutação ocorre no exon 11 do gene da troponina 1, no cromossomo 19q13.4, em pacientes cuja característica é fazer parte de uma comunidade dita Amish, onde a taxa de consanguinidade é alta. Os doentes apresentavam hipotonia associada a deformidades torácicas e de quadril no primeiro ano de vida e evoluíam com insuficiência respiratória e óbito até dois anos de idade (JOHNSTON *et al.*, 2000).

Continuaram os estudos demonstrando anormalidades de expressão do gene nebulina na miopatia nemalínica. Sewry *et al.* (2000) descreveram a expressão imunohistoquímica da nebulina em onze casos de dez famílias, cuja mutação está no cromossomo 2q.22. Em oito pacientes, a expressão variou entre ausente até muito forte, conforme o local da mutação identificada:

- a) Expressão muito forte: mutação na região M176-M181;
- b) Expressão uniforme: mutação na região SH3;
- c) Expressão ausente: mutação no exon 185.

Em 2002, derrubando o conceito da MN associada à mutação do gene da nebulina apresentar-se clinicamente como forma típica, há descrição de cinco famílias com cinco casos de MN forma congênita grave associadas a mutações no gene nebulina (WALLGREN-PETTERSSON *et al.*, 2002). Os doentes não tinham movimentos respiratórios ao nascer e apresentavam contraturas ou fraturas em membros. Em quatro casos, havia polidrâmnio e artrogripose e, em dois, contraturas de tornozelo. A mutação foi identificada no exon 184 em três casos, no exon 172 e 181 em um e, no exon 157, no último caso.

Em 2002, Wattanasirichaigoon *et al*, pesquisaram a presença do gene TPM3 em 40 pacientes americanos com MN. Encontraram em um único caso uma mutação do gene TPM3, concluindo ser esta mutação uma causa rara de MN.

Em 2007, foi publicado relato de 2 casos de MN forma típica em irmãs cuja investigação genética identificou a mutação no gene CFL2 (AGRAWAL *et al.*, 2007). Ambas apresentaram hipotonia desde o nascimento, dificuldade de deambulação com quedas frequentes e incapacidade para correr. A irmã maior evoluiu com parada de deambulação e necessidade de uso de cadeira de rodas. A irmã menor recebeu o diagnóstico de MN aos 2 anos de idade através da biópsia muscular evidenciando corpos nemalínicos. Ambas as irmãs evoluíram como MN forma típica, porém, com fraqueza muscular distinta, havendo em uma delas preservação da musculatura facial e de membros inferiores. Identificou-se, nestes casos, a mutação do gene CFL2, que codifica a proteína ligada a actina, cofilin-2 (AGRAWAL *et al.*, 2007).

A MN tem se mostrado geneticamente uma doença heterogênea, herança autossômica dominante ou recessiva e ainda algumas famílias apresentam diagnóstico clínico da doença e expressão de genes normal (WALLGREN-PETTERSSON e LAING, 2001).

As mutações patogênicas descritas, até o momento, relacionam-se a seis genes diferentes, responsáveis pela codificação de proteínas de filamento fino: TPM3, nebulina, actina, TPM2, troponina T1 e CFL2. Todas as mutações descritas levam à expressão de proteínas truncadas e não à deficiência total dessas proteínas. Dados do Consórcio Internacional de Miopatia Nemalínica de 2000 mostram que a forma clínica mais frequente é a típica, e está associada a mutações no gene da nebulina. As mutações no gene da actina associam-se à variabilidade fenotípica e correspondem a 15% dos casos. As formas ligadas aos genes TPM2 e TPM3 são raras, e a forma ligada à troponina T1 está relacionada à miopatia nemalínica descrita nos membros da comunidade Amish.

3 OBJETIVOS

- 3.1 Avaliar a expressão das proteínas musculares – nebulina, miosina, desmina - através da imunohistoquímica nos casos de MN.
- 3.2 Relacionar os achados da eletroneuromiografia com a expressão protéica presente ou ausente das técnicas de imunohistoquímica.
- 3.3 Relacionar a localização dos *rods* (subsarcolemal, intermiofibrilar ou misto) e a percentagem de fibras contendo rods com a expressão protéica da imunohistoquímica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

A população pesquisada consistiu-se de pacientes portadores de Miopatia Nematínica, diagnosticados e acompanhados no Serviço de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

A seleção dos pacientes foi feita a partir do laudo das biópsias musculares realizadas no período de 1984 a 2002 no Laboratório de Histoquímica do Serviço de Doenças Neuromusculares. Dentre 3245 biópsias, foram selecionados 13 casos com diagnóstico de Miopatia Nematínica. Posteriormente, foram excluídos cinco casos por não apresentarem material de biópsia em quantidade suficiente para análise de imunohistoquímica.

Alguns pacientes foram encaminhados de outros lugares para biópsia muscular, mas a maioria dos pacientes foi avaliada no ambulatório de Doenças Neuromusculares da Especialidade de Neurologia do Departamento de Clínica Médica e, a seguir, admitidos. Na admissão, foram submetidos a avaliação médico-neurológica e a um protocolo rotineiro do serviço com ênfase a queixas de dores musculares, fraqueza, dificuldades na locomoção, cainbras, diplopia, disfagia e disfonia. Então, seguiu-se um exame neurológico com descrição de atrofia e hipertrofia musculares, lordose, cifose, escoliose, contraturas, deformidades articulares, miotonia, ptose palpebral e, principalmente, o teste de força muscular. A força muscular era avaliada nos diversos grupos musculares proximais e distais, nos membros superiores e inferiores, sendo avaliados, quando possível, os músculos isoladamente pela escala do Medical Research Council (1976).

Após revisão dos prontuários médicos desses pacientes, com coleta de dados de história clínica e exame físico e neurológico, foram preenchidas as fichas de protocolo para cada paciente (ANEXO I).

A idade do diagnóstico variou entre dois meses e seis anos, com idade média de $22,87 \pm 23,35$ meses, sendo que dois eram do gênero masculino e seis eram do feminino.

A seguir, descrevemos sucintamente os casos estudados, relatando somente os dados positivos e negativos de importância.

Caso 1. T.V.D., três meses, sexo feminino.

História de gestação normal. Não havia história de polidrâmnio nem de movimentos fetais fracos ou infrequentes.

Parto normal a termo e sem complicações.

Hipotonia moderada.

Não apresentava insuficiência respiratória, dificuldade para mamar, dismorfismo facial ou deformidades ósseas.

Caso 2. E. M. O., três anos e um mês, sexo masculino.

História de gestação normal. Não havia história de polidrâmnio nem de movimentos fetais fracos ou infreqüentes.

Parto normal a termo e sem complicações.

Hipotonia moderada. Deambula com apoio.

Não apresentava insuficiência respiratória, dificuldade para mamar, dismorfismo facial ou deformidades ósseas.

Caso 3. S. T., dois anos e seis meses, sexo feminino.

História de gestação normal. Não havia história de polidrâmnio nem de movimentos fetais fracos ou infreqüentes.

Parto normal a termo e sem complicações.

Hipotonia moderada. Deambulava com dificuldade e não levantava sozinha do chão.

Não apresentava insuficiência respiratória, dificuldade de mamar, dismorfismo facial ou deformidades ósseas.

Caso 4. F.B, um ano e cinco meses, sexo feminino.

História de gestação anormal com descrição de oligodrâmnio. Havia história de movimentos fetais fracos.

Parto cesáreo com 7 meses. Hipotonia grave e dificuldade de mamar. *Pectus carinatum*, escoliose e luxação coxofemoral. Não sentava sem apoio e não deambulava. Não apresentava insuficiência respiratória.

Caso 5. E.J.S., seis anos, sexo masculino.

História de gestação normal. Não havia história de movimentos fetais fracos ou infrequentes.

Parto normal a termo e sem complicações.

Hipotonia moderada.

Não apresentava insuficiência respiratória, dismorfismo facial ou deformidades ósseas.

Caso 6. D.K.S., dois meses, sexo feminino.

Gestação anormal com história de movimentos fetais infreqüentes. Não havia história de polidrâmnio

Parto cesáreo com 37 semanas. Hipotonia grave com *distress* respiratório, dismorfismo facial e artrogripose de punho esquerdo.

Estava internada na UTI em ventilação mecânica invasiva.

Caso 7. G.T. S, nove meses, sexo feminino.

História de gestação normal. Não havia história de polidrâmnio nem de movimentos fetais fracos ou infreqüentes.

Parto normal a termo e sem complicações.

Hipotonia moderada e dificuldade de mamar.

Não apresentava *distress* respiratório, dismorfismo facial ou deformidades ósseas.

Não sentava sozinha ou com apoio.

Caso 8. E. J. M., um ano um mês, sexo feminino.

Gestação normal. Não havia história de polidrâmnio nem de movimentos fetais fracos ou infreqüentes.

Parto normal a termo. Hipotonia moderada.

Não apresentava *distress* respiratório, dismorfismo facial.

Havia lordose. Levantava e deambulava com apoio (figura 3) .

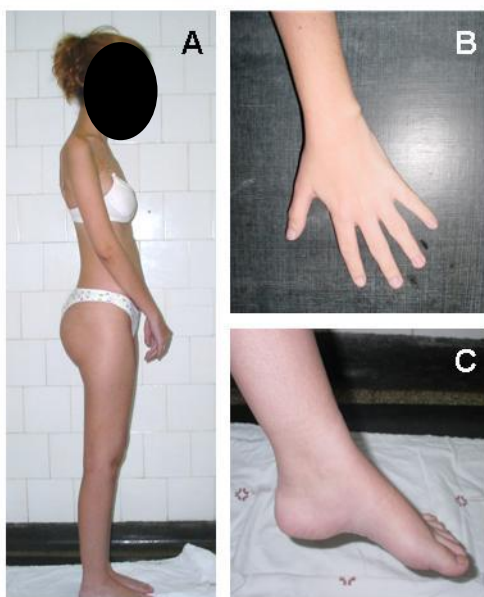


Figura 3: Aspecto clínico do caso 8, após anos de evolução, já na adolescência, mostrando lordose (A), deformidades de mãos (B) e pé cavo (C).

4.2 CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA

Com a coleta dos dados referentes às manifestações clínicas, os casos foram classificados obedecendo aos critérios estabelecidos pelo Consórcio Internacional de Miopatia Nematínica (WALLGREN-PETTERSSON e LAING, 2000).

4.3 ENZIMAS MUSCULARES

A avaliação laboratorial dos pacientes foi realizada por ocasião de diagnóstico, através da dosagem de enzimas musculares e realização da eletroneuromiografia.

Foram dosadas as enzimas creatinaquinase (CK), desidrogenase láctica (LDH), aldolase, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).

Os resultados foram relacionados através da razão entre a taxa encontrada e o valor superior da faixa considerada normal para o método, devido aos diferentes procedimentos laboratoriais utilizados. Assim, os resultados obtidos em

cada paciente expressam o número de vezes que a enzima está acima do seu valor normal. As enzimas séricas foram, então, agrupadas nas seguintes categorias, conforme o valor encontrado: normal (dentro dos limites normais); aumento leve (até duas vezes o valor normal); moderado (até dez vezes o valor normal) e aumento importante (acima de dez vezes o valor normal).

4.4 ELETRONEUROMIOGRAFIA

A ENMG foi realizada seguindo a rotina do Laboratório de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas da UFPR.

As conduções nervosas foram realizadas em pelo menos um nervo motor e um nervo sensitivo de membro superior e membro inferior de um dimídio.

A EMG foi realizada em pelo menos dois músculos de membro superior e membro inferior de um dimídio. Foram avaliadas a atividade de repouso e a atividade voluntária.

A associação dos potenciais encontrados em cada EMG permitiu fazer um diagnóstico eletromiográfico. Para tal, foram consideradas como padrão **miopático** as que apresentavam potenciais voluntários de duração e voltagens médias reduzidas para a idade, excesso de polifásicos curtos e recrutamento aumentado. Foram consideradas como padrão de **desinervação**, as que apresentavam duração e voltagem média aumentada para a idade, recrutamento reduzido com ou sem a presença de atividade espontânea (fibrilações, ondas positivas e fasciculações), excesso de polifásicos longos, recrutamento reduzido e potenciais gigantes. Foram consideradas como padrão **misto** ou **neuromiopático**, quando coexistiam dados do padrão miopático e neuropático.

4.5 BIÓPSIA MUSCULAR

Todos os pacientes foram submetidos à biópsia muscular, processada por técnicas de congelação, histoquímica e imunohistoquímica.

A biópsia muscular foi realizada em músculo geralmente com grau 4 MRC no exame clínico. Nos casos em que a doença estava em um estágio mais avançado foi escolhido o músculo de melhor acesso e menos afetado. Foram escolhidos os músculos contralaterais à EMG e que não tivessem sido submetidos

previamente à mesma. Caso a EMG tivesse sido realizada, a biópsia seria feita somente três semanas após, a fim de evitar a resposta muscular produzida pela agulha (miopatia da agulha).

4.5.1 Técnica da biópsia muscular

A biópsia muscular foi realizada conforme a técnica em uso no Serviço de Doenças Neuromusculares (ANEXO III).

4.5.2 Técnica de corte e de preparação

O fragmento de músculo foi montado no laboratório de histoquímica, com o cuidado de desprezar a porção do músculo pinçada durante a retirada do fragmento em suporte especial com adraganth 7% recoberto com talco em pó e a seguir congelado e armazenado em nitrogênio líquido a -170°C . Posteriormente, os fragmentos de músculos eram cortados em criostato a -20°C , com espessura de 8 micra para histoquímica e 4 micra para imunohistoquímica, sendo armazenados em lamínulas de 22 x 22 mm.

4.6 HISTOQUÍMICA

Todas as colorações e reações histoquímicas são realizadas rotineiramente no laboratório de Histoquímica do Serviço de Doenças Neuromusculares. Os fragmentos musculares foram estudados por colorações a fresco, utilizando-se os métodos de hematoxilina-eosina, PAS, tricromo de Gomori modificado, *oil red O*, cresil violeta e *sirius red*. Ao mesmo tempo foram realizadas técnicas de histoquímica para NADH-tetrazolium redutase, ATPases com pH 9.4, 4.3, 4.6, miofosforilase, esterase inespecífica, fosfatase alcalina e ácida, desidrogenase succínica, citocromo-c-oxidase e adenilato deaminase.

A ênfase dos dados da biópsia foi a relação de fibras tipo I e do tipo II, presença de fibras em sacabocados, percentagem de fibras com rods e sua distribuição (subsarcolemal, intermiofibrilar ou mista) e atividade de fosfatase ácida.

4.6.1 **Proporção de tipo de fibras**

Definida através da contagem de 200 a 800 fibras de cada paciente nas reações ATPase com pH 4,3 e/ou 9,4 e estimativa posterior da relação de fibras tipo I/tipo II. Considerou-se predomínio de fibras tipo I quando estas representavam mais de 55% do total de fibras, e deficiência de tipo de fibra quando um subtipo correspondia a menos de 10% do total de fibras.

4.6.2 **Percentagem de fibras contendo *rods***

Definida através da contagem de 200 a 800 fibras de cada paciente na coloração tricromo de Gomori modificado. Posteriormente, estabeleceu-se a percentagem de fibras contendo *rods* e fibras sem *rods*.

4.6.3 **Distribuição dos *rods***

Definida através da contagem das fibras de cada paciente na coloração tricromo de Gomori modificado e, posteriormente, estabeleceu-se a percentagem das fibras contendo *rods* subsarcolemais, intermiofibrilares e mistos.

4.6.4 **Presença de fibras em sacabocado**

Definida como a presença de áreas sem reação na coloração NADH, deixando a fibra muscular com aspecto não uniforme e em sacabocado. Posteriormente, estabeleceu-se como presença ou ausência de fibras em sacabocados na miopatia nemalínica.

4.6.5 **Atividade de fosfatase ácida**

Definida como normal, aumentada ou diminuída na reação específica.

4.7 IMUNOHISTOQUÍMICA

Para realizar a imunohistoquímica, foram incluídos somente os pacientes cujos dados acima descritos foram obtidos de maneira fidedigna e cuja biópsia muscular ainda se encontrava viável no estoque de nitrogênio líquido do laboratório de Histoquímica do HC-UFPR, totalizando oito doentes cujas biópsias foram

submetidas, então, a nova avaliação para estudo da expressão protéica – nebulina, desmina e miosina.

4.7.1 Anticorpos utilizados

Nebulina:

Anticorpo monoclonal antinebulina N2 produzido em camundongo – Sigma,
Diluição: 1:50

Miosina Rápida:

Anticorpo monoclonal antimiosina *fast* produzido em camundongo – Sigma,
Diluição 1:10

Desmina:

Anticorpo antidesmina produzido em coelho – Sigma,
Diluição 1:20

4.7.2 Procedimento

Para imunohistoquímica, foi usada a técnica padrão do Laboratório de Histoquímica e Imunohistoquímica do laboratório de Doenças Neuromusculares com único anticorpo primário específico e anticorpos secundários (anti-IgG) conjugados à fluoresceína.

Os cortes histológicos de biópsias musculares armazenadas em nitrogênio líquido foram colhidos em lamínula de polysine em espessura de 4 μm . A lamínula é descongelada em temperatura ambiente por cerca de 15 minutos. Após, o corte foi coberto com 5 ml de solução tampão fosfato-cloreto (fórmula descrita no ANEXO II) associada a 0,25 ml de soro de cabra, permanecendo em repouso por dez minutos. Em seguida, as lamínulas eram lavadas com tampão fosfato-cloreto por 3 vezes. Após a retirada do tampão, aplicava-se o anticorpo primário diluído em albumina bovina a 1% – antinebulina, antimiosina ou antidesmina - na titulação descrita acima, deixando-o por um período de incubação de 24 horas em geladeira. As lâminas eram então lavadas com solução tampão por três vezes, sendo o tempo de cada lavagem de cinco minutos. Aplicou-se o anticorpo

secundário conjugado a fluoresceína, e deixava-se um período de incubação de uma hora em câmara úmida e no escuro. Novamente, lavava-se com solução tampão, cinco minutos cada lavagem, e montava-se em Vectashield vedando com esmalte incolor ao redor da lamínula. A análise das lâminas foi realizada em microscópio com epifluorescência, o que permitiu inclusive fotografar as lâminas correspondentes aos diferentes anticorpos primários.

4.7.3 Classificação

A classificação da imunoidentificação da imunofluorescência, abaixo relacionada, foi baseada nas de Sewry *et al.* (1998; 2000), Imoto *et al.* (1999) e Gurgel-Giannetti *et al.* (2001), e que foram modificadas.

Verificou-se a intensidade da imunocoloração e o tipo de imunoidentificação da nebulina, da miosina e da desmina nas fibras musculares.

Em relação à nebulina, as biópsias foram classificadas em:

- 0 – ausência de imunofluorescência (figura 10); números estão errados
- 1 – imunoidentificação da nebulina com falhas difusas [heterogênea (figura 10)];
- 2 – imunoidentificação da nebulina homogênea [normal (figura 10)].

Em relação à miosina, as biópsias foram classificadas em:

- 0 – ausência de imunofluorescência (figura 11);
- 1 – imunoidentificação da miosina com padrão de mosaico (figura 11).

Em relação à desmina, as biópsias foram classificadas em:

- 0 – ausência de imunofluorescência (figura 12);
- 1 – imunoidentificação da desmina homogênea [normal (figura 12)];
- 2 – imunoidentificação da desmina fortemente positiva (figura 12).

5. RESULTADOS

5.1 CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA

Os oito pacientes incluídos no estudo tiveram diagnóstico de MN em idade que variou entre dois meses e seis anos (média de 22,87 meses), sendo dois do gênero masculino e seis do feminino.

Todos os pacientes foram classificados clinicamente conforme o Consórcio Internacional em Miopatia Nemalínica de 1999 (tabela 5):

- a) Forma congênita grave: um paciente (caso 6).
- b) Forma congênita intermediária: dois pacientes (casos 4 e 7).
- c) Forma típica: cinco pacientes (casos 1, 2, 3, 5 e 8).

Movimentos fetais fracos ou infrequentes e parto prematuro foram descritos em dois pacientes (casos 4 e 6). Em um paciente, há descrição de oligodrâmnio (caso 4). Os demais pacientes (casos 1, 2, 3, 5, 7 e 8) apresentaram gestação sem complicações e parto normal a termo. Todos os pacientes apresentavam hipotonia moderada a grave no exame físico, desde o nascimento. Em três pacientes houve descrição de dificuldade de sucção (casos 4, 6 e 7) e, em um paciente, houve insuficiência respiratória com necessidade de ventilação mecânica invasiva (caso 6). Em três casos houve descrição de distúrbios como *pectus carinatum* (caso 4), escoliose (caso 4), luxação coxofemoral (caso 4), distúrbio facial (caso 6), artrogrifose de punho esquerdo (caso 6) e lordose (caso 8).

5.2 ENZIMAS MUSCULARES

Todos os pacientes haviam sido submetidos à dosagem sérica de enzimas musculares, com exceção de um paciente (caso 5).

A maioria dos resultados das enzimas séricas – CK, LDH, aldolase, AST – estava dentro dos valores da normalidade. Somente um paciente (caso 4) apresentava elevação dos valores da creatinaquinase e desidrogenase láctica (tabelas 1 e 5).

TABELA 1 – RESULTADO DAS ENZIMAS NEUROMUSCULARES.

Caso	CK	LDH	Aldolase	AST	ALT
1	N	-	-	-	-
2	N	-	N	-	-
3	N	N	-	N	N
4	1,1	1,4	N	N	N
5	-	-	-	-	-
6	N	-	-	-	-
7	N	N	-	N	N
8	N	-	-	-	-

CK = creatinaquinase, LDH = desidrogenase láctica, AST = aspartato aminotransferase, ALT = alanina aminotransferase, N = normal, - = não realizado. Valores correspondem ao número de vezes aumentado em relação aos valores normais.

5.3 ELETRONEUROMIOGRAFIA

Dentre os pacientes, somente um não foi submetido à eletroneuromiografia (caso 5). As velocidades de condução nervosa, em todos os casos, foram normais.

Foram encontrados dois pacientes com eletromiografia normal, dois com padrão miopático e três com padrão de desinervação (tabelas 2 e 5).

TABELA 2 - ELETRONEUROMIOGRAFIA.

Casos	VCN	EMG
1	N	N
2	N	Padrão miopático
3	N	Padrão de desinervação
4	N	Padrão de desinervação
5	-	-
6	N	Padrão miopático
7	N	Padrão de desinervação
8	N	N

VCN = velocidade de condução nervosa, EMG = eletromiografia, N = normal, - = não realizada.

5.4 HISTOQUÍMICA

Em todos os casos, a coloração hematoxilina-eosina não possibilitou a detecção dos *rods* (figura 4) enquanto na coloração tricromo de Gomori modificado foi possível identificá-los distribuídos de forma mista – subsarcolemal e intermiofibrilares (figura 6). Em dois casos houve *rods* em mais que 50% das fibras (casos 1 e 4) enquanto nos demais casos houve presença de *rods* em menos de 50% das fibras musculares [casos 2, 3, 5, 6, 7 e 8 (figura 5)]. Na técnica de ATPase pH 4,3 identificou-se o predomínio de fibras tipo I em cinco casos (casos 1, 2, 3, 5 e 7) enquanto nos demais três casos houve percentagem semelhante entre as fibras [casos 4, 6 e 8 (figura 7)]. Nos casos 3, 4, 6, 7 e 8 observou-se atrofia de fibras tipo I (figura 7). Na técnica da NADH, houve presença de sacabocados nos casos 2, 3, 5 e 7 enquanto nos casos 1, 4, 6 e 8 as fibras musculares apresentavam-se normais (figura 8). A atividade de fosfatase ácida esteve aumentada nos casos 1, 2, 3, 7 e 8 enquanto nos demais casos era normal (figura 9).

Nas tabelas 3 e 5, estão relacionadas as alterações histológicas encontradas nos oito pacientes desse estudo.

TABELA 3 - BIOPSIA MUSCULAR.

Caso	% fibras tipo I/tipo II	Fibras em sacabocado	Atividade da Fosfatase Ácida	% de fibras com corpos nemalínicos	Distribuição dos corpos nemalínicos
1	70/30	-	Fraca	60	Mista
2	70/30	+	Aumentada	20	Mista
3	86/14	+++	Aumentada	25	Mista
4	50/50	-	Normal	54	Mista
5	75/25	+	Normal	34	Mista
6	50/50	-	Normal	32	Mista
7	59/41	++	Aumentada	15	Mista
8	48/52	-	Aumentada	46	Mista

- = ausente, + = pouca quantidade, ++ = moderada quantidade, +++ = quantidade abundante.

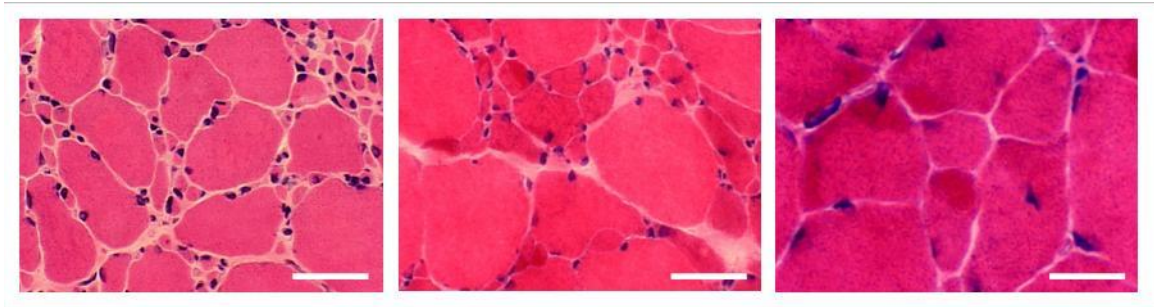


Figura 4: A presença de fibras musculares com variação no tamanho na coloração pela HE. Barra = 50 um.

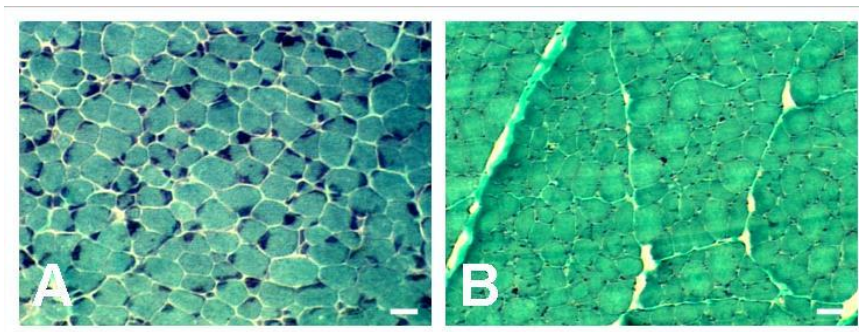


Figura 5: A presença de corpos nemalínicos em mais de 50% das fibras musculares (A) quando compara à biópsia muscular com corpos nemalínicos em menos de 50% (B) das fibras musculares na coloração pelo TGM. Barra = 50 um.

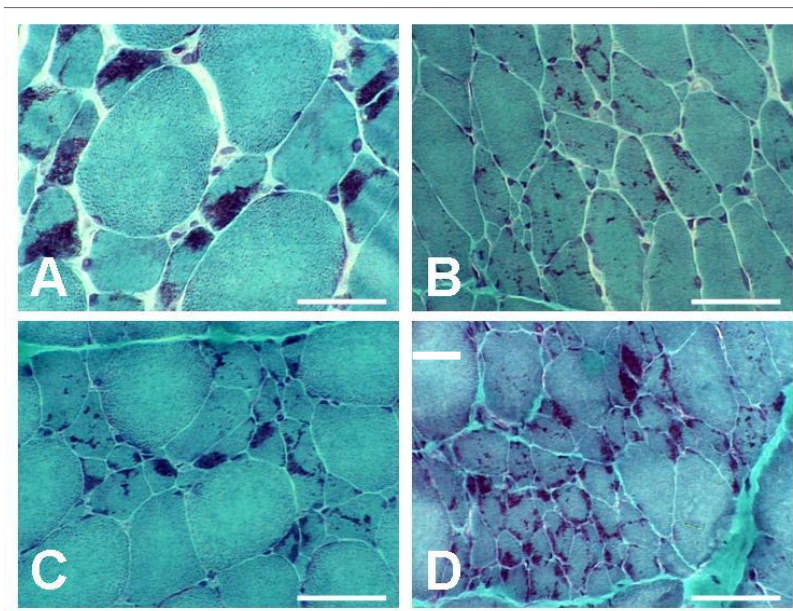


Figura 6: Biópsia muscular mostrando áreas com distribuição dos corpos nemalínicos predominantemente subsarcolemal (A), intermiofibrilar (B), e mista (C e D) nas fibras musculares na coloração pelo TGM. Barra = 50 um.

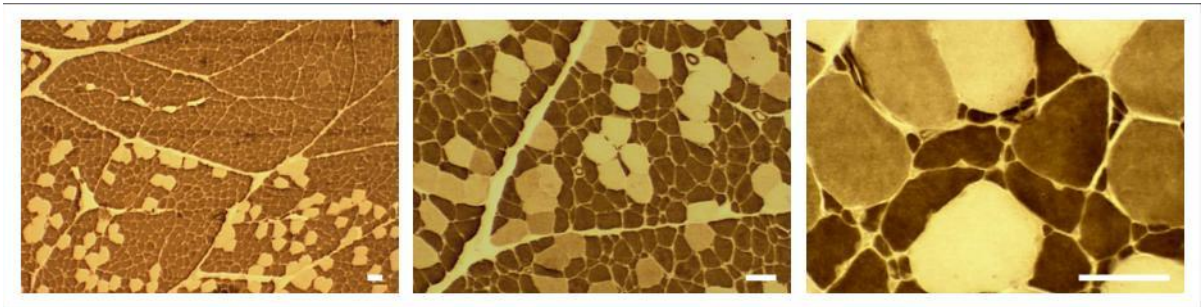


Figura 7: A presença de áreas com predomínio e atrofia de fibras musculares do tipo 1 na reação histoquímica para ATPase pH4.3. Barra = 50 μ m.

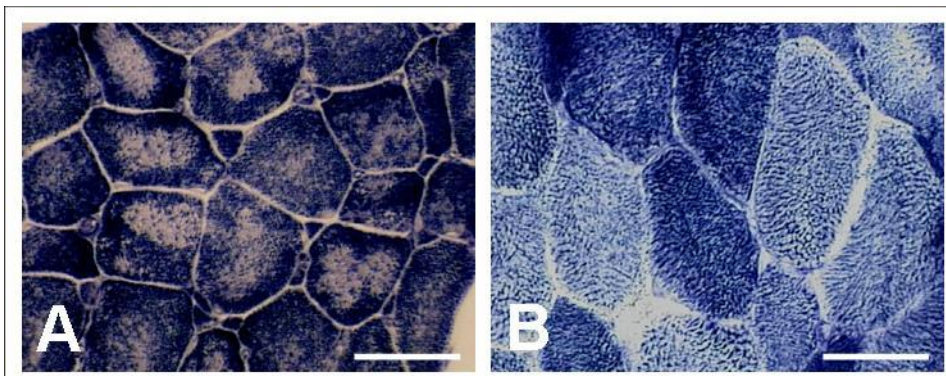


Figura 8: A presença de fibras musculares em sacabocados (A) quando comparadas à fibras normais (B) na reação histoquímica para NADH. Barra = 50 μ m.

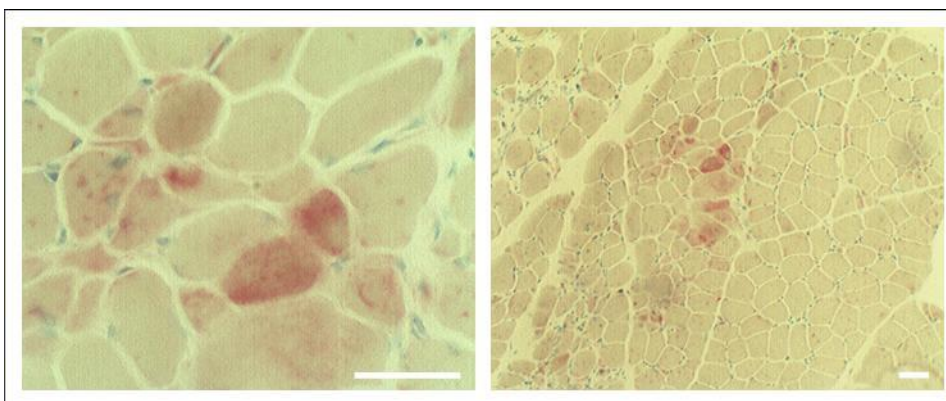


Figura 9 – A presença de fibras musculares com aumento de atividade na fosfatase ácida. Barra = 50 μ m.

5.5 IMUNOHISTOQUÍMICA

Foi avaliada a expressão das proteínas musculares, nebulina, miosina e desmina, em controle normal e em todos nos casos de miopatia nemalínica (tabelas 4 e 5).

Em controle normal houve expressão positiva e homogênea da nebulina na fibra muscular (figura 10). Em quatro pacientes, houve áreas de falhas de expressão na fibra muscular, caracterizando padrão heterogêneo [casos 1, 4, 5 e 6 (figura 10)]. Em quatro pacientes, não se observou expressão protéica no interior das fibras musculares [casos 2, 3, 7 e 8 (figura 10)].

A proteína miosina rápida apresentou expressão positiva, tipo mosaico, tanto no controle normal quanto nos pacientes com MN, com exceção de dois pacientes com expressão negativa [casos 1 e 2 (figura 11)].

A desmina apresentou expressão positiva homogênea nas fibras musculares em controle normal. Dos pacientes com MN, três pacientes tiveram expressão fortemente positiva (casos 3, 4 e 7), um paciente teve expressão heterogênea [áreas fortemente positivas, com áreas de marcação normal (caso 1)], e três pacientes tiveram expressão normal [casos 5, 6 e 8 (figura 12)].

TABELA 4 – IMUNOHISTOQUÍMICA.

Casos	Nebulina	Miosina	Desmina
1	Heterog	Ausente	Positiva/Normal
2	Ausente	Ausente	Ausente
3	Ausente	Mosaico	Positiva
4	Heterog	Mosaico	Positiva
5	Heterog	Mosiaco	N
6	Heterog	Mosaico	N
7	Ausente	Mosaico	Positiva
8	Ausente	Mosaico	N

Heterog = heterogeneo, N = normal.

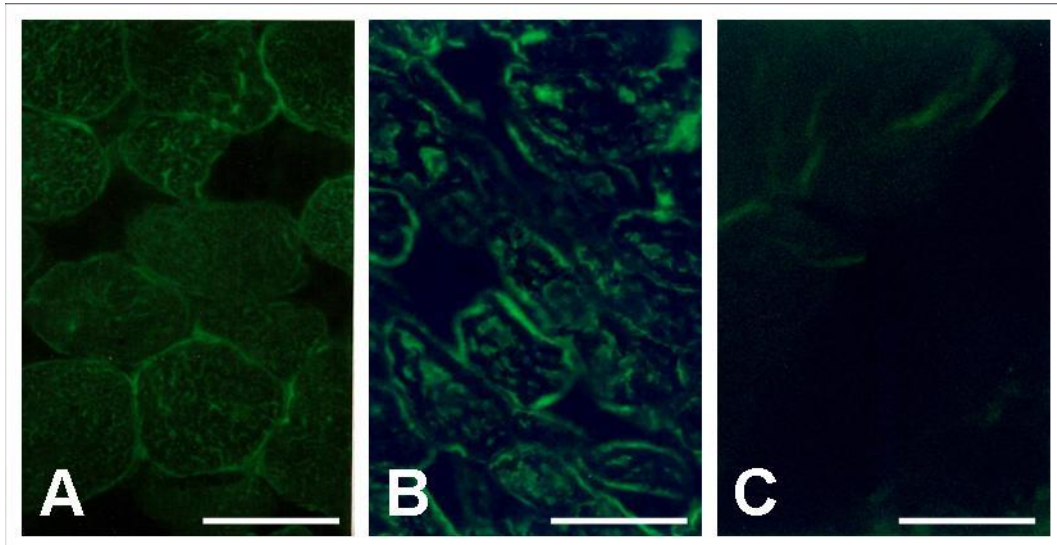


Figura 10: A presença de fibras musculares com expressão normal (A), heterogênea (B) e ausente (C) da proteína nebulina à imunohistoquímica. Barra = 50 μ m.

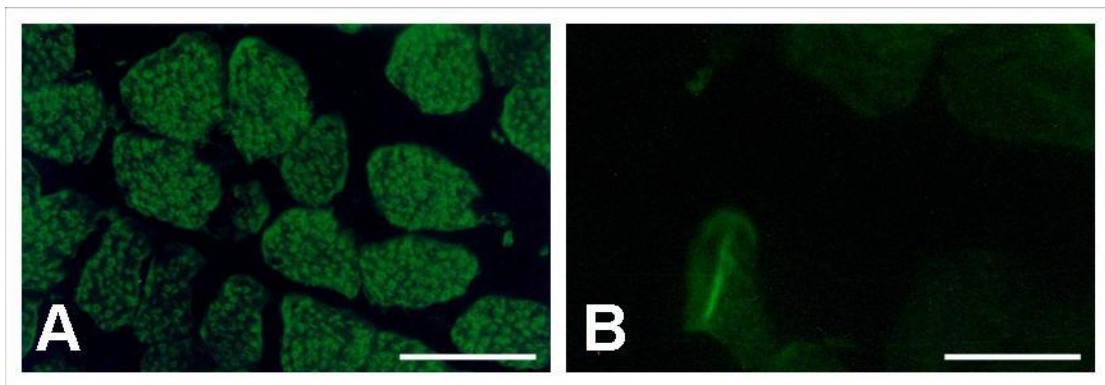


Figura 11: A presença de fibras musculares com expressão em mosaico (normal) da proteína miosina (A) quando comparadas à fibras musculares com expressão ausente (B) à imunohistoquímica. Barra = 50 μ m.

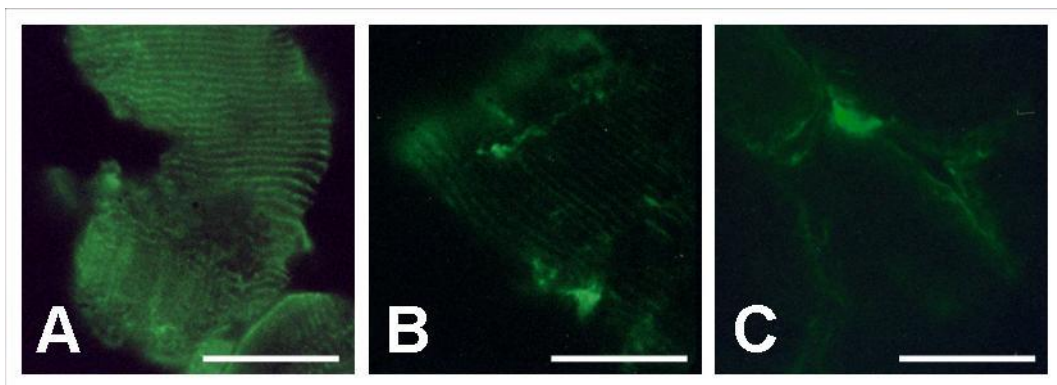


Figura 12: A presença de fibras musculares com expressão fortemente positiva (A), normal (B) e ausente (C) da proteína desmina à imunohistoquímica. Barra = 50 μ m.

TABELA 5 – ACHADOS CLÍNICOS, LABORATORIAIS, HISTOQUÍMICOS E IMUNOHISTOQUÍMICOS NA MIOPATIA NEMALÍNICA.

Achados	Congênita Grave (número de casos)	Congênita Intermediária (número de casos)	Típica (número de casos)
Número de pacientes	1	2	5
Parto prematuro	1	1	0
Movimentos fetais fracos	1	1	0
Oligodrâmnio	0	1	0
Gestação normal	0	1	5
Hipotonia	1	2	5
Dificuldade de mamar	1	2	0
Insuficiência respiratória	1	0	0
Dismorfismos	1	1	1
Aumento de CK	0	1	0
ENMG – padrão miopático	1	0	1
ENMG – padrão neuropático	0	2	1
ENMG normal	0	0	2
Predomínio fibras tipo I	0	1	4
Percentagem de fibras com <i>rods</i> > 50%	0	1	1
Percentagem de fibras com <i>rods</i> < 50%	1	1	4
Distribuição mista de <i>rods</i>	1	2	5
Fibras em sacabocado	0	1	3
Aumento de atividade de fosfatase ácida	0	1	3
Expressão nebulina heterogênea	1	1	2
Expressão nebulina ausente	0	1	3
Expressão miosina positiva (mosaico)	1	2	3
Expressão desmina fortemente positiva	0	2	2
Expressão desmina normal	1	0	2

CK = creatinaquinase, ENMG = eletroneuromiografia.

6 DISCUSSÃO

6.1 CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA

A amostra do presente estudo apresenta um número reduzido de casos que é compatível com o fato da miopatia nemalínica ser uma forma rara de miopatia congênita, cuja incidência é de um em cada 500 mil nascidos vivos (WALLGREN-PETTERSSON *et al.*, 1990).

Casuísticas não descrevem predominância de sexo na MN (BAROHN *et al.*, 1994; NONAKA *et al.*, 1989_a; RIFAI *et al.*, 1993; SASAKI *et al.*, 1997; SHIMOMURA *et al.*, 1989; WALLGREN-PETTERSSON, 1989; WALLGREN-PETTERSSON *et al.*, 1990). Nessa amostra houve predomínio do gênero feminino. O pequeno número de casos desse estudo sugere cautela na valorização desse achado.

De acordo com o Consórcio Internacional em Miopatia Nemalínica (WALLGREN-PETTERSSON e LAING, 2000), a forma mais frequente de MN é a forma típica. As formas congênita grave, congênita intermediária, juvenil e adulta são menos frequentes. A forma adulta, conhecida como Miopatia Nemalínica Esporádica de Início Tardio é associada com HIV e gamopatia monoclonal (SANTICS *et al.*, 2008; CHAHIN *et al.*, 2005). A presente casuística é semelhante a da literatura apresentando um maior número de casos com a forma típica seguida das formas congênita intermediária e congênita grave. Nesse estudo não se observou nenhum caso da forma juvenil ou em paciente adulto e conseqüentemente nenhuma associação com HIV e gamopatia monoclonal. Não houve, também, associação com cardiomiopatia (SKYLOURIOTIS *et al.*, 1999) e com oftalmoplegia (WRIGHT *et al.*, 1997)

Clinicamente, os pacientes com MN apresentam fraqueza muscular e hipotonia generalizada, dificuldade para deambular, disfagia, movimentos anormais durante a gestação, insuficiência respiratória e distúrbios, como deformidades dos pés, hipomímia, palato arqueado, língua pequena, hiper mobilidade de articulações, escoliose, tórax em pombo, síndrome da espinha rígida, contraturas

de membros superiores e/ou inferiores e artrogripose (MARTIN e RENIERS, 1968; SRETER *et al.*, 1976; WALLGREN-PETTERSSON, 1989; RIFAI *et al.*, 1993; BAROHN *et al.*, 1994; TOPALOGLU *et al.*, 1994; van der VEN *et al.*, 1995; NORTH *et al.*, 1997; SASAKI *et al.*, 1997; WALLGREN-PETTERSSON *et al.* 1998; WALLGREN-PETTERSSON e LAING, 2000; WALLGREN-PETTERSSON e LAING, 2001). As manifestações clínicas observadas nessa população foram semelhantes as da literatura. Os casos de MN forma típica apresentaram gestação normal, sem história de movimentos fetais anormais; hipotonia moderada e diagnóstico confirmado entre 3 meses e 6 anos de idade. Metade dos casos de forma congênita intermediária apresentaram história positiva de movimentos fetais fracos. Hipotonia grave e dificuldade de sugar foi frequente e sem evolução para desconforto respiratório. O reduzido número de casos não permite a valorização desse achado nesta forma de MN. O único caso de forma congênita grave apresentava as manifestações referidas como típicas pela literatura, isto é, gestação anormal com história de movimentos fetais fracos, hipotonia grave, dificuldade de sugar e, insuficiência respiratória com necessidade de ventilação mecânica. Anormalidades ósseas são descritas em todas as formas de MN e foram detectadas em vários pacientes da presente casuística, independente da classificação de sua forma clínica (GOMMANS *et al.*, 2002; RADU *et al.*, 1972; RIFAI *et al.*, 1993; RYAN *et al.*, 2001; TOPALOGLU *et al.*, 1994; WALLGREN-PETTERSSON, 1989).

6.2 ENZIMAS MUSCULARES

Em relação às enzimas musculares, a mais utilizada no diagnóstico da MN é a CK que é normal ou pouco elevada, podendo chegar até cinco vezes o valor normal (WALLGREN-PETTERSSON, 1989; FARDEAU e TOMÉ, 1994; WALLGREN-PETTERSSON, 1996; NORTH *et al.*, 1997). Corroborando a literatura, a maioria dos nossos pacientes apresentaram dosagem sérica de enzimas musculares dentro da normalidade, refletindo a pouca sensibilidade deste exame laboratorial na investigação diagnóstica da MN.

6.3 ELETRONEUROMIOGRAFIA

O exame de eletroneuromiografia mostra um variado espectro de achados nos pacientes acompanhados durante a evolução da MN (WALLGREN-PETTERSSON, 1989; DUMITRU, 1995).

Os achados desse estudo reforçam os achados de literatura. Pacientes com ENMG normal apresentaram idade inferior a dois anos, compatível com as descrições até então (WALLGREN-PETTERSSON, 1989; DUMITRU, 1995). Os pacientes com padrão miopático e padrão de desinervação, no entanto, apresentaram idade variável entre dois meses e três anos e meio, sugerindo aparecimento precoce de anormalidades eletroneuromiográficas.

6.4 HISTOQUÍMICA

Os corpos nemalínicos ou *rods* são o marco da MN, e a melhor técnica para sua detecção é a coloração de tricromo de Gomori modificado, em secções de biópsias (CONEN *et al.*, 1963; SHY *et al.*, 1963; WERNECK, 1983; SHIMOMURA e NONAKA, 1989; FARDEAU e TOMÉ, 1994; NORTH *et al.*, 1997). Há descrição de bastões intranucleares (coloração de azul de toluidina) nas formas congênita grave e adulta (RIFAI *et al.*, 1993; BAROHN *et al.*, 1994; GOEBEL e WARLO, 1997). Em todos os casos do atual estudo, a detecção dos *rods* foi feita na coloração tricromo de Gomori modificado, distribuídos de forma mista – subsarcolemal e intermiofibrilares. Não se detectou a presença de *rods* intranucleares no único caso de MN forma congênita grave e como esta amostra não teve nenhum caso de forma adulta, este achado não foi observado.

A predominância das fibras tipo I é comum na MN e, alguns pacientes, mostram exclusivamente fibras do tipo I ou pobre diferenciação entre as fibras (MARTIN e RENIERS, 1968; RADU e IONESCU, 1972; SRETER *et al.*, 1976; WALLGREN-PETTERSSON *et al.*, 1988; NONAKA *et al.*, 1989_a; NONAKA *et al.*, 1989_b; WALLGREN-PETTERSSON, 1996; NORTH *et al.*, 1997; IMOTO e

NONAKA, 2001). Semelhante a literatura, houve o predomínio de fibras tipo I na maioria dos casos desse estudo.

A descrição de aumento da fosfatase ácida é menos frequente e está relacionada aos casos de progressão rápida, o que sugere processo autodegenerativo, induzindo a ativação de enzimas lisossomiais e conseqüente destruição celular (NONAKA *et al.*, 1989_a; NONAKA *et al.*, 1989_b; SHINOMURA e NONAKA, 1989; FARDEAU e TOMÉ, 1994). Na amostra, a atividade da fosfatase ácida estava aumentada em quatro casos, enquanto nos demais foi normal. Diferente dos relatos de literatura, estes pacientes apresentaram progressão clínica lenta, sendo três da forma típica e um da forma congênita intermediária. Não houve relação entre a forma clínica e a atividade da fosfatase ácida, possivelmente pelo tamanho da amostra.

6.5 IMUNOHISTOQUÍMICA

Várias publicações sobre a expressão da proteína nebulina na imunohistoquímica surgiram na última década. Há descrições de expressão normal e anormal em pacientes com MN, principalmente na forma típica (LAING *et al.*, 1995; IMOTO *et al.*, 1999; PELIN *et al.*, 1999; SEWRY *et al.*, 2000; GURGEL-GIANETTI *et al.*, 2001; PELIN *et al.*, 2002; WALLGREN-PETTERSSON *et al.*, 2002). Na presente amostra, nenhum caso apresentou padrão normal de expressão protéica. Todos os casos, independente da forma, seja congênita grave, congênita intermediária ou típica, apresentaram expressão anormal da nebulina, como descrito em literatura. A ausência de casos com expressão normal nessa amostra difere do encontrado na literatura que relata expressão normal da nebulina na MN forma típica, com cinco representantes no estudo em discussão.

Em relação à proteína desmina, a presença de áreas de acúmulo na fibra muscular tem conotação patológica, e pode representar uma imaturidade ou um processo de regeneração da fibra muscular. van der Ven *et al.* (1995) descrevem expressão fortemente positiva da desmina em casos de MN forma congênita grave, enquanto nos casos moderados, encontraram expressão pouco significativa. Entre os pacientes deste estudo, o único caso de MN forma congênita severa apresentou expressão normal da desmina à imunohistoquímica. Entre os casos de expressão fortemente positiva, dois pacientes tinham a forma congênita intermediária e um

tinha a forma típica. O único caso de expressão ausente tinha a forma típica. Diferente do relatado por van der Ven *et al.* (1995), as formas congênita intermediária e típica podem apresentar expressão fortemente positiva da desmina na fibra muscular, podendo representar a imaturidade das fibras musculares ou regeneração muscular. Todos os casos em que a expressão da desmina foi fortemente positiva apresentaram padrão de desinervação à ENMG, reforçando a idéia de que pode haver remodelação da unidade motora (DUMITRU, 1995). Os demais casos tiveram ENMG normal ou padrão miopático. Todos os casos apresentaram distribuição de rods mista à biópsia muscular e expressão normal ou anormal da desmina à imunohistoquímica, não sendo possível estabelecer relação entre estes achados.

North *et al.* (1997) descreveram a expressão anormalmente aumentada da miosina fetal, miosina lenta e miosina rápida em pacientes com MN com predomínio de fibras tipo I à biópsia muscular. Na presente amostra, somente a expressão da proteína miosina rápida foi estudada e apresentou padrão tipo mosaico em todos os casos, com exceção de dois pacientes em que foi negativa, diferente do descrito por North *et al.* (1997). Também não foi possível estabelecer relação entre o padrão de expressão da miosina e os achados da EMG e a distribuição dos rods na fibra muscular que em todos os casos foi mista.

A MN está associada a mutação em seis genes distintos, responsáveis pela codificação das proteínas de filamento fino: NEB, ACTA 1, TPM3, TPM2, TNNT1 e CFL2 (LAING *et al.*, 1995; DONNER *et al.*, 2002; CLARKE *et al.*, 2008; ILKOVSKI *et al.*, 2008; PELIN *et al.*, 1999; WALLGREN-PETTERSSON *et al.*, 2006; NOWAK *et al.*, 1999; KOY *et al.*, 2007; AGRAWAL *et al.*, 2007). Todos os nossos casos desse estudo tem expressão da nebulina anormal, sugerindo que mutações no gene NEB podem estar presentes. Mutações em CFL2, ACTA1 e TNNT1 são menos prováveis de serem encontradas uma vez que houve somente 1 caso de miopatia nemalinica forma congênita grave e não houveram casos com detecção de rods intranucleares nem pacientes da comunidade Amish.

Desta forma, esse estudo enfoca a análise da expressão proteica em pacientes com MN e mostra que apesar das diversas formas clínicas da MN, a nebulina pode ter expressão heterogênea ou ausente; a expressão da miosina pode ser positiva com padrão de mosaico na maioria dos casos. Adicionalmente, a

expressão da desmina, que está correlacionada com o grau de maturidade da fibra muscular, pode mostrar-se normal ou anormal em pacientes com MN.

7 CONCLUSÕES

7.1 São conclusões originais:

- 7.1.1 O padrão de expressão da proteína miosina rápida é normal (padrão mosaico) na grande maioria dos pacientes estudados.
- 7.1.2 Os casos com predomínio de fibras tipo I apresentaram expressão de miosina rápida normal (padrão mosaico).
- 7.1.3 A proteína desmina, relacionada ao grau de maturação muscular, apresentou expressão normal ou fortemente positiva na maioria dos casos.
- 7.1.4 A expressão da proteína desmina apresentou-se fortemente positiva nos casos de pacientes com eletroneuromiografia de padrão neuropático enquanto os doentes com padrão normal e miopático têm expressão normal.
- 7.1.5 Não há relação entre a percentagem de rods presentes na fibra muscular e o padrão de expressão das proteínas musculares nebulina, miosina e desmina pois tanto os casos com percentagem maior que 50% e menor que 50% têm expressão positiva ou negativa da nebulina e expressão normal ou fortemente positiva da desmina.

7.2 São conclusões confirmatórias:

- 7.2.1 A proteína nebulina apresenta-se com expressão heterogênea ou ausente nos casos de miopatia nemalínica.
- 7.2.2 A expressão da nebulina pode ser ausente ou heterogênea independente do padrão normal, miopático ou neuropático da eletroneuromiografia.
- 7.2.3 A distribuição dos rods na fibra muscular é mista em todos os casos estudados.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, P.B.; GREENLEAF, R.S.; TOMCZAK, K.K.; LEHTOKARI, V.; WALLGREN-PETTERSSON, C.; WALLEFELD, W.; LAING, N.G.; DARRAS, B.T.; MACIVER, S.K.; DORMITZER, P.R.; BEGGS, A.H. Nemaline myopathy with minicores caused by mutation of the CFL2 gene encoding the skeletal muscle actin-binding protein, Cofilin-2. **Am J Hum Genet.**, v.80: p. 162-167, 2007.

BAROHN, R.J.; JACKSON, C.E.; KAGAN-HALLET, K.S. Neonatal nemaline myopathy with abundant intranuclear rods. **Neuromusc Disord**, v. 4, p. 513-520, 1994.

CHAHIN, N.; SELCEN, D.; ENGEL, A.G. Sporadic late onset nemaline myopathy. **Neurology**, v. 65: p. 1158-1164, 2005.

CLARKE, F.N.; KOLSKI, H.; DYE, E.D. Mutations in TPM3 are a common cause of congenital fiber type disproportion. **Ann Neurol**, v. 63: p. 329-337, 2008.

CONEN, P.E.; MURPHY, E.G.; DONOHUE, W.L. Light and electron microscopic studies of myogranules in a child with hypotonia and muscle weakness. **Can Med Assoc J**, v. 89, p. 983, 1963.

CRAIG, R. Molecular Structure of the Sarcomere. In: ENGEL, G.A. ; FRANZINI-ARMSTRONG, C., **Myology** 3. ed. New York: McGraw-Hill, 2004. p. 130-131.

DANON, M.J.; GIOMETTI, C.S.; MANALIGOD, J.R.; SWISHER, C. Sequential muscle biopsy changes in a case of congenital myopathy. **Muscle and Nerve**, v. 20, p. 561-569, 1997.

DONNER, K.; OLLIKAINEN, M.; RIDANPAA, M.; CHRISTEN, H.; GOEBEL, H.H.; VISSER, M. de; PELIN, K.; WALLGREN-PETTERSSON, C. Mutations in the beta-trpomyosin (TPM2) gene – a rare cause of nemaline myopathy. **Neuromusc Disord**, v. 12, p. 151-158, 2002.

DUBOWITZ, V. **Muscle Biopsy A Practical Approach**. 2. ed.. London; Bailliere Tindall, 1985. pp. .

DUMITRU, D. **Electrodiagnostic Medicine** Chicago, Mosby, 1995. p. 1031-1129.

FARDEAU, M; TOMÉ, F.M.S. Congenital Myopathies. In: ENGEL, G.A. ; FRANZINI-ARMSTRONG, C., (Ed). **Myology** 2. ed. New York: McGraw-Hill, 1994. p. 1487-1500.

FEINBERG, D.M.; SPIRO, A.J.; WEIDENHEIM, K.M. Distinct light microscopic changes in human immunodeficiency virus-associated nemaline myopathy. **Neurology**, v. 50, p. 529-531, 1998.

GOEBEL, H.H. Congenital myopathies with inclusion bodies: a brief review. **Neuromusc Disord**, v. 8, p. 162-168, 1998.

GOEBEL, H.H.; WARLO, I. Nemaline myopathy with intranuclear rods-intranuclear rod myopathy. **Neuromusc Disord**, v. 7, p. 13-19, 1997.

GOEBEL, H.H. Congenital myopathies at their molecular dawning. **Muscle and Nerve**, v. 27, p. 527-548, 2003.

GOMMANS, I.M.P.; ENGELEN, B.G.M van; LAAK, H.J.; BRUNNER, H.G.; KREMER, H.; LAMMENS, M.; VOGELS, O.J.M. A new phenotype of autosomal dominant nemaline myopathy. **Neuromusc Disord**, v. 12, p. 13-18, 2002.

GREGORIO, C.C.; TROMBITAS, K.; CENTNER, T.; KOLMERER, B.; STIER, G.; KUNKE, K.; SUZUKI, K.; OBERMAYR, F.; HERRMANN, B.; GRANZIER, H.; SORIMACHI, H.; LABEIT, S. The NH2 terminus of titin spans the Z-disc: its interaction with a novel 19-kD ligand (T-cap) is required for sarcomeric integrity. **J Cell Biol**, v. 4, p. 1013-1027, 1998.

GURGEL-GIANETTI, J.; REED, U.; BANG, M.; PELIN, K.; DONNER, K.; MARIE, S.K.; CARVALHO, M.; FIREMAN, M.A.T.; ZANOTELI, E.; OLIVEIRA, A.S.B.; ZATZ, M.; WALLGREN-PETTERSSON, C.; LABEIT, S.; VAINZOF, M. Nebulin expression in patients with nemaline myopathy. **Neuromusc Disord**, v. 11, p. 154-162, 2001.

ILKOVSKI, B.; MOKBEL, N.; LEWIS, R. Disease severity and thin filament regulation in M9R TPM3 nemaline myopathy. **J Neuropathol Exp Neurol**, 67, 867-877, 2008.

IMOTO, C.; KIMURA, S.; KAWAI, M. Nebulin is normally expressed in nemaline myopathy. **Acta Neuropathol**, v.97, p. 433-436, 1999.

IMOTO, C.; NONAKA, I. The significance of type 1 fiber atrophy (hypotrophy) in childhood neuromuscular disorders. **Brain and Dev**, v.23, p.298-302, 2001.

JOHNSTON, J.J.; KELLEY, R.I.; CRAWFORD, T.O.; MORTON, D.H.; AGARWALA, R.; KOCH, T.; FRANCOMANO, C.A.; BIESECKER, L.G. A novel nemaline myopathy in the Amish caused by mutation in troponin T1. **Am J Hum Genet.**, 67: p. 814-821, 2000.

JUNGBLUTH, H.; SEWRY, C.A.; COUNSELL, S.; ALLSOP, J.; CHATTOPADHYAY, A.; MERCURI, E.; NORTH, K.; LAING, N.; BYDDER, G.; PELIN, K.; WALLGREN-PETTERSSON, C.; MUNTONI, F. Magnetic resonance imaging of muscle in nemaline myopathy. **Neuromusc Disord**, v. 14, p. 779-784, 2004.

KOY, A.; ILKOVSKI, B.; LAING, N.; NORTH, K.; WEIS, J.; NEUEN-JACOB, E.; MAYATEPEK, E.; VOIT, T. Nemaline myopathy with exclusively intranuclear rods and a novel mutation in ACTA 1. **Neuropediatrics**, 38, p. 282-286, 2007.

LABEIT, S.; KOLMERER, B. The complete primary structure of human nebulin and its correlation to muscle structure. **J Mol Biol**, v. 248, p. 308-315, 1995.

LAING, N.G.; WILTON, S.D.; AKKARI, P.A.; DOROSZ, S.; BOUNDY, K.; KNEEBONE, C.; BLUMBERGS, P.; WHITE, S.; WATKINS, H.; LOVE, D.R.; HAAN, E. A Mutation in the alfa-tropomiosin gene TPM3 associated with autosomal dominant nemaline myopathy. **Nat Genet**, v. 9, p. 75-79, 1995.

LIN, Z.; HIJIKATA, T.; ZHANG, Z.; CHOI, J.; HOLTZER, S.; SWEENEY, H.L.; HOLTZER, H. Dispensability of the actin-binding site and spectrin repeats for targeting sarcomeric alfa-actinin into maturing Z bands *in vivo*: implications for *in vitro* bindings studies. **Dev Biol**, v. 199, p. 291-308, 1998.

MARTIN, L.; RENIERS, J. Nemaline Myopathy. I. Histochemical Study. **Acta Neuropat**. v. 11, p. 282-293, 1968.

MEDICAL RESEARCH COUNCIL aids to the examination of the peripheral nervous system. **London HMSO Memorandum**, n. 45, 1976.

MICHELE, D.E.; ALBAYYA, F.P.; METZGER, J.M. A nemaline myopathy mutation in alfa-tropomyosin causes defective regulation of striated muscle force production. **J Clin Invest**, v. 104, p. 1575-1581, 1999.

MILLEVOI, S.; TROMBITAS, K.; KOLMERER, B.; KOSTIN, S.; SCHAPER, J.; PELIN, K.; GRANZIER, H.; LABEIT, S. Characterization of nebulin and emerging concepts of their roles for vertebrate Z-discs. **J Mol Biol**, v. 282, p. 111-123, 1998.

NONAKA, I.; ISHIURA, S.; ARAHATA, K.; ISHIBASHI-UEDA, H.; MARUYAMA, T.; LI, K. Progression in nemaline myopathy. **Acta Neuropathol**, v. 78, p. 484-491, 1989_a.

NONAKA, I.; ISHIURA, S.; SASAKI, M.; ARAHATA, K. Progression in nemaline myopathy. **J Neurol Sci**, v. 98, p.100, 1989_b.

NORTH, K.N.; LAING, N.G.; WALLGREN-PETTERSSON, C. Nemaline myopathy: current concepts. **J Med Genet**, v. 34: 705-713, 1997.

NOWAK, K.J.; WATTANASIRICHAIGOON, D.; GOEBEL, H.H.; WILCE, M.; PELIN, K.; DONNER, K.; JACOB, R. HUBNER, C.; OEXLE, K.; ANDERSON, J.R.; VERITY, C.M.; NORTH, K.N.; IANNACCONE, S.T.; MULLER, C.R.; NURNBERG, P.; MUNTONI, F.; SEWRY, C.; HUGHES, I.; SUTPHEN, R.; LACSON, A.G.; SWOBODA, K.J.; VIGNERON, J.; WALGREN-PETTERSSON, C. BEGGS, A.H.; LAING, N. Mutations in the skeletal muscle alfa-actin gene in patients with actin myopathy and nemaline myopathy. **Nat Genet**, v. 23, p. 208-212, 1999.

PALLAGI, E.; MOLNAR, M.; MOLNAR, P.; DIOSZEGHY, P.. Central core and nemaline rods in the same patient. **Acta Neuropathol**, v. 96, p. 211-214, 1998.

PELIN, K.; HILPELA, P.; DONNER, K.; SEWRY, C.; AKKARI, E.; WILTON, S.; WATTANASIRICHAIGOON, D.; BANG, M-L.; CENTNER, T.; HANEFELD, F.; ODEWITZ, S.; FARDEAU, M.; ANDONI URTIZBEREA, J.; MUNTONI, F.; DUBOWITZ, V.; BEGGS, A.H.; LAING, N.G.; LABEIT, S.; CHAPELLE, A. de la WALLGREN-PETTERSSON, C. Mutations in the nebulin gene associated with autosomal recessive nemaline myopathy. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 96, p. 2305-2310, 1999.

PELIN, K.; DONNER, K.; HOLMBERG, M.; JUNGBLUTH, H.; MUNTONI, F.; WALLGREN-PETTERSSON, C. Nebulin mutations in autosomal recessive nemaline myopathy: an update. **Neuromusc Disord.**, v. 12; p. 680-686, 2002.

PFUHL, M.; WINDER, S.J.; MORELLI, M.A.C.; LABEIT, S.; PASTORE, A. Correlation between conformational and binding properties of nebulin repeats. **J Mol Biol**, v. 257, p. 367-384, 1996.

RADU, H.; IONESCU, V. Nemaline myopathy. Rod-like bodies and type I fibre atrophy in a case of congenital hypotonia with denervation. **J Neurol Sci.**, v.17, p. p. 53-60, 1972.

RIFAI, Z.; KAZEE, A.M.; KAMP, C.; GRIGGS, R.C. Intranuclear rods in severe congenital nemaline myopathy. **Neurology**, v, 43, p. 2372-2377, 1993.

RIGGS, J.E.; BIDENSTEINER, J.B.; SCHOHET, S.S. Jr. The dropped head sign: an unusual presentation of congenital myopathy. **J Child Neurol.**, vol 9, p. 330-331, 1994.

RYAN, M.M.; SCHNELL, C.; STRICKLAND, C.D.; SHIELD, L.K.; MORGAN, G.; IANNACCONE, S.T.; LAING, N.G.; BEGGS, A.H.; NORTH, K.N. Nemaline myopathy: A clinical study of 143 cases. **Ann Neurol**, v. 50: 312-320, 2001.

SANOUDOU, D.; BEGGS, A. Clinical and genetic heterogeneity in nemaline myopathy – a disease of skeletal muscle thin filaments. **Trends Mol Med.**, v.8, p. 362-368, 2001.

SANTICS, J.T.; CUMBO-NACHELI, G.; DOBBIE, D.; BAUMGARTNER, D. HIV-associated nemaline rod myopathy: role of intravenous immunoglobulin therapy in two persons with HIV □ AIDS. **AIDS read.** , v. 18, p. 90-94, 2008.

SASAKI, M.; TAKEDA, M.; KOBAYASHI, K.; NONAKA, I. Respiratory failure in nemaline myopathy. **Pediatr Neurol**, v. 16, p. 344-346, 1997.

SCHULTHEISS, T.; CHOI, J.; LIN, Z.X.; DILULLO, C.; COHEN-GOULD, L.; FISCHMAN, D.; HOLTZER, H. A sarcomeric alpha-actinin truncated at the carboxyl end induces the breakdown of stress fibers in PtK2 cells and the formation of nemaline-like bodies and breakdown of myofibrils in myotubes. **Proc Nat Acad Sci USA**, v. 89, p. 9282-9286, 1992.

- SHIMOMURA, C.; NONAKA, I. Nemaline myopathy: comparative muscle histochemistry in the severe neonatal, moderate congenital and adult-onset forms. **Pediatr Neurol**, v. 5, p 25-31, 1989.
- SHY, G.M.; ENGEL, W.K.; SOMERS, J.E.; WANKO, T. Nemaline myopathy: a new congenital myopathy. **Brain**, v. 86, p. 793, 1963.
- SKYLOURIOTIS, M.L.; MARX, M.; SKYLOURIOTIS, P.; BITTNER, R.; WIMMER, M. Nemaline myopathy and cardiomyopathy. **Pediatr Neurol.**, 20(4): 319-321, 1999.
- SORIMACHI, H.; FREIBURG, A.; KOLMERER, B.; ISHIURA, S.; STIER, G.; GREGORIO, C.C.; LABEIT, D.; LINKE, W.A.; SUZUKI, K.; LABEIT, S. Tissue-specific expression and alfa-actinin binding properties of the Z-disc titin: implications for the nature of vertebrate Z-discs. **J Mol Biol**,v. 270, p. 688-695, 1997.
- SRETER, F.A.; ASTROM, K.; ROMANUL, F.C.A.; YOUNG, R.R.; JONES, H.R. Characteristics of myosin in nemaline myopathy. **J Neurol Sci**, v. 27, p. 99-116, 1976.
- SEWRY,C.A. The Role of immunocytochemistry in congenital myopathies. **Neuromusc Disord**, v. 8, p. 394-400, 1998.
- SEWRY, C.A.; BROWN, S.C.; PELIN, K.; JUNGBLUTH, H.; WALLGREN-PETTERSSON, C.; LABEIT, S.; MANZUR, A.; MUNTONI, F. Abnormalities in the expression of nebulin in chromosome-2 linked nemaline myopathy. **Neuromusc Disord**, v. 11, p. 146-153, 2000.
- TAN, P.; BRINER, J.; BOLTSHAUSER, E.; DAVIS, M.R.; WILTON, S.D.; NORTH, K.; WALLGREN-PETTERSSON, C.; LAING, N.G. Homozygosity for a nonsense mutation in the alfa-tropomyosin slow gene TPM3 in a patient with severe infantile nemaline myopathy. **Neuromusc Disord**,v. 9, p. 573-579, 1999.
- TOPALOGLU, H.; GOGUS, S.; YALAZ, K.; KUCUKALI, T.; SERDAROGLU, A. Two siblings with nemaline myopathy presenting with rigid spine syndrome. **Neuromusc Disord**, v. 4, p. 263-267, 1994.
- van der VEN, P.F.M.; JAP, P.H.K.; LAAK, H.J.; NONAKA, I.; BARTH, P.G.; SENGERS, R.C.A.; STADHOUDERS, A.M.; RAMAEKERS, F.C.S. Immunophenotyping of congenital myopathies: disorganization of sarcomeric, cytoskeletal and extracellular matrix proteins. **J Neurol Sci**, 129: 199-213, 1995.
- WALLGREN-PETTERSSON, C. Congenital nemaline myopathy: a clinical follow-up study of twelve patients. **J Neurol Sci**, p.1-14, 1989.
- WALLGREN-PETTERSSON, C. Genetics of the nemaline myopathies and the myotubular myopathies. **Neuromusc Disord**, v.8, p. 401-404, 1998.

WALLGREN-PETTERSSON, C. Workshop report: 23RD ENMC Workshop on rare neuromuscular diseases. **Neuromusc Disord**, v. 3, p. 273-275, 1995.

WALLGREN-PETTERSSON, C.; AVELA, K.; MARCHAND, S.; KOLEHMAINEN, J.; TAHVANAINEN, E.; JUUL HANSEN, F.; MUNTONI, F.; DUBOWITZ, V.; DE VISSER, M.; VAN LANGEN, I.M.; LAING, N.G.; DE LA CHAPELLE, A. A Gene For Autosomal Recessive Nemaline Myopathy Assigned to Chromosome 2q By Linkage Analysis. **Neuromusc Disord**, v. 5/6, p. 441-443, 1995.

WALLGREN-PETTERSSON, C.; BEGGS, A.H. ; LAING, N.G. Workshop report: 51ST ENMC International Workshop Nemaline Myopathy. **Neuromusc Disord**, v.8, p. 53-56, 1998.

WALLGREN-PETTERSSON, C.; DONNER, K.; SEWRY, C.; BIJLSMA, E.; LAMMENS, M.; BUSHBY, K.; UZIELLI, M.L.G.; LAPI, E.; ODENT, S.; AKCOREN, Z.; TOPALOGLU, H.; PELIN, K. Mutations in nebulin gene can cause severe congenital nemaline myopathy. **Neuromusc Disord**, v.12, p.674-679, 2002.

WALLGREN-PETTERSSON, C.; JASANI, B.; NEWMAN, G.; RAPOLA, J. Alpha-Actinin in nemaline bodies in congenital nemaline myopathy: immunological confirmation by light and electron microscopy. **Neuromusc Disord**, v.2, p. 93-104, 1995.

WALLGREN-PETTERSSON, C.; KAARIAINEN, H.; RAPOLA, J.; SALMI, T.; DONNER, M. Genetics of congenital nemaline myopathy: a study of 10 families. **J Med Genet**, v. 27, p. 480-487, 1990.

WALLGREN-PETTERSSON, C.; LAING, N.G. Workshop report: 40TH ENMC Sponsored International Workshop: Nemaline Myopathy. **Neuromusc Disord**, v.5, p. 389-391, 1996.

WALLGREN-PETTERSSON, C.; LAING, N.G. Workshop report: 70TH ENMC International workshop: Nemaline Myopathy. **Neuromusc Disord**, v.10, p. 299-306, 2000.

WALLGREN-PETTERSSON, C.; LAING, N. Report of the 83RD ENMC International Workshop : 4TH Workshop on Nemaline Myopathy. **Neuromusc Disord**, v.11. p.589-595, 2001.

WALLGREN-PETTERSSON, C.; PELIN, K.; DONNER, K.; BEGGS, A.H.; LAING, N.; CHAPELLE, A. Clinical and genetic heterogeneity in autosomal recessive nemaline myopathy . **Neuromusc Disord**, v.9, p. 564-572, 1999.

WALLGREN-PETTERSON, C.; RAPOLA, J.; DONNER, M. Pathology of congenital nemaline myopathy: a follow-up study. **J Neurol Sci**, v. 83, p. 243-257, 1988.

WALLGREN-PETTERSSON, C.; LAING, N.G. Workshop report: 138TH ENMC International workshop: Nemaline Myopathy. **Neuromusc Disord**, v.3, p. 273-275, 2006.

WALLGREN-PETTERSSON, C.; SAINIO, K.; SALMI, T. Electromyography in congenital nemaline myopathy. **Muscle and Nerve**, v.12, p. 587-593, 1989.

WATTANASIRICHAIGOON, D.; SWOBODA, K.J.; TAKADA, F.; TONG, H.Q.; LIP, V.; IANNACCONE, S.T.; WALLGREN-PETTERSSON, C.; LAING, N.G.; BEGGS, A.H. Mutations of the slow muscle alfa-tropomyosin gene, TPM3, are a rare cause of nemaline myopathy. **Neurology**, v. 59, p. 613-617, 2002.

WATRAS, J. Fisiologia do Músculo Esquelético. Em: BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. **Fisiologia** 5^a ed., Elsevier Editora LTDA, 2004, p. 233-256.

WERNECK, L.C. O valor da biópsia muscular em neurologia. **Clín Terap**, v. 10, p. 2-24, 1981.

WERNECK, L.C.; JAMUR, M.C.; SILVADO, C.E.; YACUBIAN, E.M.T.; SALUM, P.N.B. Miopatia nemalínica: relato de um caso com estudo histoquímico e microscopia eletrônica. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 41, p. 199-207, 1983.

WRIGHT, R.A.; PLANT, G.T.; LANDON, D.N.; MORGAN-HUGHES, J.A. Nemaline myopathy: an unusual cause of ophthalmoparesis. **J Neuroophthalmol**, vol 17, p. 39-43, 1997.

YAMAGUCHI, M.; ROBSON, R.M.; STROMER, M.H.; DAHL, D.S.; ODA, T. Nemaline myopathy rod bodies. **J Neurol Sci**, v. 56, p. 35-56, 1982.

ANEXO I
FICHA DE COLETA DE DADOS

Nome:

Sexo:

Idade:

Gestação: normal anormal

Polidrâmnio: sim não

Movimentos fetais: normais fracos infrequentes

Idade gestacional ao nascimento:

Parto: complicado complicações:

não complicado

APGAR (1 min./5min): /

Respiração: normal insuficiência respiratória

ventilação mecânica

Dificuldade de mamar: sim não

Hipotonia: não moderada grave

Oftalmoplegia: sim não

Deformidades torácicas: sim não

Fraturas: sim local:

não

Casos de início tardio: idade de início dos sintomas:

Sintomas iniciais:

Sinais para encaminhamento: hipotonia

distúrbios da fala:

fraqueza muscular

Cirurgias prévias: sim não

Complicações anestésicas: sim não

Incapacitação clínica: deambula

uso de cadeira de rodas

independente, não necessita de assistência
para executar atividades diárias

necessita de assistência para executar
atividades diárias

necessita de assistência em tempo integral

Respiração: normal necessita de ventilação mecânica

Escoliose : não sim

Avaliação cardíaca: normal

Insuficiência cardíaca

Cardiomiopatia

Anormalidade estrutural

Inteligência: normal subnormal

testes: sim não

Oftalmoplegia: sim não

Diparesia facial: sim não

Força Muscular (escala de 0 a 5):

flexores do pescoço:

extensores do cotovelo:

extensores do punho:

extensores dos quirdáctilos:

cintura pélvica:

flexores do joelho:

flexores do tornozelo:

flexores dos pododáctilos:

Cintura escapular:

flexores do cotovelo:

flexores do punho:

flexores dos quirdáctilos:

extensores do joelho:

extensores do tornozelo:

extensores dos pododáctilos:

Assimetria de força muscular: sim não

Reflexos profundos: nomais hiporreflexia arreflexia

Enzimas Musculares: CPK:.

LDH:

Aldolase:

AST:

ALT:

Eletroneuromiografia: normal anormal

Velocidade de condução nervosa motora: normal reduzida

Velocidade de condução nervosa sensitiva:

normal reduzida

Musculatura proximal: atividade espontânea: sim não

potenciais polifásicos: sim não

duração dos potenciais musculares:

normal

diminuída

aumentada

amplitude dos potenciais musculares: normal

alta

baixa

Musculatura distal: atividade espontânea: sim não

potenciais polifásicos: sim não

duração dos potenciais musculares: normal

diminuída

aumentada

amplitude dos potenciais musculares: normal

alta

baixa

Biópsia Muscular – histoquímica:

Predominância de fibras tipo I: sim não

Predominância de fibras tipo II: sim não

Corpos nemalínicos:

pequena quantidade em pequena proporção de fibras musculares

presentes em mais de 25 % das fibras musculares

numerosos corpos nemalínicosna maioria das fibras musculares

localização: subsarcolemal intermiofibrilar intranuclear

Alterações nas colorações:

1. Hematoxilina-Eosina:

- proliferação de tecido conjuntivo
- infiltração por tecido adiposo
- fibrose em filetes nervosos
- alterações de mielina em filetes nervosos
- variação dos diâmetros das fibras musculares
- grandes aglomerados de fibras atroficas
- pequenos aglomerados de fibras atroficas
- fibras angulares atroficas dispersas
- fibras arredondadas atroficas dispersas
- fibras hipertróficas dispersas
- núcleos internos
- necrose fagocitose segmentações
- fibras granulares agregados tubulares
- corpos nemalínicos massas sarcoplasmáticas
- vacúolos corpos de inclusão citoplasmática
- infiltrado inflamatório difuso excessivo
- infiltrado inflamatório perivascular
- infiltrado inflamatório desproporcional à necrose
- fibras basofílicas fibras hipercontráteis opacas

2. ATP-ases pH 9,4; pH 4,3 e pH 4,6

Agrupamentos tipos idênticos de fibras

- | | |
|---|--|
| Predomínio de fibras tipo I <input type="checkbox"/> | Predomínio de fibras tipo II <input type="checkbox"/> |
| Hipertrofia de fibras tipo I <input type="checkbox"/> | Hipertrofia de fibras tipo II <input type="checkbox"/> |
| Atrofia de fibras tipo I <input type="checkbox"/> | Atrofia de fibras tipo II <input type="checkbox"/> |
| Deficiência de fibras tipo I <input type="checkbox"/> | Deficiência de fibras tipo II <input type="checkbox"/> |

3. NADH

Fibras angulares escuras atroficas

Sacabocados Alvos Cores centrais

Aumento focal central ou periférico

Turbilhões Enrodilhados Fibras em anel

4. Esterase Inespecifica

Fibras angulares atroficas escuras

Placas motoras aumentadas de volume

Aumento atividade de células no interstício

5. Miofosforilase

Redução ou ausência de atividade

6. Fosfatase Ácida

Aumento focal nas fibras

Fibras positivas

Aumento da atividade no interstício

Células inflamatórias e mononucleares

Atividade aumentada filetes nervosos

7. Fosfatase Alcalina

Fibras positivas Aumento de tecido intersticial

Aumento filetes nervosos

8. PAS

Depósito em vacúolos

9. Oil Red "O"

Aumento de gotículas de gorduras em fibras tipo I

Aumento de gotículas de gorduras em fibras tipo II

Depósito de gordura em vacúolos

Depósito de gordura membr. externa fibras

10. Cresil Violeta

Metacromasia em filetes nervosos

Metacromasia em vasos

11. Desidrogenase Succínica

Acúmulo na periferia das fibras □

Aumento focal nas fibras □

Fibras granulares □

Aumento do número de grânulos nas fibras □

Aumento do volume dos grânulos □

12. Citocromo C-Oxidase

Acúmulo na periferia de fibras □

Deficiência em fibras □

13. Sirius Red

Aumento do tecido intersticial (conjuntivo)

14. Adenilato Deaminase

Deficiência em fibras

ANEXO II
FÓRMULAS DAS SOLUÇÕES PARA IMUNOHISTOQUÍMICA

Solução de Tampão de Fosfato-Cloreto:

Cloreto de Sódio ----- 4 g

Fosfato de Sódio ----- 6,7 g

Água Destilada ----- 500 ml

Ajustar pH para 7,4 com HCl 2N

ANEXO III
TÉCNICA DA BIÓPSIA MUSCULAR

1. Tricotomia da região;
2. Anti-sepsia da pele com povidine degermante e depois álcool iodado;
3. Anestesia local com xylocaína à 1% sem vasoconstrictor. Anestesia apenas da pele e tecido celular subcutâneo sem infiltração do músculo;
4. Incisão da pele e do tecido celular subcutâneo, afastando a fáscia muscular;
5. Retirada de fragmento de músculo, medindo aproximadamente 1,0 cm x 0,5 cm x 0,5 cm;
6. O fragmento de músculo era embebido em gaze com soro fisiológico logo após a retirada e transportado ao laboratório;
7. Hemostasia do músculo;
8. Fechamento da fáscia com fio categut e sutura da pele com fio de algodão;
9. Curativo compressivo.