

ENIO ALBERTO COMERLATO

**DISTROFIA MUSCULAR DE CINTURAS:
ANÁLISE CLÍNICA, LABORATORIAL, ELETROMIOGRÁFICA,
HISTOPATOLÓGICA, IMUNOHISTOQUÍMICA E POR WESTERN BLOT DE
56 CASOS**

**Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor, pelo Curso de
Pós-Graduação em Medicina Interna, do
Setor de Ciências da Saúde, da
Universidade Federal do Paraná.**

Orientador: Prof. Dr. Lineu César Werneck

**CURITIBA
2003**



Ministério da Educação

Universidade Federal do Paraná


Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna - Mestrado/Doutorado

PARECER

PARECER CONJUNTO dos Professores Dra. Maris Vainzof, Dra. Leila Chimelli, Dr. Marcos Raimundo Gomes de Freitas, Dr^a. Rosana Hermínia Scola e Dr. Lineu César Werneck, sobre a Tese de Doutorado em Medicina Interna da Universidade Federal do Paraná, elaborada por Enio Alberto Comerlato, intitulada: **“DISTROFIA MUSCULAR DE CINTURAS: Análise Clínica, Laboratorial, Eletromiográfica, Histopatológica, Imuno-Histoquímica e por Western Blot de 56 Casos”**.

A Banca Examinadora considerou que Enio Alberto Comerlato apresentou trabalho adequado para Tese de Doutorado e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, atribuindo-lhe: Conceito "A", correspondente ao Grau "10,0", sendo pois unanimemente recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de DOUTOR EM MEDICINA e a publicação da tese em veículo de divulgação conveniente, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições.

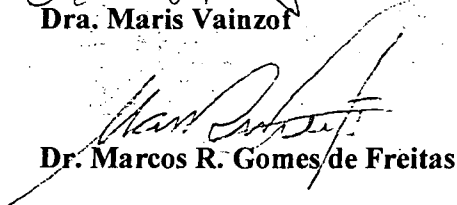
Curitiba, 12 de setembro de 2003.



Dra. Maris Vainzof



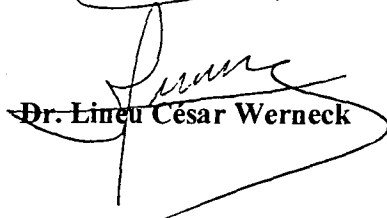
Dra. Leila Chimelli



Dr. Marcos R. Gomes de Freitas



Dr^a Rosana Herminia Scola



Dr. Lineu César Werneck



Ministério da Educação
Universidade Federal do Paraná
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA INTERNA
= MESTRADO e DOUTORADO =

DECLARAÇÃO

Declaro, para fins curriculares, que **ENIO ALBERTO COMERLATO** apresentou e defendeu com propriedade a tese intitulada: **“DISTROFIA MUSCULAR DE CINTURAS: Análise Clínica, Laboratorial, Eletromiográfica, Histopatológica, Imuno-Histoquímica e por Western Blot de 56 Casos”**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna, Doutorado, da Universidade Federal do Paraná em 12 de setembro de 2003

É concedido nesta data o título de **Doutor em Medicina**.

Curitiba, 12 de setembro de 2003.

Professor Dr. José Gastão Rocha de Carvalho
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna

Dedico este trabalho à minha esposa,
Cristiane, por estar sempre ao meu lado.

Agradeço especialmente

Aos meus pais, Enio e Maria Lourdes, que, por meio de seus exemplos, tornaram um sonho em realidade.

Aos meus pais de Curitiba, Juvenal e Sirlei, pelo constante carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Lineu César Werneck, pelas valiosas orientações e análises em todas as etapas deste trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Rosana H. Scola, pela amizade e constante incentivo nesta jornada.

À Dr.^a Lisolete Bruhn de Almeida, pelo grande carinho e amizade.

Ao Dr. José Carlos Ferreira e à Dr.^a Thereza Cristina Alvin, pela compreensão da importância da realização deste trabalho.

Ao Sr. Maurício Werneck e às Sr.^{as} Eunice de Oliveira e Nívea Hrysay, técnicos do laboratório de histoquímica e imuno-histoquímica do Serviço de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo grande auxílio prestado neste estudo.

Às secretárias do Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna da Universidade Federal do Paraná, pela disposição em colaborar.

Ao Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela realização deste trabalho e manutenção do laboratório.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
LISTA DE SÍMBOLOS	xvi
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 HISTÓRICO.....	1
1.2 FORMAS AUTOSSÔMICAS DOMINANTES DA DISTROFIA MUSCULAR DE CINTURA (DMC1).....	8
1.2.1 DMC1A.....	8
1.2.2 DMC1B.....	10
1.2.3 DMC1C.....	11
1.2.4 DMC1D.....	13
1.2.5 DMC1E.....	13
1.3 FORMAS AUTOSSÔMICAS RECESSIVAS DA DISTROFIA MUSCULAR DE CINTURA.....	14
1.3.1 DMC2A, Calpainopatia.....	14
1.3.2 DMC2B, Disferlinopatia.....	16
1.3.3 DMC2C-2F, Sarcoglicanopatias.....	18
1.3.3.1 DMC 2C, γ -sarcoglicanopatia.....	20
1.3.3.2 DMC2D, α -sarcoglicanopatia.....	21
1.3.3.3 DMC2E, β -sarcoglicanopatia.....	22
1.3.3.4 DMC2F, δ -sarcoglicanopatia.....	23
1.3.4 DMC2G, Teletoninopatia.....	24
1.3.5 DMC2H.....	25
1.3.6 DMC2I.....	26
1.3.7 DMC2J.....	27
1.4 DISTROFINOPATIAS.....	28
1.5 DEFICIÊNCIA DE LAMININA- α 2/MEROSINA.....	30
1.6 DIAGNÓSTICO DA DISTROFIA MUSCULAR DE CINTURAS.....	30
2 OBJETIVOS	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 SEXO.....	34
3.2 HISTÓRIA FAMILIAR.....	35
3.3 IDADE DE INÍCIO DOS SINTOMAS, TEMPO DE DOENÇA E IDADE NA AVALIAÇÃO.....	35
3.4 MANIFESTAÇÃO CLÍNICA INICIAL.....	36
3.5 TROFISMO MUSCULAR.....	36
3.6 GRADUAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR.....	37
3.7 MANOBRA DE GOWERS.....	38
3.8 AVALIAÇÃO DA MARCHA.....	38
3.9 ESTADO FUNCIONAL MOTOR.....	39

3.10 ENZIMAS MUSCULARES.....	40
3.11 ELETROMIOGRAFIA.....	40
3.12 BIÓPSIA MUSCULAR – HISTOPATOLOGIA.....	41
3.13 BIÓPSIA MUSCULAR – IMUNOIDENTIFICAÇÃO.....	44
3.13.1 Anticorpos Utilizados na Imunoidentificação.....	44
3.13.2 Técnica para Imunoidentificação da Distrofina, α -SG, β -SG, γ -SG, δ -SG, β -DG e Disferlina.....	46
3.13.3 Classificação da Imunoidentificação da Distrofina, α -SG, β -SG, γ -SG, δ -SG e β -DG, de acordo com o Grau de Fluorescência.....	48
3.13.4 Classificação da Imunoidentificação da Disferlina de acordo com o Grau de Fluorescência.....	50
3.13.5 Técnica para Imunoidentificação da Calpaína-3.....	50
3.13.6 Classificação da Imunoidentificação da Calpaína-3.....	53
3.14 Testes Estatísticos.....	53
4 RESULTADOS	
4.1 IMUNOIDENTIFICAÇÃO.....	55
4.2 CLASSIFICAÇÃO.....	56
4.3 SEXO.....	60
4.4 HISTÓRIA FAMILIAR.....	60
4.5 INÍCIO DOS SINTOMAS.....	61
4.6 IDADE NA AVALIAÇÃO.....	62
4.7 TEMPO DE DOENÇA NA AVALIAÇÃO.....	62
4.8 MANIFESTAÇÃO CLÍNICA INICIAL.....	63
4.9 ATROFIA DA MUSCULATURA PROXIMAL DOS MEMBROS SUPERIORES.....	64
4.10 ATROFIA DA MUSCULATURA DISTAL DOS MEMBROS SUPERIORES.....	65
4.11 ATROFIA DA MUSCULATURA PROXIMAL DOS MEMBROS INFERIORES.....	65
4.12 ATROFIA DA MUSCULATURA DISTAL DOS MEMBROS INFERIORES.....	66
4.13 HIPERTROFIA DE PANTURRILHAS.....	67
4.14 GRADUAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR PROXIMAL DOS MEMBROS SUPERIORES.....	67
4.15 GRADUAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR DISTAL DOS MEMBROS SUPERIORES.....	68
4.16 GRADUAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR PROXIMAL DOS MEMBROS INFERIORES.....	69
4.17 GRADUAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR DISTAL DOS MEMBROS INFERIORES.....	69
4.18 AVALIAÇÃO DA MARCHA.....	70
4.19 MANOBRA DE GOWERS.....	70
4.20 ESTADO FUNCIONAL MOTOR.....	71
4.21 ENZIMAS MUSCULARES.....	72
4.22 ELETROMIOGRAFIA.....	75
4.23 BIÓPSIA MUSCULAR – HISTOPATOLOGIA.....	75
5 DISCUSSÃO	83
5.1 SEXO.....	83
5.2 HISTÓRIA FAMILIAR.....	83
5.3 INÍCIO DOS SINTOMAS, IDADE NA AVALIAÇÃO E TEMPO DE DOENÇA.....	84
5.4 MANIFESTAÇÃO CLÍNICA INICIAL.....	85
5.5 AVALIAÇÃO DO COMPROMETIMENTO MUSCULAR.....	85
5.6 ENZIMAS MUSCULARES.....	86

5.7 ELETROMIOGRAFIA.....	87
5.8 HISTOPATOLOGIA.....	88
5.9 IMUNO-HISTOQUÍMICA E WESTERN BLOT.....	90
5.10 COMENTÁRIOS FINAIS.....	93
6 CONCLUSÕES.....	95
6.1 CONFIRMATÓRIAS.....	95
6.2 ORIGINAIS.....	96
REFERÊNCIAS.....	97
ANEXOS.....	118

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPONENTES GÊNICOS DAS DISTROFIAS MUSCULARES DE CINTURAS.....	31
TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO POR SEXO.....	34
TABELA 3 - HISTÓRIA FAMILIAR.....	35
TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DA IDADE DE INÍCIO DOS SINTOMAS, TEMPO DE DOENÇA E IDADE NA AVALIAÇÃO.....	35
TABELA 5 - MANIFESTAÇÃO CLÍNICA INICIAL.....	36
TABELA 6 - TROFISMO MUSCULAR.....	36
TABELA 7 - ESCALA MRC MODIFICADA PARA GRADUAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR.....	37
TABELA 8 - GRADUAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR.....	37
TABELA 9 - MANOBRA DE GOWERS.....	38
TABELA 10 - TIPO DE MARCHA.....	38
TABELA 11 - ESCALA FUNCIONAL DE VIGNOS / ARCHIBALD MODIFICADA.....	39
TABELA 12 - ESTADO FUNCIONAL MOTOR.....	39
TABELA 13 - DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS DAS ENZIMAS MUSCULARES.....	40
TABELA 14 - ELETROMIOGRAFIA.....	40
TABELA 15 - BIÓPSIA MUSCULAR – HISTOPATOLOGIA.....	43
TABELA 16 - BIÓPSIA MUSCULAR.....	44
TABELA 17 - IMUNOIDENTIFICAÇÃO DA DISTROFINA, COMPLEXO-SG, DISFERLINA, β -DG E CALPAÍNA-3.....	55
TABELA 18 - CLASSIFICAÇÃO DOS PACIENTES POR GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO.....	56
TABELA 19 - GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E SEXO.....	60
TABELA 20 - GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E HISTÓRIA FAMILIAR.....	61
TABELA 21 - GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E IDADE DE INÍCIO DOS SINTOMAS.....	61
TABELA 22 - GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E IDADE NA AVALIAÇÃO.....	62

TABELA 23 -GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E TEMPO DE DOENÇA.....	63
TABELA 24 -GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E MANIFESTAÇÃO CLÍNICA INICIAL.....	64
TABELA 25 -GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E ATROFIA MUSCULAR PROXIMAL MMSS.....	64
TABELA 26 -GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E ATROFIA MUSCULAR DISTAL MMSS.....	65
TABELA 27 -GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E ATROFIA MUSCULAR PROXIMAL MMII.....	66
TABELA 28 -GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E ATROFIA MUSCULAR DISTAL MMII.....	66
TABELA 29 -GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E HIPERTROFIA DE PANTURRILHAS.....	67
TABELA 30 -GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E GRADUAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR PROXIMAL MMSS.....	68
TABELA 31 -GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E GRADUAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR DISTAL MMSS.....	68
TABELA 32 -GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E GRADUAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR PROXIMAL MMII.....	69
TABELA 33 -GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E GRADUAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR DISTAL MMII.....	69
TABELA 34 -GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E TIPO DE MARCHA.....	70
TABELA 35 -GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E MANOBRA DE GOWERS.....	71
TABELA 36 -GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E ESTADO FUNCIONAL MOTOR.....	72
TABELA 37 -GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E DOSAGEM DO NÍVEL SÉRICO DA CK.....	72
TABELA 38 -GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E DOSAGEM DO NÍVEL SÉRICO DA LDH.....	73

TABELA 39 -GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E DOSAGEM DO NÍVEL SÉRICO DA AST.....	73
TABELA 40 -GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E DOSAGEM DO NÍVEL SÉRICO DA ALT.....	74
TABELA 41 -GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E DOSAGEM DO NÍVEL SÉRICO DA ALDOLASE.....	74
TABELA 42 -GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E PADRÃO ELETROMIOGRÁFICO.....	75
TABELA 43 -GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E ALTERAÇÕES NO DIÂMETRO DAS FIBRAS.....	76
TABELA 44 - GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E ALTERAÇÃO NA DISTRIBUIÇÃO DE FIBRAS.....	77
TABELA 45 -GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E PROCESSO DE DEGENERAÇÃO E REGENERAÇÃO.....	77
TABELA 46 -GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS.....	78
TABELA 47 -GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS.....	78
TABELA 48 -GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E PADRÃO DA BIÓPSIA MUSCULAR.....	79

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Representação esquemática da molécula de distrofina, formada pelo terminal amino, domínio rod e terminal carboxila [modificado de KOENIG et al., 1988].....6
- FIGURA 2 - Representação esquemática da arquitetura molecular do complexo distrofina e das proteínas associadas à distrofina [modificado de BUSHBY, 1999].....7
- FIGURA 3 - A) Organização do gene da miotilina, sendo os éxons representados em algarismos romanos e os íntrons pelo seu tamanho; B) Representação esquemática da molécula de miotilina mostrando a região rica em serina (caixa preta) e os dois domínios imunológicos (cinza), codificados pelos éxons VI-VII e VIII-IX respectivamente; C) localização da miotilina na banda I, linha Z, do sarcoômero [modificado de HAUSER et al., 2000; SALAMIKANGAS et al., 1999]9
- FIGURA 4 - A) Representação esquemática das lâminas A/C. B) Localização no interior da membrana nuclear [modificado de MUCHIR et al., 2000]..... 10
- FIGURA 5 - A) Representação esquemática do gene da caveolina-3, formada por 2 éxons; B) Formação da caveolina-3 por 151 aminoácidos; C) Terminal amino (N), domínio transmembrana (TM) e terminal carboxila (C) da caveolina-3; D) Representação esquemática da ligação caveolina-3 com o complexo distrofina/proteínas associadas e da enzima óxido nítrico sintetase neural (nNOS) [modificado de ENGELMAN et al., 1998; OZAWA et al., 2001; TANG et al., 1996] 12
- FIGURA 6 - Representação molecular esquemática da calpaína mostrando os domínios I – IV e as inserções NS, IS1 e IS2 [modificado de TIDBALL & SPENCER et al., 2000]..... 14
- FIGURA 7 - Representação esquemática da disferlina, mostrando os domínios C2 e transmembrana [modificado de DAVIS et al., 2000]..... 16
- FIGURA 8 - A) Representação esquemática da estrutura molecular da α , β , γ e δ -SG; B) Representação esquemática das ligações das proteínas do complexo SG com a proteína β -DG [modificado de OZAWA et al., 1998 e 2001]..... 18
- FIGURA 9 - Representação esquemática do aumento da tensão do sarcolema durante a contração muscular, ocasionando a dilaceração da membrana e conseqüente aumento do influxo de cálcio para o interior do citoplasma da fibra muscular, quando existe alteração do complexo distrofina e PAD [modificado de OZAWA, 2001]..... 19

FIGURA 10 - Representação esquemática do sarcômero, localização da teletonina [modificado de HARAVUORI et al., 2001].....	24
FIGURA 11 - Representação esquemática do sarcômero, identificação da titina, entre o disco Z e linha M [modificado de HARAVUORI et al., 2001]	28
FIGURA 12 - Representação esquemática do protocolo para e visualização da fluorescência em microscópio de epi-iluminação.....	48
FIGURA 13 - Imunoidentificação deficiente, mostrando ausência de fluorescência na maioria das fibras. Anticorpo primário anti- β -SG. Barra 25 μ	49
FIGURA 14 - Imunoidentificação deficiente, traços de fluorescência em raras fibras. Anticorpo primário anti- α -SG. Barra 25 μ	49
FIGURA 15 - Imunoidentificação reduzida, mostrando redução difusa da fluorescência. Anticorpo primário anti- α -SG. Barra 100 μ	49
FIGURA 16 - Imunoidentificação normal, fluorescência uniforme em todas as fibras musculares. Anticorpo primário anti- γ -SG. Barra 100 μ	49
FIGURA 17 - Representação esquemática da montagem do cassete de transferência das proteínas do gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para a membrana de nitrocelulose.....	51
FIGURA 18 - Representação esquemática da imunoidentificação da proteína (calpaína-3) na membrana de nitrocelulose (Western Blot)	52
FIGURA 19 - Imunoidentificação da calpaína-3 (vermelho); Barradores de peso molecular (preto).....	53
FIGURA 20 - Sarcoglicanos ausentes (caso 51). A: Alfa; B: Beta; C:Gama; D: Delta. Barra 25 μ	57
FIGURA 21 - Distrofina normal (caso 51). A: Terminal Carboxila; B: Terminal Amino; C: Domínio Rod. Barra 100 μ	57
FIGURA 22 - Disferlina (caso 51): Normal. Barra 25 μ	57
FIGURA 23 - Disferlina A: Normal; B: Ausente (caso 38). Barra 25 μ	58
FIGURA 24 - Distrofina normal (caso 38). A: Terminal Carboxila; B: Terminal Amino; C: Domínio Rod. Barra 100 μ	58
FIGURA 25 - Sarcoglicanos normais (caso 38). A: Alfa; B: Beta; C: Gama; D: Delta. Barra 100 μ	58
FIGURA 26 - Calpaína-3. A: normal (Barrador vermelho); B:ausência da banda (caso 30).....	59

FIGURA 27 - Distrofina normal (caso 30). A: Terminal Carboxila; B: Terminal Amino; C: Domínio Rod. Barra 100μ.....	59
FIGURA 28 - Sarcoglicanos normais (caso 30). A: Alfa; B: Beta; C: Gama; D: Delta. Barra 100μ.....	59
FIGURA 29 - Disferlina normal (caso 30). Barra 25 μ.....	59
FIGURA 30 - A) discreta proliferação de tecido conjuntivo, infiltração por tecido adiposo, variação no diâmetro das fibras. B) Fibras atróficas basofílicas. H&E. Barra 100μ.....	80
FIGURA 31 - Fibras em fase de degeneração e fagocitose. Tricromo de Gomori modificado. Barra 100μ.....	80
FIGURA 32 Atrofia e hipertrofia de fibras tipo 1 e 2. ATPase pH 4,3. Barra 100μ....	80
FIGURA 33 Aumento do NBT reduzido e turbilhões. NADH-TR. Barra 100μ.....	80
FIGURA 34 - A) Variação do diâmetro das fibras, proliferação tecido endomisial e adiposo. B) Fibras basofílicas. H&E. Barra 100μ.....	81
FIGURA 35 - Fibras atróficas, fibra com núcleo central. Tricromo de Gomori modificado. Barra 100μ.....	81
FIGURA 36 - Atrofia de fibras tipo 1 e 2. ATPase pH 4,3. Barra 100μ.....	81
FIGURA 37 - Retículo sarcoplasmático irregular e sacabocados. NADH-TR. Barra 100μ.....	81
FIGURA 38 - A) Variação do diâmetro das fibras, fibras atróficas e hipertróficas fibras, sem padrão especial de distribuição e com núcleos centrais. B) Fibras em segmentação. H&E. Barra 100μ.....	82
FIGURA 39 - Fibra em fase de degeneração e fagocitose. Tricromo de Gomori modificado. Barra 100μ.....	82
FIGURA 40 - Atrofia e hipertrofia de fibras tipo 1 e 2. ATPase pH 4,3. Barra 100μ....	82
FIGURA 41 - Retículo sarcoplasmático irregular e sacabocados. Fibras lobuladas NADH-TR. Barra 100μ.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT/TGP -	Alanino-aminotransferase
AST/TGO -	Aspartato-aminotransferase
ATPase -	Adenosina trifosfatase
Calpaína-3 -	Calcium activated neutral protease 3
CK -	Creatinaquinase
DAG -	Glicoproteína Asociada à Distrofina
DG -	Distroglicano
DMB -	Distrofia Muscular de Becker
DMC -	Distrofia Muscular de Cinturas
DMC1 -	Distrofia Muscular de Cinturas Autossômica Dominante
DMC2 -	Distrofia Muscular de Cinturas Autossômica Recessiva
DMD -	Distrofia Muscular de Duchenne
DMED -	Distrofia Muscular Autossômica Dominante de Emery-Dreifuss
DFSH -	Distrofia Muscular Facioescapuloumeral
EMG -	Eletromiografia
HE -	Hematoxilina eosina
LDH -	Desidrogenase láctica
MMSS -	Membros Superiores
MMII -	Membros Inferiores
NADH-TR -	Nicotinamida adenina dinucleotídeo - tetrazolium redutase
NBT -	Nitroblue tetrazolium
nNOS -	Óxido nítrico sintetase neuronal
PAD -	Proteínas Associadas à Distrofina

PAS -	Ácido periódico Schiff
PAUM	Potencial de ação da unidade motora
PRFK -	Proteína Relacionada à Fukutina
SDH -	Desidrogenase succínica
SG -	Sarcoglicano
SIN -	Sintroglicano
TRIM32 -	Tripartite-motif protein Gene 32
TG -	Tricromo de Gomori
WB -	Western Blot

LISTA DE SÍMBOLOS

α - Alfa

β - Beta

γ - Gama

δ - Delta

ϵ - Épsilon

Ca - Cálcio

kb - Quilobase

kDa - Quilo Dalton

Mb - Megabase

RESUMO

A distrofia muscular de cintura (DMC) representa um grupo clínico e geneticamente heterogêneo de doenças musculares degenerativas de herança autossômica dominante e recessiva, classificadas geneticamente. Com o objetivo de melhorar a abordagem diagnóstica, 56 pacientes com diagnóstico sugestivo de DMC, 32 masculinos e 24 femininos, submeteram-se a avaliação clínica, laboratorial, eletromiográfica, histopatológica e imuno-histoquímica. A idade de início dos sintomas variou entre 7 meses e 56 anos. Na apresentação dos sintomas, houve o comprometimento da musculatura dos membros inferiores em 37 casos, dos membros superiores em 12 e ambos em 7. Observou-se atrofia da cintura escapular em 37 casos e da pélvica em 30. Apenas 5 pacientes tiveram hipertrofia de panturrilhas. A fraqueza da musculatura proximal dos membros superiores e inferiores, a marcha miopática e a manobra de Gowers foram observadas na maioria dos casos. A perda da marcha ocorreu em 5 casos. Houve elevação importante dos níveis séricos de creatinaquinase (CK) em 21 casos. A eletromiografia (EMG) e a biópsia muscular apresentaram padrão miopático na maioria dos casos. A análise da distrofina foi normal em todas as biópsias musculares. A presença isolada do padrão neurogênico na biópsia muscular não serviu como critério de exclusão. Houve deficiência de α -sarcoglicano em 14, de β -sarcoglicano em 10, de γ -sarcoglicano em 11, de δ -sarcoglicano em 13, de disferlina em 8 e de calpaína-3 em 5 casos. A deficiência na imunoidentificação das proteínas α , β , γ e δ -sarcoglicano permitiu classificar os casos no grupo das sarcoglicanopatias; de γ -sarcoglicano, como γ -sarcoglicanopatia; de disferlina, como disferlinopatia, e de calpaína-3, como calpainopatia. Os casos de sarcoglicanopatias foram mais frequentes, seguidos da disferlinopatia e da calpainopatia. A hipertrofia de panturrilhas ocorreu apenas no grupo com deficiência do complexo SG. Os casos com deficiência de calpaína-3 ocorreram mais no sexo masculino, tiveram início mais precoce e houve maior comprometimento da força muscular. Os casos com deficiência de disferlina ocorreram mais no sexo feminino e tiveram início mais tardio em relação à calpainopatia e as sarcoglicanopatias.

ABSTRACT

The limb-girdle muscle dystrophy represents a heterogeneous group of muscular diseases with dominant and recessive inheritance, individualized by gene mutation. A heterogeneous group of 56 patients, 32 males and 24 females, with suggestive LGMD diagnosis was clinically, laboratory, electromyography, muscle biopsy and immunohistochemical evaluated to make a diagnostic approach. The onset ranged from 7 months to 57 years. The symptoms onsets were present by lower limbs in 37 cases, 12 in the upper and 7 in both. Scapular girdle atrophy was observed in 37 cases and pelvic in 30. Only 5 patients had calf hypertrophy. The weakness of proximal upper and lower muscles, the myopathic gait and the Gowers sign was observed in most of cases. The loss of ambulation was observed only in 5. Very high CK serum levels occurred in 21. The electromyography and muscle biopsy showed myopathic pattern in most of cases. An isolated neurogenic pattern in the muscular biopsy doesn't exclude the diagnosis. The dystrophin was normal in all muscle biopsies. Deficiency of α -sarcoglycan was observed in 14, to β -sarcoglycan in 10, to γ -sarcoglycan in 11, to δ -sarcoglycan in 13, dysferlin in 8 and calpain-3 in 5 cases. The cases with deficiency of α , β , γ and δ -sarcoglycan were classified into the sarcoglycan group, γ -sarcoglycan deficiency as γ -sarcoglycanopathy, dysferlin deficiency as dysferlinopathy and calpain-3 deficiency as calpainopathy. The sarcoglycan deficiency group was more frequent, followed by the dysferlin and calpain-3 groups. Only the sarcoglycan deficiency group showed calf hypertrophy. The dysferlin deficiency group was more frequent in females and the onset was later than sarcoglycan and calpain-3 deficiency groups. The calpain-3 deficiency group occurred only in males and showed an earlier onset and more muscular weakness.

1 INTRODUÇÃO

A distrofia muscular de cintura (DMC) representa um grupo clínico e geneticamente heterogêneo de doenças musculares degenerativas de herança autossômica dominante e recessiva [BECKMANN et al., 1999; BUSHBY et al., 1995a, 1995b, 1996; SPEER et al., 1992; SPEER, YAMOAKA & GILCHRIST, 1993; URTASUN & MUNAIN, 1999].

Entre as formas com padrão autossômico dominante (DMC1), identificaram-se mutações no gene da miotilina (DMC1A) [SPEER et al., 1992], das lâminas A/C (DMC1B) [VAN DER KOOL et al., 1996, 1997; MUCHIR et al., 2000], da caveolina-3 (DMC1C) [MINETTI et al., 1998; MCNALLY et al., 1998] e as localizadas nos cromossomos 6 (DMC1D) [MESSINA et al., 1997] e 7 (DMC1E) [SPEER et al., 1999].

Identificaram-se pelo menos nove formas com padrão autossômico recessivo (DMC2), ocasionadas por mutações nos genes da calpaína-3 (DMC2A) [RICHARD et al., 1995], disferlina (DMC2B) [BASHIR et al., 1994; PASSOS-BUENO et al., 1995a], γ -sarcoglicano (DMC2C) [NOGUCHI et al., 1995], α -sarcoglicano (DMC2D) [ROBERDS et al., 1993 e 1994], β -sarcoglicano (DMC2E) [BECKMANN et al., 1996; BÖNNEMANN et al., 1995], δ -sarcoglicano (DMC2F) [PASSOS-BUENO et al., 1996b], teletonina (DMC2G) [MOREIRA et al., 1997], "TRIM32" (DMC2H) [WEILER et al., 1998], da proteína relacionada à fukutina (DMC2I) [DRISS et al., 2000] e titina (DMC2J) [HARAVUORI et al., 2001].

Em razão da sobreposição de sintomas e sinais, fica difícil um diagnóstico clínico adequado, se não impossível. Por esta razão, existe a necessidade de serem utilizados diferentes métodos laboratoriais para o diagnóstico preciso, que resultará no aconselhamento genético e, no futuro, da possibilidade do tratamento definitivo.

Para este trabalho, propôs-se uma revisão da literatura das DMC, tanto dos sintomas como dos métodos diagnósticos. Em seguida, os casos foram estudados

sob o ponto de vista clínico e laboratorial, com especial ênfase na imunoidentificação das proteínas no diagnóstico diferencial das DMC [ANDERSON, 1996].

1.1 HISTÓRICO

O estudo científico das distrofias musculares teve início em meados do século XIX, quando Edward Meryon descreveu os achados clínicos e patológicos sobre quatro irmãos, com história de atraso do desenvolvimento motor, dificuldade de marcha rapidamente progressiva e aumento anormal da massa muscular. Os pacientes foram a óbito antes dos 20 anos de idade e apresentavam na biópsia muscular “degeneração granular dos músculos voluntários” [ENGEL, 1986].

Posteriormente, em 1868, Guillaume-Benjamin Duchenne de Boulogne observou que as alterações patológicas eram de origem muscular e passou a chamar a doença de *paralysie musculaire pseudohypertrophique*, caracterizando-a pelo acometimento da musculatura proximal, com início em membros inferiores; postura lordótica e base aumentada; presença de algum grau de hipertrofia muscular, mesmo para músculos fracos; progressão rápida dos sintomas; diminuição da contração elétrica muscular nos estágios finais da doença e ausência de febre, distúrbios sensitivos, vesicais e intestinais [DUCHENNE, 1868].

Gowers, em 1879, acrescentou aspectos clínicos importantes à doença, como a manobra peculiar utilizada pelos pacientes a fim de se erguerem do solo, — de forma a galgar o próprio corpo —, ocasionada pela fraqueza da musculatura proximal; a ausência da pseudo-hipertrofia da musculatura, em alguns casos, e a freqüente associação da história familiar materna da doença [GOWERS, 1879a, 1879b, 1879c, 1879d].

Erb, em 1884, ao revisar os principais achados clínicos e anatomopatológicos de 89 casos, introduziu o termo “distrofia muscular progressiva”, com objetivo de incorporar o caráter hereditário da doença, classificando os pacientes de acordo com os achados clínicos em “atrófica juvenil”, “pseudo-hipertrófica”, “infantil” e “hereditária” [ERB, 1891].

Batten, em 1909, classificou as distrofias musculares, também de acordo com as características clínicas dos pacientes, em: 1) forma atrófica simples, para os casos descritos por Ernest von Leyden, em 1875, e Paul Möebius, em 1879, que apresentavam atrofia da musculatura da cintura pélvica; 2) forma juvenil, caracterizada por Erb pelo acometimento da cintura escapular e início mais tardio dos sintomas; 3) forma facioescapuloumeral, descrita por Landouzy-Déjerine, com acometimento típico da mesma musculatura; forma distal descrita por Gowers-Spiller, com acometimento da musculatura distal; 4) formas miotônicas, caracterizadas pelo atraso do relaxamento muscular; 5) tipos mistos transicionais [ENGEL & SHIELDS, 1986].

Bell, em 1943, incorporou o padrão de herança na classificação das distrofias, dividindo-as em três grupos com características genéticas distintas: 1) tipo pseudo-hipertrófica, de herança recessiva ligada ao sexo; 2) tipo atrófica, sem hipertrofia e acometimento facial, geralmente de herança autossômica recessiva; 3) tipo facial, com acometimento da musculatura facial, de herança autossômica dominante [ENGEL & SHIELDS, 1986] .

Tyler e Wintrobe, em 1950, ao analisar aproximadamente 250 pacientes, classificaram as distrofias musculares em dois grupos homogêneos: 1) tipo infantil, caracterizado pelo início dos sintomas na infância, acometimento da musculatura axial e pélvica, sem comprometimento da musculatura facial, progressão rápida dos

sintomas e padrão autossômico recessivo ligado ao sexo; 2) tipo facioescapuloumeral, com início dos sintomas na infância e adolescência, acometimento da musculatura facial e peitoral, progressão lenta dos sintomas e padrão de herança autossômico [TYLER & WINTROBE, 1950] .

Stevenson, em 1953, ao estudar 51 famílias da Irlanda do Norte, classificou as distrofias musculares em: 1) distrofia muscular progressiva tipo Duchenne, caracterizada pelo padrão de herança ligado ao sexo, em razão do acometimento exclusivo em meninos, apresentando início nos primeiros anos de vida, progressão rápida dos sintomas e perda da capacidade de marcha até os 12 anos; 2) distrofia muscular autossômica cintura–membro, que agrupava pacientes com acometimento da musculatura facial, cintura pélvica ou escapular, semelhante ao tipo facioescapuloumeral descrito por Tyler e Wintrobe [STEVENSON, 1953, 1955].

Walton e Natrass, em 1954, ao analisar os achados clínicos e genéticos de 105 pacientes, classificaram as distrofias musculares em três grupos principais: 1) distrofia muscular de Duchenne (DMD), que era rapidamente progressiva, acometendo a musculatura proximal, de herança ligada ao sexo; 2) distrofia muscular facioescapuloumeral, lentamente progressiva, envolvendo os músculos da face, estabilizadores da escápula e da porção proximal dos braços, de herança autossômica dominante; 3) distrofia muscular de cintura–membro (DMC), introduzida como nova entidade clínica, caracterizada pelo acometimento da musculatura da cintura pélvica e escapular, progressão variada dos sintomas, envolvendo musculatura proximal, com início na adolescência, geralmente de padrão autossômico recessivo [WALTON & NATTRASS, 1954].

A DMC passou a agrupar grande número de pacientes com evolução clínica e padrão de hereditariedade semelhantes, principalmente os que se enquadravam

na classificação tipo juvenil de Erb, pélvica de Leyden-Möbius e de início tardio [ENGEL & SHIELDS, 1986; JACKSON & STREHLER, 1968].

Logo surgiram dificuldades no diagnóstico da DMC, quando Becker e Kiener, em 1955, e Walton, em 1956, identificaram a forma benigna da distrofia muscular de Duchenne, posteriormente denominada de distrofia muscular de Becker (DMB), caracterizada pelo início tardio e evolução lenta dos sintomas, semelhante à DMC [ENGEL & SHIELDS, 1986; MARKAN et al., 1969; WALTON, 1956].

O aprimoramento das técnicas de histoquímica fez com que grande número de casos, originalmente classificados por Walton e Natrass como DMC, fossem posteriormente diagnosticados como de doença do neurônio motor inferior, polimiosite, miopatia endócrina, metabólica e mitocondrial [BODDIE & STEWART-WYNNE, 1974; CARTIER et al., 1995, ENGEL & SHIELDS, 1986; SERRATRICE et al., 1983, 1985].

Questionados da verdadeira existência da DMC como entidade clínica distinta, Walton e Gardner-Medwin abandonam o termo e retomam a classificação clínica tradicional, dividindo-a em: 1) subtipo escapuloumeral de Erb; 2) miopatia do quadríceps; 3) forma autossômica recessiva severa da infância; 4) forma autossômica dominante de início tardio [BACON & SMITH, 1971; BEN HAMIDA & MARRAKCHI, 1980a, 1980b; ENGEL & SHIELDS, 1986; ESPIR & MATTHEWS, 1973; FINELLI, 1979; JACKSON & STREHLER, 1968; KIM, CHUNG & FISK, 1979; VAN WIJNGAARDEN et al., 1968].

Por falta de uma metodologia mais precisa, a DMC tornou-se um diagnóstico de exclusão, sendo utilizado apenas em grupos familiares distintos localizados em comunidades isoladas, em que, por causa do acometimento de várias gerações afetadas, ficava caracterizado o padrão de herança autossômico recessiva ou dominante [BACON & SMITH, 1971; BEN HAMIDA & MARRAKCHI 1980 1980a, 1980b, BEN HAMIDA et al., 1983; BEN

HAMIDA, FARDEAU & ATTIA, 1983; HURWITZ et al., 1967; ROWLAND, 1995; SALIH et al., 1983, 1996; SHOKEIR & KOBRINSKY, 1976; UDD, KÄÄRIÄNEN & SOMER, 1991].

Com a localização citogenética do gene da DMD — no braço curto do cromossomo X, na porção Xp21 —, com posterior clonagem do DNA, codificação e identificação do produto protéico, distrofina (Figura 1), houve grandes avanços na elucidação da patogênese das distrofias musculares [BUSHBY, 1999; CHELLY et al., 1988; DUGGAN & HOFFMAN, 1996; FRANCKE et al., 1985; GOONEWARDENA et al., 1988; GREENSTEIN et al., 1980; GREENSTEIN, REARDON & CHAN, 1977; HOFFMAN, BROWN & KUNKEL, 1987; KOENIG, MONACO & KUNKEL, 1987; KUNKEL et al., 1985; OZAWA et al., 1998; ZUBRZYCKA-GAARN et al., 1988].



FIGURA 1 – Representação esquemática da molécula da distrofina, mostrando o terminal amino, domínio rod e terminal carboxila [modificado de KOENIG et al., 1988].

A análise inicial da localização da distrofina na porção citoplasmática do sarcolema permitiu identificar sua associação compacta a uma grande glicoproteína integral do sarcoplasma, que teria como função estrutural de interligar a distrofina à membrana basal. Posteriormente se verificou que se tratava de um grande complexo oligomérico, formado pela distrofina, duas proteínas glicosiladas com massa molecular de 156 kDa (α -dístroglicano) e 43 kDa (β -dístroglicano) — chamado também de subcomplexo dístroglicano (DG) (Figura 2) —, pela associação de cinco proteínas com massa molecular de 50 kDa (α -sarcoglicano), 43 kDa (β -sarcoglicano), 35 kDa (γ -sarcoglicano), 35 kDa (δ -sarcoglicano) e 50 kDa (ϵ -

sarcoglicano) — denominado de subcomplexo sarcoglicano (SG) (Figura 2) — e da associação de três proteínas com peso molecular de 60 kDa (α , β 1 e γ 2 sintrofinas), subcomplexo das sintrofinas (Figura 2) [CAMPBELL et al., 1989, 1995a; ERVASTI et al., 1990, ERVASTI, KAHL & CAMPBELL, 1991; ERVASTI & CAMPBELL, 1991; IBRAGHIMOV-BESKROVNAYA et al., 1992; JAMES & CAMPBELL, 1991; JUNG et al., 1995; MATSUMURA & CAMPBELL, 1993; MATSUMURA et al., 1992, 1993; MCNALLY, LY & KUNKEL, 1998; OZAWA et al., 1998; ROBERDS et al., 1993; SUNADA & CAMPBELL, 1995; TINSLEY et al., 1992; WATKINS et al., 1988; YAMAMOTO et al., 1993; YOSHIDA & OZAWA, 1990].

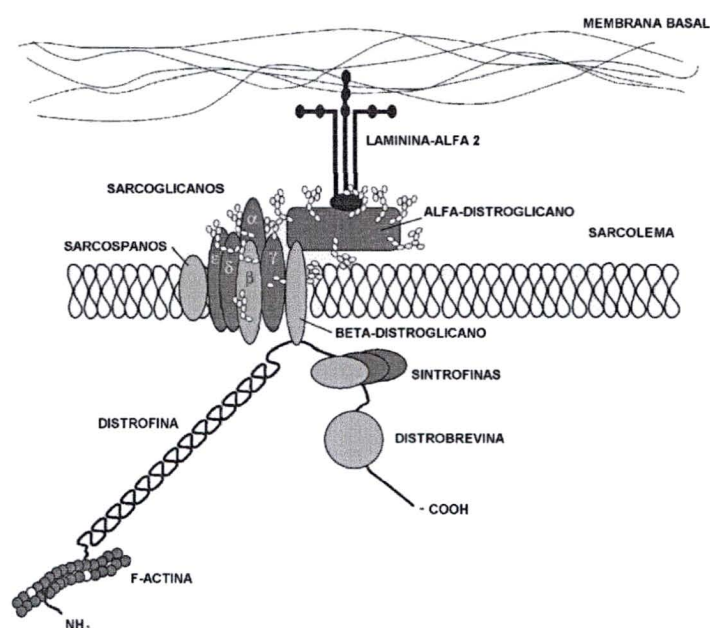


FIGURA 2 – Representação esquemática da arquitetura molecular do complexo distrofina e das proteínas associadas à distrofina [modificado de BUSHBY, 1999].

Com base no estudo das mutações e das alterações da distrofina e das proteínas associadas e dos genes que codificam seus componentes, foi possível identificar e classificar parte das DMC (DMC2C, 2D, 2E, 2F) [OZAWA et al., 1998].

Atualmente a DMC reúne um grupo clínico e geneticamente heterogêneo de doenças musculares de herança autossômica dominante (DMC1) e recessiva (DMC2). As formas autossômicas recessivas representam aproximadamente 90%

dos casos, apresentam grande distribuição geográfica e se dividem em dois grupos principais: a) associado a defeitos do complexo SG, grupo das sarcoglicanopatias (DMC2C, 2D, 2E e 2F); b) com preservação do complexo SG, formado pelos tipos DMC2A, 2B, 2G, 2H, 2I e 2J [BUSHBY, 1996, 1999; BUSHBY & BECKMANN, 2003; MATSUMURA et al., 1992].

1.2 FORMAS AUTOSSÔMICAS DOMINANTES DA DISTROFIA MUSCULAR DE CINTURA (DMC1)

1.2.1 DMC1A

O gene que codifica a miotilina está localizado no braço longo do cromossomo 5, locus 5q31. A miotilina é uma proteína sarcomérica formada por 498 aminoácidos, que apresenta peso molecular aproximado de 57 kDa (Figura 3B). O gene é formado por aproximadamente 20k pares de bases, sendo composto de 10 éxons. A leitura tem início pelo éxon II (Figura 3A). Os éxons VI-VII e VIII-IX codificam os dois domínios imunológicos semelhantes à titina (Figura 3A e 3B). A miotilina se liga à α -actina na banda I, disco Z, do sarcômero das fibras musculares esqueléticas (Figura 3C). A miotilina é observada em menor grau no músculo cardíaco, estando ausente na musculatura lisa e demais tecidos. Identificou-se na DMC1A uma única mutação responsável pela doença, a substituição da citosina por tiamina na posição 450, éxon 2, do gene da miotilina, que ocasiona perturbação física do disco Z do sarcômero [HAUSER et al., 2000; SALAMIKANGAS et al., 1999].

A doença se caracteriza por apresentar o início dos sintomas na idade adulta, em média aos 27 anos, acometendo a musculatura proximal dos MMII, com progressão para musculatura distal. Aproximadamente metade dos pacientes

desenvolve voz anasalada, por causa do acometimento da musculatura do palato. Existe o fenômeno de antecipação, com aumento do grau de gravidade e diminuição da idade do início dos sintomas. Os níveis séricos de CK podem variar de 1,6 a 9 vezes acima do normal. A EMG pode apresentar o padrão miopático. Na biópsia muscular, observa-se variação do diâmetro das fibras, necrose, aumento de fibras com núcleos centrais, infiltração de tecido adiposo e conjuntivo, com ausência de células inflamatórias. A imunoidentificação da distrofina e das proteínas do complexo SG estão normais. [HAUSER et al., 2000; SPEER et al., 1992].

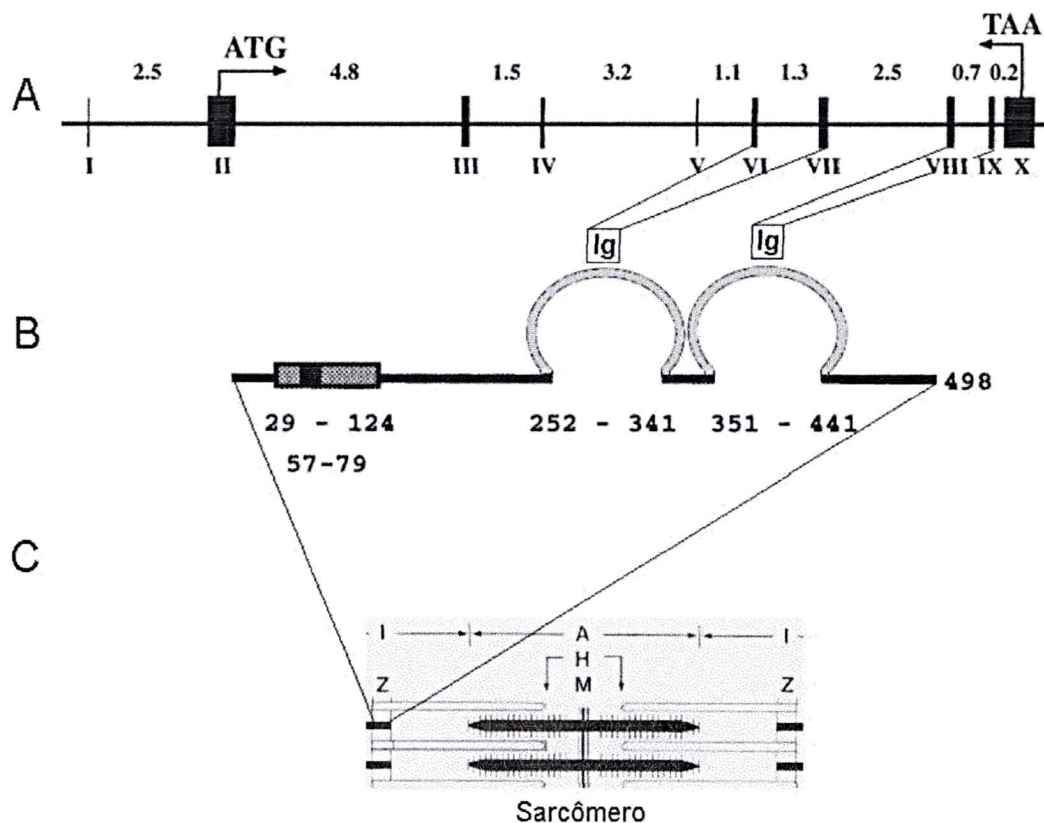


FIGURA 3 – A) Organização do gene da miotilina, sendo os éxons representados em algarismos romanos e os íntrons pelo seu tamanho; B) Representação esquemática da molécula de miotilina mostrando a região rica em serina (caixa preta) e os dois domínios imunológicos (cinza), codificados pelos éxons VI-VII e VIII-IX respectivamente; C) localização da miotilina na banda I, linha Z, do sarcômero [modificado de HAUSER et al., 2000; SALAMIKANGAS et al., 1999].

1.2.2 DMC1B

O gene da DMC1B foi localizado no braço longo do cromossomo 1, lócus 1q11-21, responsável pela codificação das lâminas A/C do envelope nuclear, por meio de mutações nos éxons 8. A distrofia muscular de Emery-Dreifuss, miocardiopatia dilatada 1B (DCM1B), lipodistrofia parcial familiar e neuropatia hereditária tipo 2B1 também foram associadas a mutações nos genes das lâminas A/C do envelope nuclear [BROWN, MUNTONI & SEWRY, 2001; KITAGUCHI et al., 2001; MUCHIR et al., 2000; VAN DER KOOI et al., 1996].

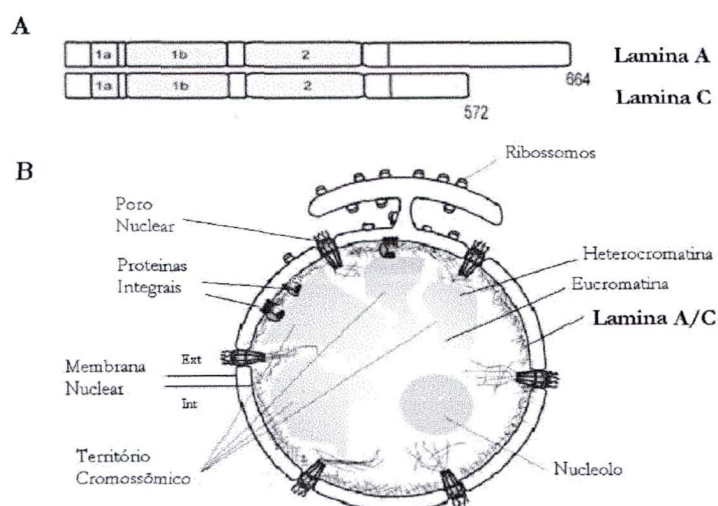


FIGURA 4 – A) Representação esquemática das lâminas A/C. B) Localização no interior da membrana nuclear [modificado de MUCHIR et al., 2000].

A doença apresenta o início dos sintomas entre 4 e 38 anos, a maioria na infância, por acometimento da musculatura proximal dos membros inferiores, em razão da dificuldade de marcha miopática e desenvolvimento de postura lordótica. O acometimento dos membros superiores geralmente ocorre aos 40 anos de idade, em que se pode observar atrofia leve do músculo bíceps braquial. As contraturas

musculares são de grau leve e pouco freqüentes, bem como o acometimento da musculatura distal dos membros inferiores. A progressão dos sintomas é lenta, com perda de marcha na sexta ou sétima década de vida. A função pulmonar pode estar discretamente diminuída. O nível sérico de CK apresenta elevação discreta, de até três vezes do valor normal. Os padrões da EMG e da biópsia muscular são semelhantes às demais distrofias musculares. As alterações cardíacas são idade dependente, geralmente acarretam o surgimento de arritmias cardíacas graves, em razão do comprometimento do sistema de condução atrioventricular, sendo menos comum o desenvolvimento de miocardiopatia dilatada [BROWN, MUNTONI & SEWRY, 2001; KITAGUCHI et al., 2001; MUCHIR et al., 2000; VAN DER KOOI et al., 1996, 1997] .

1.2.3 DMC1C

O gene da DMC1C foi localizado no braço curto do cromossomo 3, locus 3p25 (Figura 5A), responsável pela codificação da caveolina-3, proteína sarcolemal músculo específica de peso molecular aproximado de 22 kDa, formada por 151 aminoácidos (Figura 5B). A sua estrutura molecular é semelhante a um grampo de cabelo, apresentando domínio transmembrana e dois terminais, amino e carboxila, voltados para o citoplasma. A caveolina-3 se agrupa formando oligômeros nos pinçamentos da membrana citoplasmática, cavéolos, que teriam como função concentrar substâncias para o transporte e transdução de sinais de membrana. Os terminais N e C, no citoplasma, apresentam ligações com a distrofina e proteínas associadas, onde participariam da transdução de sinais por meio da ativação da enzima óxido nítrico sintetase neuronal (nNOS) (Figura 5C) [ENGELMAN et al., 1998; MCNALLY

et al., 1998; OKAMOTO et al., 1998; OZAWA, NISHINO & NONAKA, 2001; SARGIACOMO et al., 1995; SHAUL et al., 1996; SONG et al., 1996; TANG et al., 1996; VENEMA et al., 1997].

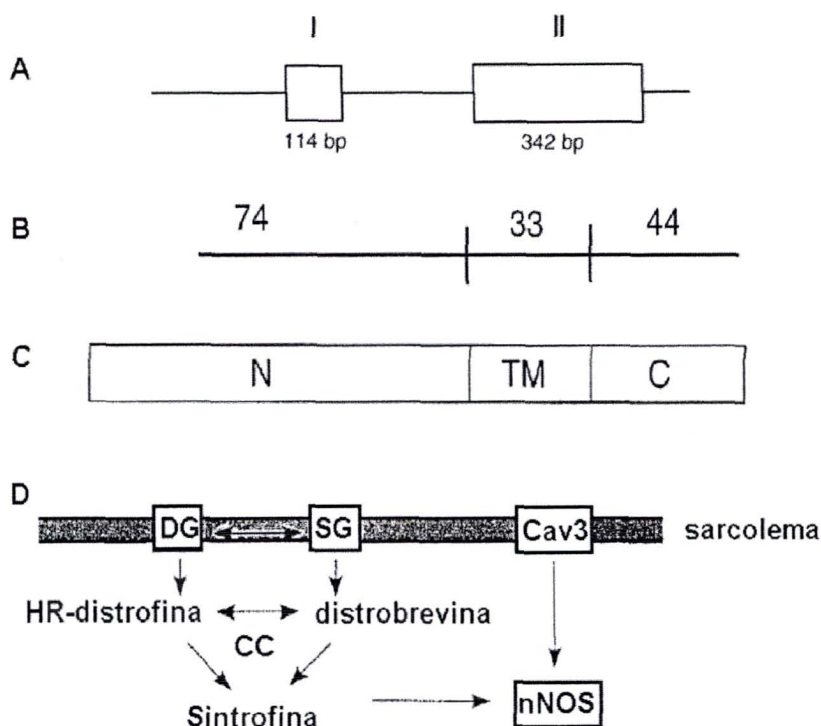


FIGURA 5 – A) Representação esquemática do gene da caveolina-3, formada por 2 éxons; B) Formação da caveolina-3 por 151 aminoácidos; C) Terminal amino (N), domínio transmembrana (TM) e terminal carboxila (C) da caveolina-3; D) Representação esquemática da ligação caveolina-3 com o complexo distrofina/proteínas associadas e da enzima óxido nítrico sintetase neural (nNOS) [modificado de ENGELMAN et al., 1998; OZAWA, NISHINO & NONAKA, 2001; TANG et al., 1996].

Os pacientes apresentam início dos sintomas, em média, aos 5 anos de idade, com queixas de câibras musculares, hipertrofia de panturrilhas e atrofia leve da musculatura proximal. A progressão da doença é variável entre as famílias. Os níveis de CK variam de 4 a 25 vezes acima do normal [BECKMANN et al., 1999; MCNALLY et al., 1998; MINETTI et al., 1998].

1.2.4 DMC1D

O gene da DMC1D foi localizado no braço longo do cromossomo 6, lócus q22, cujo produto gênico ainda é desconhecido [MESSINA et al., 1997].

Os pacientes apresentam, inicialmente, alterações no sistema de condução cardíaco, como bloqueio atrioventricular parcial e de ramos. Posteriormente, na segunda e terceira década de vida, ocorre o desenvolvimento de insuficiência cardíaca congestiva e do acometimento progressivo e lento da musculatura proximal. A musculatura facial fica preservada. A elevação dos níveis séricos de CK é discreta, entre duas a quatro vezes acima do normal. Na biópsia muscular, observaram-se alterações miopáticas, como variação do diâmetro de fibras, núcleos centrais e aumento do tecido adiposo e conjuntivo. O sexo masculino tende a apresentar quadros clínicos mais graves. Não foram descritos casos com perda de marcha [MESSINA et al., 1997].

1.2.5 DMC1E

A DMC1E foi localizada no braço longo do cromossomo 7, onde o produto gênico ainda permanece desconhecido. Descreveram-se duas famílias, com acometimento da musculatura proximal na idade de adultos jovens. A evolução dos sintomas foi lenta e houve o desenvolvimento de disfagia em 20% dos casos. O nível sérico da CK pode manter-se normal ou apresentar elevação discreta. A histopatologia da biópsia muscular se caracteriza pelo padrão miopático [SPEER et al., 1999].

1.3 FORMAS AUTOSSÔMICAS RECESSIVAS DA DISTROFIA MUSCULAR DE CINTURA

1.3.1 DMC2A, Calpainopatia

O gene da DMC2A foi localizado no braço longo do cromossomo 15, locus 15q15,1-15.2.1, e é responsável pela codificação da calpaína-3 (“calcium activated neutral protease 3” – CANP3). A calpaína-3 é uma enzima não lisossomal músculo específica, também conhecida como p94, que se caracteriza pela presença de quatro domínios (I-IV) e pela inserção dos segmentos NS, localizados no terminal amino (N), IS1 no domínio II e IS2 entre os domínios III e IV (Figura 6). A calpaína-3 se liga à titina nos sarcômeros, cuja função proteolítica requer pouco ou nenhum Ca^{++} para a sua ativação. As mutações no gene da calpaína-3 se caracterizam, na sua maioria, por substituições de um único par de bases, que podem ocorrer ao longo de toda a extensão do gene [BECKMANN et al., 1996; JIA et al., 2001; MUNAIN et al., 1999; ONO et al., 1998; RICHARD et al., 1999b, 2000; SPENCER et al., 1997; TIDBALL & SPENCER, 2000; UEYAMA et al., 1998].

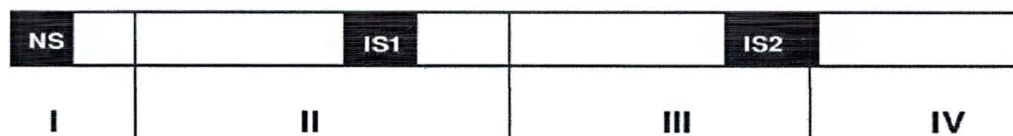


FIGURA 6 – Representação molecular esquemática da calpaína mostrando os domínios I – IV e as inserções NS, IS1 e IS2 [modificado de TIDBALL & SPENCER et al., 2000].

A idade do início dos sintomas pode variar de 2 a 45 anos, ocorrendo em média aos 14 anos, por queixas de dificuldade de marcha. O acometimento muscular é geralmente simétrico, principalmente dos músculos grande dorsal, serráteo maior, adutores da escápula, extensores do cotovelo, extensores do punho, retos abdominais, glúteos máximos, adutores da coxa, flexores do joelho e dorsoflexores do pé. A atrofia da musculatura posterior dos membros inferiores é mais acentuada. A hipertrofia de panturrilhas também pode ocorrer, sendo mais evidente nas fases iniciais da doença. A progressão dos sintomas costuma ser lenta, com perda de marcha dez a trinta anos após o início dos sintomas. A capacidade respiratória vital pode estar reduzida, mas sem alteração da função cardíaca. Em virtude da importante variação clínica inter e intrafamiliar, podem-se observar fenótipos mais severos, tipo Duchenne, principalmente nas mutações homozigóticas nulas e nas que afetam o segmento NS da calpaína-3 [CHAE et al., 2001; CHOU et al., 1999; EYMARD et al., 1996; FARDEAU et al., 1996a, 1996b; KAWAI et al., 1998; MINAMI et al., 1999; PASSOS-BUENO et al., 1996a, 1999; POLLITT et al., 2001; RICHARD et al., 1999b; URTASUN et al., 1998].

Os níveis séricos de CK nas fases iniciais da doença apresentam elevação importante e declinam gradativamente com a evolução da doença. A EMG se caracteriza pelo padrão miopático. Os achados da biópsia muscular mostram variação do diâmetro das fibras, necrose, regeneração, predomínio de fibras tipo I e acúmulo subsarcolemal de mitocôndrias [CHAE et al., 2001; CHOU et al., 1999; EYMARD et al., 1996; FANIN et al., 2001; FARDEAU et al., 1996a, 1996b; KAWAI et al., 1998; MINAMI et al., 1999; PASSOS-BUENO et al., 1996a, 1999; POLLITT et al., 2001; RICHARD et al., 1999b; URTASUN et al., 1998].

A imunoidentificação da distrofina e do complexo SG mantém-se normal, mas podem ocorrer falhas em áreas com alterações degenerativas da membrana citoplasmática. A deficiência de calpaína-3 geralmente é observada nas mutações

que ocorrem no gene da proteína, mas também pode ocorrer na DMC2B e 2J [BUSHBY & BECKMANN, 2003; KAWAI et al., 1998; SPENCER et al., 1997].

1.3.2 DMC2B, Disferlinopatia

O gene da DMC2B foi localizado no braço curto do cromossomo 2, locus 2p12-p13, e é responsável pela codificação da disferlina, proteína sarcolemal formada por 2080 aminoácidos, de peso molecular estimado em 230 kDa [AOKI et al., 2001; BASHIR et al., 1994, 1996; PASSOS-BUENO et al., 1995a]. A disferlina está localizada na face interna da membrana plasmática, apresenta um domínio transmembrana e seis domínios citoplasmáticos C2 Ca^{2+} dependentes, que se ligam a fosfolipídios e proteínas da membrana citoplasmática (Figura 7), que teriam a função de mediar a fusão de membranas e transdução de sinais das células musculares. A disferlina é expressa em níveis elevados na musculatura esquelética e cardíaca, nos rins e, em menor grau, no pulmão, fígado, útero, estômago e sistema nervoso central [ANDERSON et al., 1999; DAVIS et al., 2000].

DISFERLINA

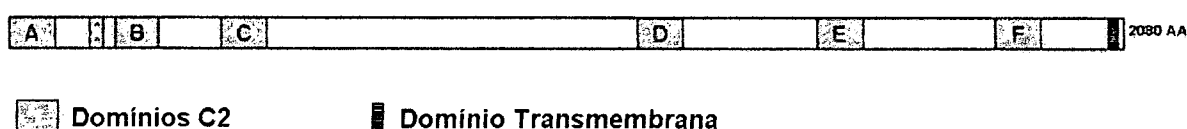


FIGURA 7 – Representação molecular esquemática da disferlina, mostrando os domínios C2 e transmembrana [modificado de DAVIS et al., 2000].

A mutação do gene da disferlina está associada a fenótipos do tipo: 1) cinturas, com comprometimento da musculatura proximal; 2) distal, com

acometimento da musculatura da panturrilha, como observado na miopatia Miyoshi; 3) distal, com início nos músculos tibial anterior, bíceps braquial e peitoral. As deleções, inserções e substituições de nucleotídeos podem ocorrer ao longo de toda extensão do gene da disferlina e ocasionam a formação de moléculas truncadas de disferlina [ANDERSON et al., 1999; AOKI et al., 2001; BASHIR et al., 1994, 1996; BEJAOUI et al., 1995; DAVIS et al., 2000; ILLARIOSHKIN et al., 2000; LIU et al., 1998; MATSUDA et al., 1999; PASSOS-BUENO et al., 1995a; WEILER et al., 1996].

A idade de início dos sintomas pode variar de 12 a 40 anos, sendo mais freqüente entre os 16 e 24 anos de idade. A apresentação dos sintomas geralmente ocorre por acometimento da musculatura dos membros inferiores. O acometimento dos membros superiores ocorre em média sete anos após o início dos sintomas nos músculos infra e supra-espinhoso, peitoral e bíceps braquial, com preservação da musculatura escapular e deltóide. A progressão dos sintomas é lenta, com perda da marcha após a quarta década de vida, na maioria dos casos. A musculatura facial fica preservada. [LIU et al., 1998; MAHJNEH et al., 1996, 2001; MATSUDA et al., 1999; PASSOS-BUENO et al., 1996a, 1999].

No início dos sintomas, os níveis séricos de CK apresentam elevação importante, podendo chegar até 100 vezes acima do normal, principalmente nos casos pré-sintomáticos. A EMG se caracteriza pelo padrão miopático. Na biópsia, além dos achados distróficos, tem-se observado infiltrado inflamatório de grau leve a moderado [ARGOV et al., 2000; LIU et al., 1998; MAHJNEH et al., 1996, 2001; MATSUDA et al., 1999; MCNALLY et al., 2000; PASSOS-BUENO et al., 1996a, 1999].

A redução da expressão da disferlina é específica e pode ser detectada através das técnicas de imuno-histoquímica e Western Blot. A expressão das proteínas do complexo distrofina/PAD mantém-se normal, mas pode existir redução

importante da calpaína-3 e aumento da expressão da laminina- α 2 [ANDERSON et al., 2000; ARGOV et al., 2000; FANIN et al., 2001; MATSUDA et al., 1999; PASSOS-BUENO et al., 1996a, 1999; VAINZOF et al., 1996].

1.3.3 DMC2C-2F, Sarcoglicanopatias

O complexo SG é formado pela associação de cinco proteínas, com massas moleculares de 50 kDa (α -SG), 43 kDa (β -SG), 35 kDa (γ -SG), 35 kDa (δ -SG) (Figura 8A) e 50 kDa (ϵ -SG). As proteínas se estabilizam, formando um complexo, que se liga com a proteína β -DG (Figura 8B) [OZAWA et al., 1998; OZAWA, NISHINO & NONAKA, 2001].

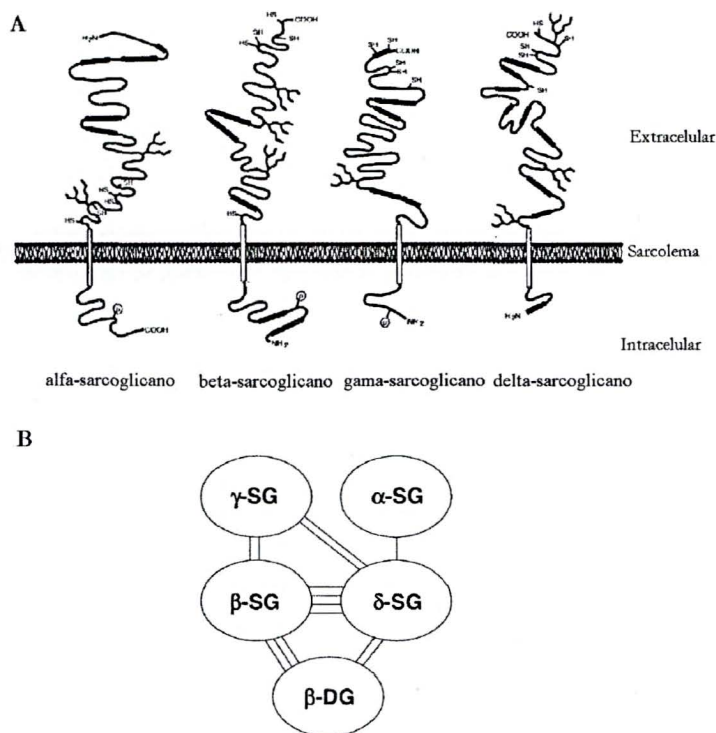


FIGURA 8 – A) Representação esquemática da estrutura molecular da α , β , γ e δ -SG; B) Representação esquemática das ligações das proteínas do complexo SG com a proteína β -DG [modificado de OZAWA et al., 1998; OZAWA, NISHINO & NONAKA, 2001].

A distrofina e as PAD formam um grande complexo oligomérico que confere estabilidade ao sarcolema das fibras musculares durante a fase de contração muscular por meio de suas ligações protéicas. A desestruturação molecular desse complexo ocasionaria desgaste e dilaceração do sarcolema, que, por sua vez, acabaria ocasionando o influxo excessivo de íons cálcio para o interior da fibra muscular, com conseqüente ativação de proteases e desencadeamento do processo de necrose da fibra muscular (Figura 9) [BRODENSTEINER et al., 1978; CAMPBELL, 1995a, 1995b; ERVASTI & CAMPBELL, 1991; MATSUMURA & CAMPBELL, 1993; MENDELL JR, SAHENK Z, PRIOR; MORKI & ENGEL, 1975; SUNADA & CAMPBELL, 1995; YOSHIDA & OZAWA, 1990].

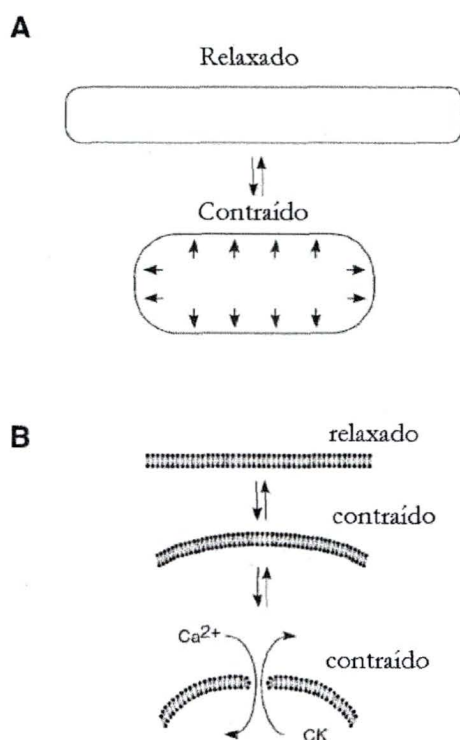


FIGURA 9 – Representação esquemática do aumento da tensão do sarcolema durante a contração muscular, induzindo a desorganização ultraestrutural do sarcolema e influxo de cálcio para o interior do citoplasma da fibra muscular, quando existe alteração do complexo distrofina e PAD [modificado de OZAWA, NISHINO & NONAKA, 2001].

As glicoproteínas do complexo SG também apresentam locais de ligação extracelular homólogos aos receptores de fator de crescimento epidermal e ao fator de crescimento nervoso, que devem interagir com componentes da matriz extracelular e com receptores das lipoproteínas de baixa densidade, cujas funções biológicas ainda não são totalmente conhecidas [ROBERDS et al., 1993, 1994].

1.3.3.1 DMC 2C, γ -sarcoglicanopatia

O gene da DMC2C foi localizado no braço longo do cromossomo 13, locus 13q12; formado por 8 éxons, apresenta aproximadamente 100 kb de extensão. O gene é responsável pela codificação da proteína sarcolemal γ -SG, de peso molecular estimado em 35 kDa, formada por um terminal carboxila extracelular e pelos domínios transmembrana e citoplasmático, sendo encontrada exclusivamente nas musculaturas cardíaca e esquelética (Figura 2A). As mutações do gene da γ -SG geralmente ocasionam quebra da matriz de leitura e codificação da proteína [CAMPBELL, 1995a; MCNALLY et al., 1996a; NOGUCHI et al., 1995; YAMAMOTO et al., 1994].

O início dos sintomas usualmente ocorre na primeira década de vida, podendo variar do primeiro aos 18 anos. O acometimento da musculatura proximal é simétrico, iniciando pela cintura pélvica, com progressão semelhante à distrofia muscular de Duchenne e Becker, em 50% dos casos. Também pode ocorrer no início da idade adulta jovem e apresentar progressão variada dos sintomas. A musculatura facial pode estar acometida nos estágios avançados da doença; a hipertrofia de panturrilhas é um achado comum. A macroglossia foi descrita principalmente em pacientes do Egito. As alterações cardíacas são pouco freqüentes

[BEN HAMIDA et al., 1996; DINÇER et al., 1997; DUGGAN et al., 1997; MCNALLY et al., 1996b; MERLINI et al., 2000; PASSOS-BUENO et al., 1996a, 1999; SALIH et al., 1996; VAINZOF et al., 1996].

Os níveis séricos de CK apresentam elevação importante, geralmente acima de 10 vezes do valor normal, sobretudo nas fases iniciais da doença, mas tendem a diminuir com a progressão da doença. A EMG apresenta padrão miopático. Os achados da biópsia muscular são semelhantes à DMD, podendo ser observado infiltrado inflamatório, compatível com o grau de necrose celular. A deficiência de γ -SG pode ocasionar redução variada das demais proteínas do complexo sarcoglicano; quando isolada, porém, apresenta correlação importante com mutações da própria proteína [BEN HAMIDA et al., 1996; BÖNNEMANN et al., 2002; DINÇER et al., 1997, DUGGAN et al., 1997; MCNALLY et al., 1996b; PASSOS-BUENO et al., 1996a, 1999; VAINZOF et al., 1996; VORGERD et al., 2001].

1.3.3.2 DMC2D, α -sarcoglicanopatia

O gene da DMC2D, responsável pela codificação da proteína α -SG, foi localizado no cromossomo 17, lócus 17q12-q21.33. Apresenta 9 éxons e aproximadamente 12 kb de extensão. As mutações ocorrem mais freqüentemente no éxon 3 e ocasionam término prematuro da matriz de leitura [CAMPBELL, 1995b; EYMARD et al., 1997; PASSOS-BUENO et al., 1996a, 1999; ROBERDS et al., 1994].

A maioria dos pacientes apresenta início dos sintomas na primeira década de vida, principalmente entre os 3 e 15 anos, por acometimento da musculatura da cintura pélvica. O início dos sintomas na idade adulta é menos freqüente, podendo haver casos assintomáticos aos 36 anos. O acometimento da musculatura dos MMSS é mais evidente nos músculos deltóide, bíceps e, em menor grau, tríceps. Nos membros inferiores, a musculatura da cintura é mais acometida, com

envolvimento uniforme dos músculos quadríceps e bíceps femoral e eventual da musculatura distal, sendo mais comum o do músculo tibial anterior. É comum observar-se a pseudo-hipertrofia de panturrilhas, mas pode acontecer em outros grupos musculares. A progressão dos sintomas é variada, geralmente com perda da marcha até os 15 anos. Nos estágios avançados da doença, pode ocorrer acometimento da musculatura facial. Alguns casos desenvolvem alterações cardíacas [ANGELINI et al., 1998; DINÇER et al., 1997; DUGGAN et al., 1997; EYMARD et al., 1997; KAWAI et al., 1995; PASSOS-BUENO et al., 1995b, 1996a, 1999; PICCOLO et al., 1995; ROBERDS et al., 1993, 1994; VAINZOF et al., 1996].

Quanto aos níveis séricos de CK, variam de 1 a 40 vezes acima do valor normal, também apresentando redução com progressão da doença. A EMG apresenta padrão miopático na maioria dos casos. A biópsia muscular se caracteriza pelos achados distróficos. A deficiência da α -SG ocasiona a redução da expressão das demais proteínas do complexo SG. A calpaína-3 e disferlina apresentam-se normais [ANGELINI et al., 1998; DINÇER et al., 1997; DUGGAN et al., 1997; EYMARD et al., 1997; KAWAI et al., 1995; PASSOS-BUENO et al., 1995b, 1996a, 1999; PICCOLO et al., 1995; ROBERDS et al., 1993, 1994; VAINZOF et al., 1996].

1.3.3.3 DMC2E, β -sarcoglicanopatia

O gene da DMC2E foi localizado no cromossomo 4, locus 4q12, que apresenta 6 éxons e aproximadamente 13,5 kb de extensão, sendo responsável pela codificação da proteína sarcolemal β -SG. As mutações do gene da β -SG estão associadas com mais frequência ao término prematuro da matriz de leitura e mudanças na cadeia de aminoácidos, principalmente do domínio extracelular [BECKMANN et al., 1996; BÖNNEMANN, 1995, 1996; LIM et al., 1995].

O início dos sintomas ocorre comumente na primeira década de vida, em média aos 7,6 anos de idade. A apresentação clínica é variada, mas é comum a forma DMC2E estar associada a fenótipos graves, tipo Duchenne, com a perda da marcha antes dos 14 anos. Há elevação dos níveis séricos de CK e observa-se padrão miopático na EMG e biópsia muscular. A deficiência da β -SG ocasiona a redução da expressão das demais proteínas do complexo SG. A calpaína-3 e disferlina apresentam-se normais [BÖNNEMANN et al., 1995; DINÇER et al., 1997; DUCLOS et al., 1998; DUGGAN et al., 1997; FANIN et al., 1997; LIM et al., 1995; PASSOS-BUENO et al., 1996a, 1999; VAINZOF et al., 1996].

1.3.3.4 DMC2F, δ -sarcoglicanopatia

O gene da DMC2F foi localizado no cromossomo 5, locus 5q33-43. Formado por 8 éxons, apresenta aproximadamente 100 kb de extensão e é responsável pela codificação da proteína δ -sarcoglicano. As mutações na DMC2F geralmente ocorrem por deleções ou substituições de nucleotídeos, que ocasionam a quebra da matriz de leitura. A δ -sarcoglicano é uma proteína de peso molecular estimado em 35 kDa, cuja estrutura molecular é semelhante à β -SG e γ -SG, com domínios extracelular, transmembrana e intracelular. Níveis elevados de δ -SG são observados na musculatura estriada; na musculatura lisa, a presença é menor; no cérebro e pulmão, há apenas traços [JUNG et al., 1996; NIGRO et al., 1996; PASSOS-BUENO et al., 1996b, 1999].

Os pacientes com DMC2F apresentam início dos sintomas na primeira década de vida, entre os 4 e 10 anos de idade, geralmente associados a fenótipos graves tipo Duchenne, com perda da marcha e óbito antes dos 20 anos. A eletromiografia e biópsia muscular exibem o padrão miopático. A deficiência da δ -SG ocasiona a redução da expressão das demais proteínas do complexo SG. A

calpaína-3 e disferlina mantêm-se normais [BUSHBY, 1999; JUNG et al., 1996; MOREIRA, et al., 1998; PASSOS-BUENO et al., 1996a, 1999; TSUBATA et al., 2000].

1.3.4 DMC2G, Teletoninopatia

O gene da DMC2G, localizado no braço longo do cromossomo 17, lócus 17q11-q12, é responsável pela codificação da teletonina, proteína sarcomérica de peso molecular de 19 kDa, encontrada exclusivamente na musculatura estriada e cardíaca. Substrato da titina, a teletonina está localizada na linha Z do sarcômero, onde apresenta locais de ligação que, quando ativados por meio da fosforilação cálcio/calmodulina, teriam a função de regular as ligações das proteínas do sarcômero (Figura 10). As mutações ocasionam a formação de moléculas truncadas da teletonina, com conseqüente desestruturação das proteínas do sarcômero [HARAVUORI et al., 2001; MOREIRA et al., 1997, 2000; VALLE et al., 1997].

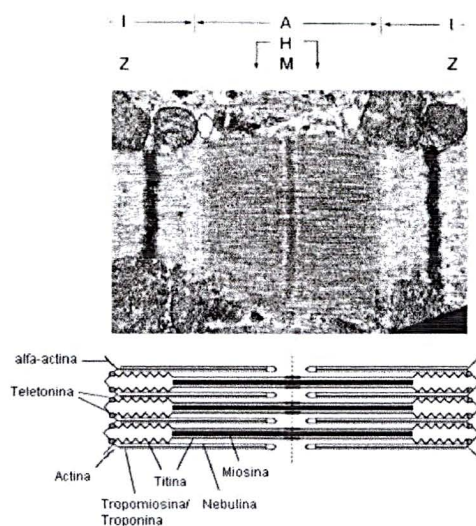


FIGURA 10 – Representação esquemática do sarcômero, localização da teletonina [modificado de HARAVUORI et al., 2001].

A apresentação dos sintomas na teletoninopatia pode variar dos 2 aos 15 anos de idade. Os pacientes apresentam fraqueza importante da musculatura distal e proximal dos membros inferiores, com acometimento precoce do músculo tibial anterior, sendo caracterizados pelo desenvolvimento de pé caído. O aumento pronunciado da panturrilha e acometimento da musculatura proximal dos membros inferiores também se observam em alguns casos. A elevação do nível sérico da CK é discreta nos casos com acometimento precoce do músculo tibial anterior, mas importante nos casos com aumento das panturrilhas. A progressão dos sintomas é lenta em ambos os tipos clínicos, com perda de marcha a partir da quarta década de vida. A biópsia muscular apresenta variação significativa do diâmetro das fibras, fibras em degeneração e regeneração, infiltração por tecido conjuntivo e aumento discreto de vacúolos marginados [MOREIRA et al., 1997, 2000; PASSOS-BUENO et al., 1999].

1.3.5 DMC2H

O gene da DMC2H foi localizado no cromossomo 9, locus 9q31-q34.1, e responde pela codificação da proteína “tripartite-motif gene 32” (TRIM32). A proteína TRIM32 auxilia na degradação de proteínas intracelulares pelos proteossomos, por meio da ligação da ubiquitina à proteína substrato. A idade de início dos sintomas pode variar de 1 a 27 anos, caracterizando-se por fraqueza lentamente progressiva e flutuante da musculatura pélvica e do músculo quadríceps. Na progressão da doença ocorre acometimento generalizado da musculatura, inclusive da musculatura facial, semelhante à distrofia facioescapuloumeral. O acometimento do músculo braquiorradial e da musculatura anterior da perna pode ocorrer em menor grau. O aumento dos níveis séricos de CK é quase sempre discreto, com aumento

importante nos casos assintomáticos. Preserva-se a função cardíaca. A eletromiografia é miopática na maioria dos casos, mas pode apresentar alterações neuromiopáticas. A biópsia muscular mostra variação no diâmetro das fibras, fibras em degeneração e aumento de núcleos centrais [SHOKEIR & KOBRINSKY, 1976; WEILER et al., 1998].

1.3.6 DMC2I

O gene da DMC2I foi localizado no braço longo do cromossomo 19, locus 19q13.3. É responsável pela codificação da proteína relacionada à fukutina (PRFK), expressa em níveis elevados na musculatura esquelética e cardíaca [ROCKINGTON et al., 2001a, 2002; DRISS et al., 2000; SUNADA et al., 2002].

A idade do início dos sintomas pode variar de 0,5 a 40 anos. O acometimento da musculatura é muito semelhante entre os casos, com atrofia e fraqueza muscular progressiva dos músculos da cintura pélvica e dos músculos proximais dos MMII, seguido do acometimento da cintura escapular e dos músculos proximais dos MMSS. Preserva-se a musculatura distal e facial. A hipertrofia de panturrilhas e a macroglossia é um achado comum. A progressão dos sintomas é variada, podendo ser semelhante à distrofia muscular de Duchenne ou Becker. As alterações cardíacas ocorrem em 30% dos casos, geralmente por insuficiência ventricular esquerda. A biópsia muscular mostra variação importante do diâmetro das fibras, fibras em necrose e regeneração, fibras hipercontráteis, predomínio de fibras tipo I, aumento de núcleos centrais e do tecido conjuntivo. A distrofina e as proteínas do complexo SG mantêm-se normais. Pode haver redução moderada de

laminina- α 2 e importante da α -dístroglicano [BROCKINGTON et al., 2001a, 2001b, 2002; DRISS et al., 2000; MERCURI et al., 2003, SUNADA et al., 2002] .

O gene da PRFK também é responsável pela distrofia muscular congênita (MDC1C), caracterizada por iniciar-se nas primeiras semanas de vida. Em casos assim, existe significativa atrofia e fraqueza da musculatura escapular, hipertrofia e fraqueza da musculatura dos membros inferiores, com incapacidade de marcha e importante envolvimento respiratório restritivo com desenvolvimento de insuficiência respiratória na segunda década de vida. Vários pacientes desenvolvem alterações cardíacas. A elevação dos níveis séricos de CK é importante. Pode ocorrer redução secundária de laminina- α 2 e α -dístroglicano, permanecendo normal a β -dístroglicano, α e γ -sarcoglicano [BROCKINGTON et al., 2001a, 2001b, 2002; MERCURI et al., 2003; SUNADA et al., 2002].

1.3.7 DMC2J

O gene da DMC2J foi localizado no braço longo do cromossomo 2, responsável pela codificação da proteína sarcomérica titina. A titina é uma grande proteína estrutural do sarcômero da musculatura estriada, que se estende desde o disco Z até a linha M (Figura 11) [HARAVUORI et al., 2001; LBEIT & KOLMER, 1995; MAYANS et al., 1998].

O início dos sintomas da doença geralmente ocorre na idade adulta, por comprometimento da musculatura anterior das pernas, sendo mais discretas as alterações da musculatura proximal. A progressão dos sintomas é lenta. Também se descreveram casos com fenótipos mais graves, tipo Duchenne. Na biópsia muscular, observam-se vacúolos marginados [HARAVUORI et al., 2001; MARKESBERY et al. 1974; UDD, KÄÄRIÄNEN & SOMER, 1991; UDD et al., 1993].

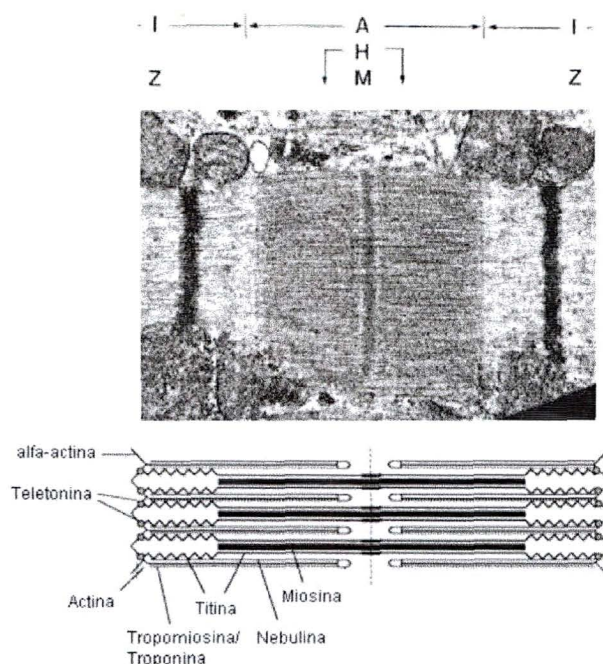


FIGURA 11 - Representação esquemática do sarcômero, identificação da titina, entre o disco Z e linha M [modificado de HARAVUORI et al., 2001].

1.4 DISTROFINOPATIAS

O fenótipo clínico nas distrofinopatias depende da manutenção da matriz de leitura para transcrição e síntese da proteína, em que deleções *out-of-frame* rompem a matriz de leitura. Geralmente estão associadas a fenótipos mais graves, do tipo DMD. As deleções *in-frame*, que mantêm a matriz de leitura, estão relacionadas a sintomas mais moderados e variáveis, como observado na distrofia muscular de Becker (DMB), em virtude da presença da molécula de distrofina truncada, mas parcialmente funcional [ARAHATA et al., 1988; BAUMBACH et al., 1989; CLEMENS et al., 1992; ENGLAND et al., 1989; GILLARD et al., 1989; HOFFMAN et al., 1991; HU et al., 1990; KOENIG et al., 1989; MEDORI, BROOKE & WATERSTON, 1989]. As mulheres portadoras de mutação no gene da distrofina são, na sua maioria, heterozigóticas assintomáticas e podem transmitir a doença para 50% dos filhos. Aproximadamente 30% dos casos são ocasionados por novas mutações,

por causa do grande tamanho do gene da distrofina [ARAHATA et al., 1989; GREENSTEIN, REARDON & CHAN, 1977].

O fenótipo tipo Duchenne se caracteriza pelo início dos sintomas entre os 3 e 6 anos, com progressão rápida dos sintomas e perda da marcha antes dos 14 anos de idade. A maioria dos pacientes geralmente vai a óbito antes dos 20 anos, em razão da fraqueza da musculatura respiratória. Aproximadamente um terço dos pacientes apresenta algum grau de deficiência mental [BROOKE et al., 1989; BULMAN et al., 1991; DUCHENNE, 1868; HOFFMAN et al., 1991; HU et al., 1990; KOENIG et al., 1989; ROSMAN 1970].

A distrofia muscular de Becker se evidencia principalmente pela perda da marcha a partir dos 16 anos, embora a idade do início dos sintomas possa variar entre a primeira e a quarta década da vida. O padrão do envolvimento muscular é semelhante ao da DMD, com desenvolvimento de marcha anserina, postura lordótica e pseudo-hipertrofia de panturrilhas. [BROOKE et al., 1989; BULMAN et al., 1991; EMERY, 1993; HU et al., 1990; KOENIG et al., 1989].

A distrofina em pacientes com fenótipos tipo Duchenne comumente apresenta deficiência importante na maioria das fibras musculares, podendo haver raras fibras isoladas com distrofina normal. Na DMB, predominam fibras com falhas focais e ocasionais sem distrofina. Mulheres portadoras têm demonstrado padrão tipo mosaico, em que fibras normais e com deficiência formam uma espécie de tabuleiro de xadrez. As proteínas do complexo SG, bem como as demais PAD, apresentam deficiência secundária [ARAHATA et al., 1988, 1989; BONILLA et al., 1988a, 1988b; BULMAN et al., 1991; HOFFMAN et al., 1988, 1992; NICHOLSON et al., 1990, 1993; SCOLA, 1999; VAINZOF et al., 1991a, 1991b, 1991c].

1.5 DEFICIÊNCIA DE LAMININA- α 2/MEROSINA

A laminina- α 2/merosina é um componente da matriz extracelular codificado no braço longo do cromossomo 6, locus 6q22-23. A deficiência da laminina- α 2/merosina tem sido observada em 50% dos casos de distrofia muscular congênita, forma autossômica recessiva de miopatia caracterizada por importante hipotonia neonatal associada a contraturas e rigidez articulares, elevação dos níveis séricos de CK e alterações da mielinização da substância branca na ressonância nuclear magnética [ARAHATA, ISHII & HAYASHI, 1995; BUSHBY et al., 1998; DUBOWITZ, 1994; SEWRY et al., 1995; WERNECK et al., 1997; WERNECK & BONILLA, 1995; WEWER & ENGVALL, 1996]. Nas mutações com preservação parcial da leitura do gene da laminina- α 2, observam-se fenótipos semelhantes às distrofinopatias e sarcoglicanopatias, com acometimento da musculatura proximal dos MMII. Podem chegar a desenvolver algum grau de hipertrofia de panturrilhas, a elevação dos níveis séricos de CK varia entre 6 e 10 vezes acima do normal, persistem as alterações na ressonância nuclear magnética; a distrofina, o complexo sarcoglicano e a β -distroglicano permanecem normais [ARIKAWA et al., 1991; BUSHBY et al., 1998; HOFFMAN et al., 1996; NAOM, D'ALESSANDRO & SEWRY, 1998; PINI, 1996; SEWRY et al., 1995, TAN et al., 1997] .

1.6 DIAGNÓSTICO DA DISTROFIA MUSCULAR DE CINTURAS

As identificações das etiologias moleculares das distrofias musculares vêm proporcionando crescentes avanços no diagnóstico da DMC, por meio da clonagem, codificação e identificação dos diferentes produtos gênicos [BECKMANN & BUSHBY, 1996; BUSHBY, 1999; BUSHBY & BECKMANN, 2003] (Tabela 1).

TABELA 1 – COMPONENTES GÊNICOS DAS DISTROFIAS MUSCULARES DE CINTURAS

DMC	Lócus	Produto Gênico
Dominantes		
DMC1A	5q	Miotilina
DMC1B	1q	Lamina A/C
DMC1C	3p	Caveolina-3
DMC1D	6q	Desconhecido
DMC1E	7q	Desconhecido
Recessivas		
DMC2A	15q15.1-q21	Calpaína-3
DMC2B	2p13	Disferlina
DMC2C	13q12	γ -sarcoglicano
DMC2D	17q12-q21.33	α -sarcoglicano
DMC2E	4q12	β -sarcoglicano
DMC2F	5q33-q34	δ -sarcoglicano
DMC2G	17q11-q12	Teletonina
DMC2H	9q31-q34.1	TRIM32
DMC2I	19q13.3	FKRP
DMC2J	2q	Titina

DMC = distrofia muscular de cinturas; TRIM32= tripartite-motif protein gene 32, FKRP = proteína relacionada à fukutina.

Neste contexto, a DMC passou a ser constituída por um grupo heterogêneo de doenças musculares hereditárias de padrão autossômico dominante e recessivo. A imunoidentificação de suas proteínas vem proporcionando maior rapidez no diagnóstico diferencial das DMC.

A técnica de imunoidentificação foi desenvolvida para localizar ou visualizar substâncias antigênicas nos tecidos ou líquidos orgânicos, utilizando-se anticorpos específicos. A detecção pode ser feita por meio de métodos diretos, em que a ligação antígeno/anticorpo ocasiona ativação de uma enzima acoplada ao anticorpo, ou por meio de técnicas indiretas, com a utilização de anticorpos em seqüência, conjugada a um marcador e posterior visualização [GUEDSON, TERNYCK & AVRAMEAS, 1979]. O

anticorpo primário a ser utilizado é específico, sendo geralmente formado a partir de clones de células plasmáticas de padrão monoclonal [ARAHATA et al., 1988; BONILLA et al., 1988a, 1988b].

Utilizando-se essa técnica, é possível estudar a expressão das diferentes proteínas das fibras musculares esqueléticas humanas envolvidas nas distrofias musculares, em especial na DMC [DUGGAN et al., 1997; HOFFMAN et al., 1988; KAWAY et al., 1995; SEWRY et al., 1996; SCOLA, 1999; SPENCER et al., 1997; SEWRY et al., 1996; WERNECK & BONILLA, 1995; ZATZ et al., 1994].

A análise correta da imunoidentificação das proteínas depende de um número adequado de fibras musculares, da integridade do sarcolema e do número de anticorpos empregados [BULMAN, 1991; HOFFMAN et al., 1991; NICHOLSON et al., 1993].

As interpretações das mudanças nas secções de imuno-histoquímica podem ser feitas com referência a secções controle de músculos normais, onde as diferentes variações da fluorescência podem ser classificadas em diferentes categorias [DUGGAN et al., 1997; HAYASHI et al., 1995; HOFFMAN, BROWN & KUNK, 1987; HOFFMAN et al., 1988; KAWAI et al., 1995; LJUNGGREN, 1995; NICHOLSON et al., 1993; SCOLA, 1999; VAINZOF et al., 1991a, 1991b, 1991c, WERNECK & BONILLA, 1995].

A análise dos achados clínicos, laboratoriais, eletromiográficos e histoquímicos e de suas proteínas vem-se tornando de grande importância na orientação do estudo genético específico. O acesso a tais dados significativos motivou a realização deste trabalho, com o objetivo de se aprimorar o diagnóstico em um grupo heterogêneo de pacientes portadores de distrofia muscular de cinturas.

2 OBJETIVOS

- a) Correlacionar os dados clínicos, laboratoriais, eletromiográficos e histopatológicos com a imunoidentificação dos casos de distrofia muscular de cinturas;
- b) Verificar os tipos mais frequentes de distrofias musculares de cinturas que ocorrem, classificando-os através dos métodos disponíveis;
- c) Verificar a utilidade da imunoidentificação no diagnóstico das distrofias musculares de cinturas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Entre o período de janeiro de 1976 e maio de 2001, enviaram-se 3 350 biópsias musculares ao laboratório do Serviço de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, para investigação diagnóstica.

Depois da análise do banco de dados, identificaram-se 183 casos com diagnóstico sugestivo de DMC. Excluíram-se 85 casos por falta do material da biópsia; 22 por apresentarem história clínica incompleta e 20 com deficiência na imunoidentificação da distrofina.

Fazem parte do estudo 56 casos, que foram submetidos a avaliação dos dados clínicos — com ênfase na história clínica, familiar e estado funcional motor —, laboratoriais — dosagem dos níveis séricos das enzimas musculares —, eletromiográficos — eletromiografia de agulha —, histopatológicos, e realização da imunoidentificação das proteínas: distrofina, α , β , γ e δ -sarcoglicanos, β -dístroglicano, disferlina e calpaína-3.

3.1 SEXO

Trinta e dois casos (57,10%) eram do sexo masculino e 24 (42,90%), femininos (Tabela 2) (Anexo 1).

TABELA 2 – DISTRIBUIÇÃO POR SEXO

Sexo	Número de pacientes	(%)
Feminino	24	42,90
Masculino	32	57,10
Total	56	100,00

3.2 HISTÓRIA FAMILIAR

A maioria dos casos eram esporádicos (Tabela 3). Nos casos com história familiar, observou-se o acometimento de familiares em 17 e houve história de consangüinidade entre os pais em 7 (Anexo 2).

TABELA 3 – HISTÓRIA FAMILIAR

História familiar	Número de pacientes	(%)
Presente	21	37,50
Ausente	35	62,50
Total	56	100,00

3.3 IDADE DE INÍCIO DOS SINTOMAS, TEMPO DE DOENÇA E IDADE NA AVALIAÇÃO

A idade do início dos sintomas variou de 0,7 a 57 anos; o tempo de doença, de 0,4 a 28 anos e a idade na avaliação, de 2 a 61 anos (Tabela 4) (Anexo 1).

TABELA 4 – DISTRIBUIÇÃO DA IDADE DE INÍCIO DOS SINTOMAS⁽¹⁾, TEMPO DE DOENÇA⁽¹⁾ E IDADE NA AVALIAÇÃO⁽¹⁾

Intervalos	Número de pacientes	(%)
Idade do início dos sintomas		
< 1 ano	1	1,80
1 – 10 anos	18	32,10
11 – 20 anos	17	20,40
21 – 30 anos	11	19,60
> 31 anos	9	16,00
Total	56	100,00
Tempo de doença		
< 1 ano	3	5,40
1 – 5 anos	28	50,00
6 – 10 anos	12	21,40
11 – 20 anos	8	14,30
> 20 anos	5	8,90
Total	56	100,00
Idade na avaliação		
1 – 10 anos	5	8,90
11 – 20 anos	14	25,00
21 – 30 anos	22	39,30
> 30 anos	15	26,80
Total	56	100,00

(1) Idade, tempo de doença e idade na avaliação em anos.

3.4 MANIFESTAÇÃO CLÍNICA INICIAL

A manifestação clínica inicial mais freqüente foi o comprometimento da musculatura proximal dos membros inferiores (MMII), seguida da musculatura proximal dos membros superiores (MMSS) (Tabela 5) (Anexo 1).

TABELA 5 – MANIFESTAÇÃO CLÍNICA INICIAL

Fraqueza muscular	Número de pacientes	(%)
MMII	37	66,10
MMSS	12	21,40
MMSS e MMII	7	12,50
Total	56	100,00

MMSS = membros superiores; MMII = membros inferiores

3.5 TROFISMO MUSCULAR

A atrofia da musculatura proximal dos membros superiores (MMSS) e membros inferiores (MMII) foram mais freqüentes. Houve a presença de hipertrofia de panturrilhas em 7 casos (Tabela 6) (Anexo 3).

TABELA 6 – TROFISMO MUSCULAR

Trofismo muscular	Número de pacientes	(%)
Atrofia muscular		
MMSS		
Proximal	37	66,10
Distal	11	19,60
MMII		
Proximal	30	53,60
Distal	9	16,10
Hipertrofia muscular		
Panturrilhas	7	12,50

MMSS = membros superiores; MMII = membros inferiores

3.6 GRADUAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR

A avaliação da força muscular foi graduada para grupamentos musculares proximais e distais dos membros superiores e inferiores de acordo com a escala de graduação muscular do Medical Research Council (MRC) modificada [MENDELL, 1990; MOXLEY, 1990] (Tabela 7).

TABELA 7 – ESCALA MRC MODIFICADA PARA GRADUAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR

Escala MRC	Força muscular avaliada	Gradação da força muscular
0	Ausência de resposta motora	0
1	Contração visível	1
2	Movimento sem ação da gravidade	2
3	Movimento contra a gravidade	3
4 -	Movimento contra pouca resistência	4
4	Movimento contra resistência leve	5
4 +	Movimento contra resistência moderada	6
5	Normal	7

A graduação média da força muscular para a musculatura proximal dos MMSS foi de $4,86 \pm 1,30$; musculatura proximal dos MMII, de $4,59 \pm 1,19$; musculatura distal dos MMSS, de $6,27 \pm 1,17$ e distal dos MMII, de $6,23 \pm 1,11$ (Tabela 8) (Anexo 3).

TABELA 8 – GRADUAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR

Grupo muscular	Casos avaliados	Média	Desvio-padrão
MMSS	Proximal	4,86	1,30
	Distal	6,27	1,17
MMII	Proximal	4,59	1,19
	Distal	6,23	1,11

MMSS = membros superiores; MMII = membros inferiores

3.7 MANOBRA DE GOWERS

Observou-se a manobra de Gowers em 75,00% dos casos (Tabela 9) (Anexo 3).

TABELA 9 – MANOBRA DE GOWERS

Manobra de Gowers	Número de pacientes	(%)
Ausente	8	14,30
Presente	42	75,00
Incapaz de realizar	6	10,70
Total	56	100,00

3.8 AVALIAÇÃO DA MARCHA

A maioria dos casos apresentou marcha miopática na ocasião da avaliação (Tabela 10) (Anexo 3).

TABELA 10 – TIPO DE MARCHA

Tipo de marcha	Número de pacientes	(%)
Normal	13	23,20
Miopática	38	67,90
Ausente	5	8,90
Total	56	100,00

3.9 ESTADO FUNCIONAL MOTOR

O estado funcional motor de cada paciente foi classificado segundo a escala funcional de Vignos e Archibald modificada (Tabela 11) [VIGNOS, SPENCER & ARCHIBALD, 1963; WERNECK, 1991].

TABELA 11 – ESCALA FUNCIONAL DE VIGNOS/ARCHIBALD MODIFICADA

Escala	Avaliação do estado funcional motor
0	Pré-Clinico. Todas as atividades são normais.
1	Caminha normalmente. Não consegue correr normalmente.
2	Defeito de postura ou marcha. Sobe escadas sem usar corrimão.
3	Sobe escadas apenas com corrimão.
4	Deambula sem ajuda. Não sobe escadas.
5	Deambula sem ajuda. Não se levanta de cadeiras.
6	Caminha somente com muletas ou outros tipos de ajuda.
7	Incapaz de deambular, senta-se ereto em cadeiras, capaz de movimentar cadeira de rodas, alimenta-se sem auxílio.
8	Senta-se sem apoio, não movimenta cadeira de rodas e alimenta-se com auxílio.
9	Não se senta ereto sem suporte e é incapaz de beber ou comer sem auxílio.
10	Confinado ao leito, necessita de auxílio para todas as atividades.

A maioria dos casos apresentou dificuldade para correr, caminhar e subir degraus (Tabela 12) (Anexo 2).

TABELA 12 – ESTADO FUNCIONAL MOTOR

Escala de Vignos modificada	Número de pacientes	%
0	1	1,80
1	8	14,30
2	15	26,80
3	25	44,60
4	2	3,60
7	4	7,10
9	1	1,80
Total	56	100,00

3.10 ENZIMAS MUSCULARES

Registraram-se os valores plasmáticos da CK, desidrogenase láctica (LDH), alanino aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e aldolase. Os resultados obtidos em cada paciente foram divididos pelo valor superior da normalidade e subtraído do valor normal. O resultado dessa operação indica o

número de vezes em que a enzima está elevada acima do valor normal¹ [WERNECK, 1991]. A dosagem dos níveis séricos das enzimas musculares foi realizada em 49 casos para CK; 40 para AST; 25 para ALT, 40 para LDH e 19 para aldolase (Tabela 13). Observou-se um aumento médio de 14,85 para CK; 5,56 para AST; 0,79 para ALT; 1,0 para LDH e 2,89 para aldolase (Tabela 13) (Anexo 4).

TABELA 13 – DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS DAS ENZIMAS MUSCULARES ⁽¹⁾

Enzima	Casos estudados	Média ⁽¹⁾	Desvio-padrão ⁽¹⁾
CK	49	14,96	17,33
AST	40	5,00	13,62
ALT	25	0,79	1,53
LDH	40	1,09	1,89
Aldolase	19	2,70	4,15

(1) Número de vezes aumentado acima do normal.

CK = creatinaquinase; AST = aspartato transferase; ALT = alanino transferase; LDH = desidrogenase láctica

3.11 ELETROMIOGRAFIA

Realizou-se o exame com o paciente em decúbito dorsal e com o controle da temperatura das extremidades. A técnica eletromiográfica utilizada foi a de uso corrente, descrita na literatura [DUMITRO, 1995; KAMEN & CALDWELL, 1996; STALBERG et al., 1996]. Foram registrados os padrões eletromiográficos miopático, misto e normal (Tabela 14) (Anexo 5).

¹ Resultado obtido dividido pelo valor normal menos um = número de vezes aumentado acima do valor normal.

TABELA 14 – ELETROMIOGRAFIA

Padrão eletromiográfico	Frequência	(%)
Normal	3	5,40
Miopático	41	73,20
Neuromiopático	6	10,70
Não realizado	6	10,70
Total	56	100,00

3.12 BIÓPSIA MUSCULAR – HISTOPATOLOGIA

Os músculos estudados na biópsia muscular variaram de acordo com o grau de envolvimento muscular, sendo rotineiramente realizada em um músculo com força muscular grau 4 (MRC) ou no músculo menos afetado naqueles doentes com estágio avançado da doença e que não tenham sido submetidos à eletromiografia.

Realizaram-se as colorações para hematoxilina-eosina (HE), tricromo de Gomori modificado (TG), ATPases pH 9.4, 4.6 e 4.3, NADH-TR, esterase inespecífica, miofosforilase, fosfatase ácida, fosfatase alcalina, óleo vermelho zero (OIL-RED-0), PAS, cresil violeta, desidrogenase succínica (SDH), sirius red e adenilato deaminase, conforme técnicas descritas na literatura e em uso no laboratório de histopatologia do Serviço de Doenças Neuromusculares [DUBOWITZ, 1985; WERNECK, 1991]. Os dados de cada elemento da biópsia muscular foram registrados separadamente, conforme a sua ocorrência, sendo classificados de acordo com a literatura [DUBOWITZ, 1985; WERNECK, 1991] (Anexo 6).

Notou-se variação do tamanho das fibras em 98,20% das biópsias musculares, com atrofia e hipertrofia de ambos os tipos de fibras (Tabela 15). Fibras anguladas escuras atróficas foram observadas em 30,40% dos casos na reação para NADH-TR e em 48,20% na reação para esterase inespecífica (Tabela 15). O padrão de distribuição do tipo de fibra muscular foi normal na maioria das biópsias,

havendo predomínio de fibras tipo 1 em 16,10% e tipo 2, em 7,10%, atrofia de pequenos grupos em 14,30% e formação de agrupamentos de fibras tipo 1 e 2 em 1,80% (Tabela 15). Constatou-se a presença de núcleos centrais e a formação de grumos nucleares em 64,30% e em 21,40%, respectivamente, das biópsias musculares (Tabela 15). Observaram-se fibras musculares em necrose em 51,80%, de fibras basofílicas em 30,40%, fibras em segmentação em 37,50% e de fibras positivas na reação para fosfatase alcalina em 39,30% (Tabela 15).

Houve a formação de infiltrado inflamatório perivascular em 32,10% na coloração para HE e de 32,10% na reação para fosfatase ácida (Tabela 15). O aumento do tecido conjuntivo endomisial esteve presente em 50,00% na coloração para HE e de 23,20% na coloração sirius red (Tabela 15). A infiltração por tecido adiposo ocorreu em 44,60% (Tabela 15).

As alterações estruturais observadas foram: fibras enrodilhadas em 5,10%, fibras em anéis em 21,80%, depósito de nitroblue tetrazolium (NBT) reduzido em 21,30%, saca-bocados em 33,90%, turbilhões em 37,50% (Tabela 15). Houve também a presença de acúmulo subsarcolemal de mitocôndrias na reação para SDH em 23,20%, depósito de lipídios na coloração OIL-RED-0 em 8,90%, formação de vacúolos em 9,80% e de vacúolos marginados em 3,60% dos casos (Tabela 15). As reações para fosforilase, adenilato deaminase, citocromo C oxidase, cresil violeta e PAS foram normais em todos os casos (Tabela 15) (Anexo 6).

TABELA 15 – BIÓPSIA MUSCULAR – HISTOPATOLOGIA

Histopatologia	Número de caso	(%)
<u>Hematoxilina Eosina/Tricromo de Gomori</u>		
Atrofia de pequenos grupos	8	14,30
Fagocitose	27	48,20
Fibras anguladas atróficas	12	21,40
Fibras basofílicas	17	30,40
Fibras em segmentação	20	37,50
Fibras enrodilhadas	3	5,10
Grumos nucleares	12	21,40
Infiltração por tecido adiposo	25	44,60
Infiltrado inflamatório perivascular	18	32,10
Necrose	29	51,80
Núcleos centrais	36	64,30
Proliferação do tecido conjuntivo endomisial	28	50,00
Vacúolos marginados	2	3,60
Vacúolos	5	9,80
Variação diâmetro de fibras	55	98,20
<u>ATPases</u>		
Atrofia de fibras tipo 1	45	80,40
Atrofia de fibras tipo 2	38	67,90
Hipertrofia de fibras tipo 1	35	62,50
Hipertrofia de fibras tipo 2	39	69,60
Predomínio de fibras tipo 1	9	16,10
Predomínio de fibras tipo 2	4	7,10
Agrupamento de fibras tipo 1 e 2	1	1,80
<u>NADH-TR</u>		
Anéis	7	21,80
Aumento focal do NBT reduzido	12	21,30
Fibras angulares escuras atróficas	17	30,40
Saca-bocados	19	33,90
Turbilhões	20	37,50
<u>Esterase Inespecífica</u>		
Aumento em placa motora	7	12,50
Aumento atividade mononuclear	6	10,70
Angulares atróficas	27	48,20
<u>Fosfatase ácida</u>		
Aumento focal	15	26,80
Células inflamatórias e mononucleares	18	32,10
Conteúdo do vacúolo positivo	3	5,40
Fibras positivas	21	37,50
Mononucleares perivasculares	2	3,60
Paredes vasculares positivas	3	5,40
<u>Fosfatase Alcalina</u>		
Fibras positivas	22	39,30
<u>Desidrogenase succínica</u>		
Acúmulo subsarcolemal de mitocôndrias	13	23,20
<u>OIL-RED-0</u>		
Aumento de gotículas de gorduras	5	8,90
<u>Sirus Red</u>		
Aumento tecido conjuntivo	13	23,20
<u>Citocromo C Oxidase</u>		
Aumento do número de mitocôndrias	1	1,80

NADH-TR = nicotinamida adenina dinucleotídeo-tetrazolium redutase, ATPase = adenina trifosfatase, NBT = nitroblue tetrazolium, PAS = ácido periódico Schiff, OIL-RED-0 = óleo vermelho zero

O padrão da biópsia muscular observado foi normal, miopático, desinervação, neuromiopático, inespecífico e limítrofe para miopatia inflamatória (Tabela 16).

TABELA 16 – BIÓPSIA MUSCULAR

Padrão da biópsia muscular	Frequência	(%)
Normal	1	1,80
Miopática	37	67,90
Desinervação	6	10,70
Neuromiopática/Misto	7	12,50
Inespecífica	4	7,10
Limitrofe miopatia inflamatória	1	1,80
Total	56	100,00

3.13 BIÓPSIA MUSCULAR – IMUNOIDENTIFICAÇÃO

A detecção da distrofina, α -sarcoglicano, β -sarcoglicano, γ -sarcoglicano, δ -sarcoglicano, β -dístroglicano e disferlina foi feita por método imuno-histoquímico, em cortes histológicos de biópsias musculares armazenadas em nitrogênio líquido, com espessura de 4 μ , colhidas em lamínulas, preparadas previamente com poly-D-lysina (Sigma).

A detecção da calpaína-3 foi feita por método de Western Blot, em fragmentos de biópsias musculares armazenadas em nitrogênio líquido.

3.13.1 Anticorpos Utilizados na Imunoidentificação

- Anticorpo que reconhece a porção terminal carboxila da distrofina humana (Chemicon International MAB1694, Temecula - US). IgG1, cujo antígeno foi obtido por meio de polipeptídios sintéticos, contendo os últimos 17 aminoácidos do terminal carboxila da seqüência da distrofina humana. Reação similar pode ser obtida em musculatura esquelética, cardíaca e lisa de camundongo, rato, coelho e cachorro.

- Anticorpo que reconhece a porção terminal amino da distrofina humana (Chemicon International MAB1690, Temecula - US). IgG2a, antígeno obtido de proteínas de fusão, contendo a seqüência dos aminoácidos 67 a 713.
- Anticorpo que reconhece o domínio ROD da distrofina humana (Chemicon International MAB1692, Temecula - US). IgG2A, obtido de proteínas de fusão, tem especificidade pelo domínio médio "rod", entre os aminoácidos 1181 e 1388. Reage com a distrofina do músculo esquelético, cardíaco e liso de camundongos, coelhos e cães normais.
- Anticorpo que reconhece a proteína α -sarcoglicano humana (Novocastra NCL-50DAG, Newcastle upon Tyne - UK). IgG1, formado a partir de proteínas de fusão, contendo a seqüência de aminoácidos 217-289 da α -sarcoglican de coelho. Reação similar pode ser obtida em músculo de camundongo, rato, coelho e hamster.
- Anticorpo que reconhece a proteína β -sarcoglicano humana (Novocastra NCL-b-SARC, Newcastle upon Tyne - UK). IgG1, constituído a partir de proteínas de fusão, RBSG-NT, da β -SG humana. Reação similar pode ser obtida em músculo de camundongo, rato, coelho, cachorro, hamster e porco.
- Anticorpo que reconhece a proteína γ -sarcoglicano humana (Novocastra NCL-g-SARC, Newcastle upon Tyne - UK). IgG2b, constituído a partir de peptídeos sintéticos, contendo a seqüência dos aminoácidos 167-178 de γ -sarcoglicano de coelhos. Reação similar pode ser obtida em músculo de cachorro e galinha.
- Anticorpo que reconhece a proteína δ -sarcoglicano humana (Novocastra NCL-d-SARC, Newcastle upon Tyne - UK). IgG2A, formado a partir de peptídeos sintéticos, contendo a seqüência dos aminoácidos 1 a 19 do

terminal amino da δ -sarcoglicano humana. Não reage em músculo de camundongo, rato, coelho, cachorro, galinha, hamster e porco.

- Anticorpo que reconhece a proteína β -dístroglicano humana (Novocastra/NCL-b-DG, Newcastle upon Tyne - UK). IgG2a, constituído por peptídeos sintéticos, contendo a seqüência dos aminoácidos de β -dístroglicano de coelho. Reagem com β -dístroglicano musculatura esquelética humana. Reação similar pode ser obtida em músculo de cachorro, porco e coelho.
- Anticorpo que reconhece a proteína disferlina humana (Novocastra/NCL-Hamlet, Newcastle upon Tyne - UK). IgG1, constituído a partir de peptídeos sintéticos, contendo a seqüência de aminoácidos 1999-2016 da disferlina humana. Reação similar pode ser obtida em músculo de rato, camundogo, coelho, hamster, cachorro e porco.
- Anticorpo que reconhece a proteína calpaína-3 muscular humana (94kD) e de seu produto degradado de peso molecular de 60 kD (Novocastra/NCL-12A2, Newcastle upon Tyne - UK). IgG2a, constituído a partir de peptídeos sintéticos, contendo a seqüência dos aminoácidos 355-370 da calpaína humana. Reação similar pode ser obtida em músculo de cachorro, porco e coelho.

3.13.2 Técnica para Imunoidentificação da Dístrofina, α -SG, β -SG, γ -SG, δ -SG, β -DG e Disferlina

Inicialmente os cortes histológicos foram lavadas com solução-tampão fosfato salino (Anexo 7) por cinco minutos; a seguir, incubados com anticorpo

primário diluído em solução de albumina bovina a 1% (Anexo 7), nas seguintes concentrações: antidistrofina terminal carboxila 1:2, antidistrofina terminal amino 1:4, antidistrofina domínio "ROD" 1:1, anti- α -sarcoglicano 1:20, anti- β -sarcoglicano 1:100, anti- γ -sarcoglicano 1:10, anti- δ -sarcoglicano 1:25 e antidisferlina 1:10. Os anticorpos para distrofina e disferlina permaneceram durante doze horas à temperatura de 8° C. Os anticorpos para α , β , γ e δ -sarcoglicanos e β -dístroglicano permaneceram durante três horas, à temperatura de 8° C.

Depois do período de incubação do anticorpo primário, os cortes eram lavados em solução-tampão fosfato salino por três vezes, durante cinco minutos cada; a seguir, incubados com anticorpo biotilado de ovelha antiimunoglobulina de camundongo (Amershem RPN 1025, Little Chalfont - UK), diluído em solução de albumina bovina 1:500, com tempo de permanência de uma hora na temperatura ambiente.

Em seguida, os cortes eram lavados em solução-tampão fosfato salino por três vezes, durante cinco minutos cada, e depois incubados com estreptavidina conjugada com fluoresceína de ovelha (Amershem RPN 1232, Little Chalfont - UK), diluída em solução de albumina bovina na concentração de 1:1000, com tempo de permanência de uma hora em temperatura ambiente. Posteriormente os cortes foram lavados em tampão fosfato salino três vezes por cinco minutos. Os corte foram montadas em lâmina de vidro com meio de solução para fluorescência (Vectorlabs VECTASHIELD, Burlingame - US). Por último as imagens foram capturadas no microscópio de imunofluorescência (Figura 12). Sempre se processaram juntos cortes histológicos de controle incubados com soro não imune em tampão fosfato salino e albumina bovina a 1%.

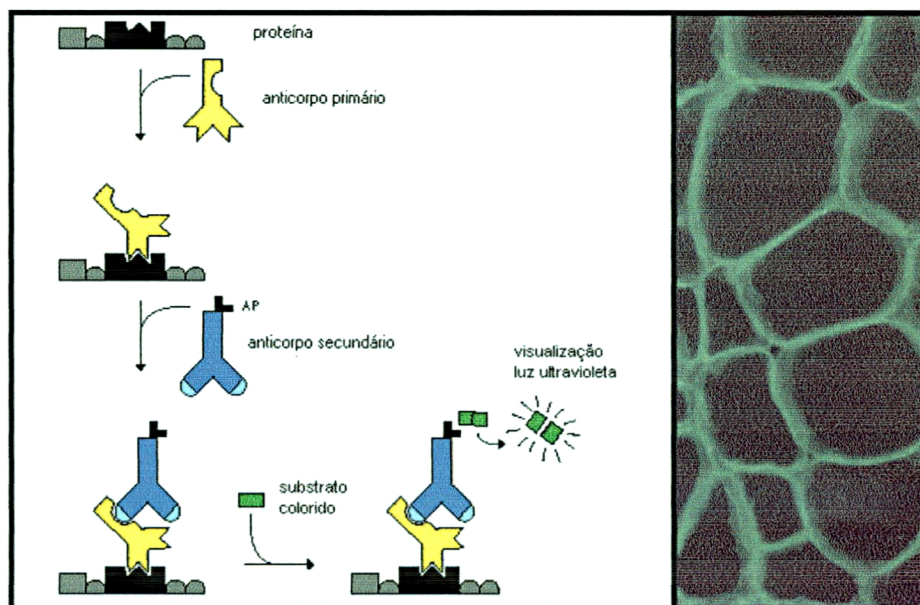


FIGURA 12 – Representação esquemática do procedimento para imunohistoquímica e visualização da imagem de fluorescência.

3.13.3 Classificação da Imunoidentificação da Distrofina, α -SG, β -SG, γ -SG, δ -SG e β -DG, de acordo com o Grau de Fluorescência

A imunoidentificação era considerada deficiente quando apresentava ausência de fluorescência em todas as fibras musculares (Figura 13) ou quando na presença de traços de fluorescência em raros segmentos (Figura 14). Considerou-se reduzida a imunoidentificação quando a fluorescência apresentava redução difusa na maioria das fibras (Figura 15), e considerada normal quando na presença de fluorescência uniforme em todas as fibras musculares (Figura 16).

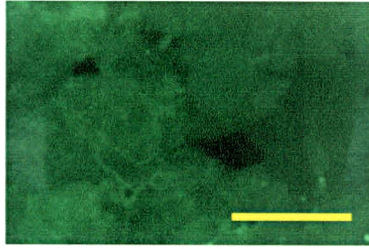


FIGURA 13 – Imunoidentificação deficiente, mostrando ausência de fluorescência na maioria das fibras. Anticorpo primário anti- β -SG. Barra 25 μ .

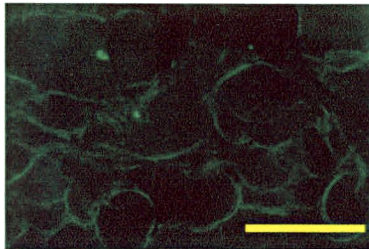


FIGURA 14 – Imunoidentificação deficiente, traços de fluorescência em raras fibras. Anticorpo primário anti- α -SG. Barra 25 μ .

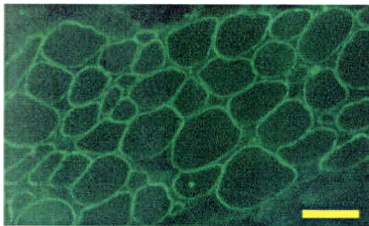


FIGURA 15 – Imunoidentificação reduzida, mostrando redução difusa da fluorescência. Anticorpo primário anti- α -SG. Barra 100 μ .

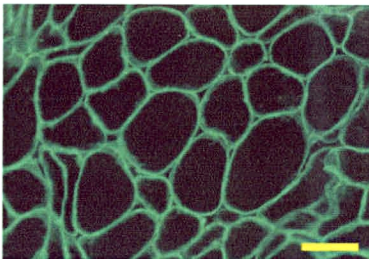


FIGURA 16 – Imunoidentificação normal, fluorescência uniforme em todas as fibras musculares. Anticorpo primário anti- γ -SG. Barra 100 μ .

3.13.4 Classificação da Imunoidentificação da Disferlina de acordo com o Grau de Fluorescência

A imunoidentificação da disferlina foi classificada como deficiente somente quando na ausência de fluorescência em toda a biópsia muscular (Figura 13)

[JOHNSON, 2001].

3.13.5 Técnica para Imunoidentificação da Calpaína-3

Inicialmente se preparava o gel de corrida (Anexo 7), de 13 cm de altura por 1,5 mm de espessura, ao qual, logo depois da sua polimerização, se acrescentava o gel de empilhamento (Anexo 7), juntamente com a colocação do pente de teflon (10 dentes de 1 cm).

Durante a polimerização do gel de empilhamento, homogeneizavam-se 40 mg dos músculos dos pacientes em 19 volumes em solução de homogeneização (Anexo 7), sob refrigeração. O músculo homogeneizado era colocado em água fervente por três minutos, e logo a seguir era centrifugado a 11 mil rotações por minuto (RPM), durante quatro minutos. Nesse momento, montava-se o gel de corrida (Anexo 7) nas cubas de eletroforese, os quais continham a solução de corrida (Anexo 7). Os spots formados pelo pente eram preenchidos por alíquotas de 40 µl do supernadante dos músculos homogeneizados depois da centrifugação. Aplicamos simultaneamente marcador de peso molecular pré-corado em uma das linhas de corrida (BenchMark Prestained Protein Ladder – GibcoBRL, US). Impomos a uma corrente de 21 mA, por um período de 6 horas, à temperatura ambiente. Ao

final da corrida iniciou-se a transferência das proteínas separadas e presentes no gel de corrida para a membrana de nitrocelulose.

Inicialmente incubamos a membrana de nitrocelulose e o papel filtro (Whatman número 50) na solução de transferência durante 30 minutos. A seguir o cassete de transferência era montado no suporte de transferência na seguinte ordem: espuma, papel filtro, gel de acrilamida, membrana de nitrocelulose, papel filtro e espuma (Figura 17). O cassete era inserido na cuba de transferência, com a solução própria (Anexo 7), obedecendo-se à seguinte orientação: eletrodo catodo (-), gel, membrana de nitrocelulose, eletrodo anodo (+) (Figura 17), sob corrente de $0,65 \text{ mA/cm}^2$, durante seis horas, à temperatura ambiente.

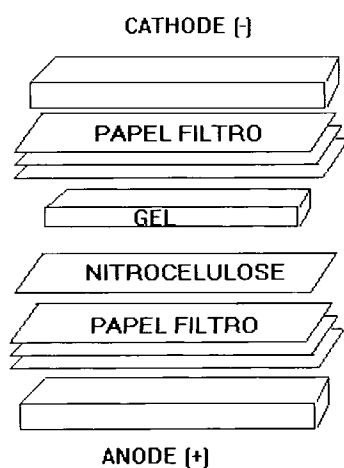


FIGURA 17 – Representação esquemática da montagem do cassete de transferência. Migração eletroforética das proteínas presentes no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para a membrana de nitrocelulose.

Após o processo de transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose, iniciava-se a imunoidentificação da calpaína-3. A membrana de nitrocelulose era incubada na solução pré-incubadora (Anexo 7), durante uma hora, à

temperatura ambiente, em mesa agitadora. A seguir, a membrana de nitrocelulose era colocada na solução incubadora (Anexo 7), à temperatura de 8° C, durante doze horas. Terminado o período de incubação, a membrana de nitrocelulose era agitada na solução pré-incubadora e depois na solução de TBST (Anexo 7), por quinze minutos, respectivamente. A membrana, então, era colocada na solução pós-incubadora (Anexo 7), por duas horas, à temperatura ambiente, sob agitação.

Para a visualização da banda da calpaína-3, a membrana de nitrocelulose era lavada três vezes em solução TBST, durante quinze minutos, para ser, em seguida, colocada na solução de exposição até a visualização da banda da calpaína-3 (Figura 18). A membrana de nitrocelulose era seca em papel filtro, sendo armazenada em local escuro.

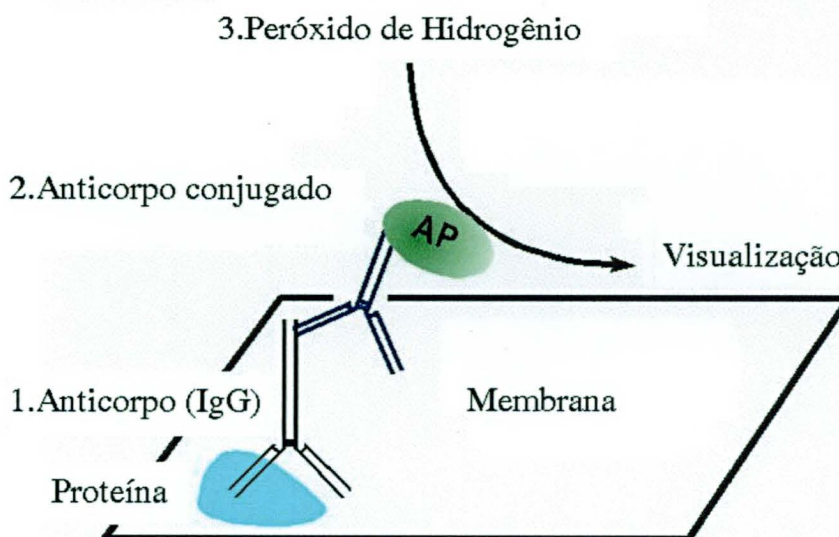


FIGURA 18 – Representação esquemática da imunoidentificação da proteína (calpaína-3) na membrana de nitrocelulose (Western Blot).

3.13.6 Classificação da Imunoidentificação da Calpaína-3

Consideraram-se como deficientes os casos com ausência da imunoidentificação da banda da calpaína-3. Imunoidentificação normal da calpaína-3 na Figura 19.



FIGURA 19 – Imunoidentificação da calpaína-3 (vermelho); marcadores de peso molecular (preto).

3.14 Testes Estatísticos

Os dados obtidos foram armazenados em variáveis de um banco de dados com o auxílio de um computador e posteriormente analisados com o programa de estatística SPSS (Versão 8.0.0). Para a análise estatística, utilizaram-se os testes do Chi-quadrado, exato de Fisher e Mann-Whitney [LOPES, 1999; SWINSCOW, 1978]. Os testes que obtiveram probabilidade (p) igual ou inferior a 0,05 foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4.1 IMUNOIDENTIFICAÇÃO

A imunoidentificação da distrofina (domínio Rod, terminais carboxila e amino), α -SG e γ -SG foi realizada em 100,00% dos casos; da δ -SG, em 80,40%; disferlina, em 80,40%; β -SG, em 67,90%, e da β -DG, em 85,70%, em virtude da insuficiência do material da biópsia muscular. A imunoidentificação da calpaína-3 foi realizada nos casos com distrofina, α -SG, β -SG, γ -SG, δ -SG e disferlina normais e material de biópsia muscular suficiente (Anexo 8).

A distrofina foi normal em todos os casos; α -SG, em 42 casos; β -SG, em 28; γ -SG, em 45; δ -SG, em 32; β -DG, em 41; disferlina, em 37, e calpaína, em 9. Ocorreu redução de α -SG em 7 casos; β -SG, em 4; γ -SG, em 2; δ -SG, em 8, e β -DG, em 3. Houve deficiência importante de α -SG em 7 casos; β -SG, em 6; γ -SG, em 9; δ -SG, em 5; β -DG, em 4; disferlina, em 8, e de calpaína-3, em 5 (Tabela 17).

TABELA 17 – IMUNOIDENTIFICAÇÃO DA DISTROFINA, COMPLEXO-SG, DISFERLINA, β -DG E CALPAÍNA-3

Imunoidentificação	Deficiente	Reduzida	Normal	Não realizada	Total
Distrofina					
Amino	-	-	56	-	56
Carboxila	-	-	56	-	56
Rod	-	-	56	-	56
Sarcoglicano					
Alfa	7	7	42	-	56
Beta	6	4	28	18	56
Gama	9	2	45	-	56
Delta	5	8	32	11	56
Distroglicano					
Beta	4	3	41	8	56
Disferlina	8	-	37	11	56
Calpaína-3	5	-	9	42	56

4.2 CLASSIFICAÇÃO

Os casos foram classificados em quatro grupos, conforme os tipos de proteínas deficientes: Grupo A, caracterizado pela deficiência do complexo SG (Figura 20 a 22), foi observado em 18 (32,10%) casos; grupo B, com deficiência de disferlina (Figura 23 a 25), em 8 (14,30%); grupo C, com deficiência de calpaína-3 (Figuras 26 a 29), em 5 (8,90%); grupo D, com estudo não classificado, em 8 (14,30%); grupo E, em 17 (30,40%), com estudo inconclusivo (Tabela 18).

No grupo A, observou-se redução isolada de α -SG no casos 25, 33, 52 e 62; de δ -SG nos casos 20 e 64. Houve deficiência específica de γ -SG nos casos 23 e 58. Os casos 1, 2, 8, 51, 56, 59 e 66 apresentaram deficiência uniforme das proteínas do complexo e de redução nos casos 19, 32 e 42 (Anexo 8).

Os casos do grupo E foram excluídos das análises estatísticas em razão da insuficiência do material da biópsia muscular, formando, portanto, 39 casos completos para análise (Tabela 18).

TABELA 18 – CLASSIFICAÇÃO DOS PACIENTES POR GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO

Grupo	Deficiência	Casos	Total
A	Complexo-SG	1, 2, 8, 19, 20, 23, 25, 32, 33, 42, 51, 52, 56, 58, 59, 62, 64 e 66.	18 32,10%
B	Disferlina	13, 31, 37, 38, 39, 47, 50 e 67.	8 14,30%
C	Calpaína-3	11, 30, 35, 36 e 60.	5 8,90%
D	Não classificado	16, 17, 22, 40, 43, 49, 61 e 63.	8 14,30%
E	Inconclusivo	10, 12, 14, 15, 21, 27, 28, 29, 34, 41, 44, 45, 46, 48, 55, 57 e 65.	17 30,40%

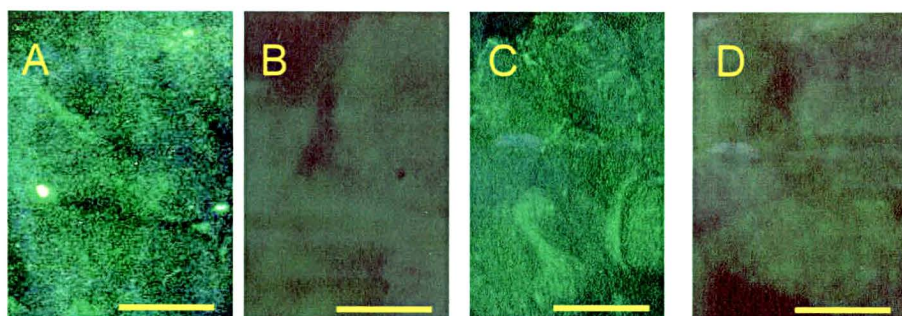
CASO 51 – DEFICIÊNCIA DO COMPLEXO SARCOGLICANO

FIGURA 20 – Deficiência do complexo SG (caso 51). A: Alfa; B: Beta; C: Gama; D: Delta. Traço 25 μ .

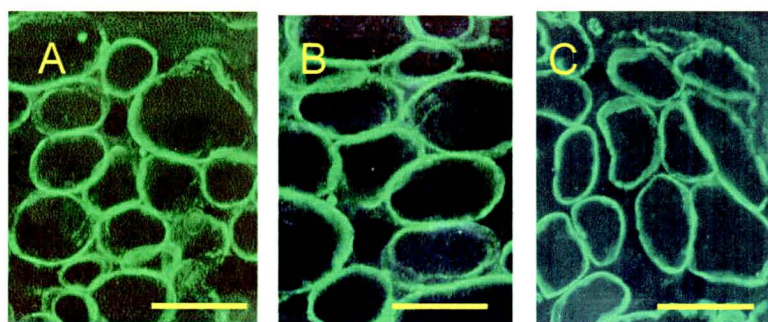


FIGURA 21 – Distrofina normal (caso 51). A: Terminal Carboxila; B: Terminal Amino; C: Domínio Rod.

Traço 100 μ .

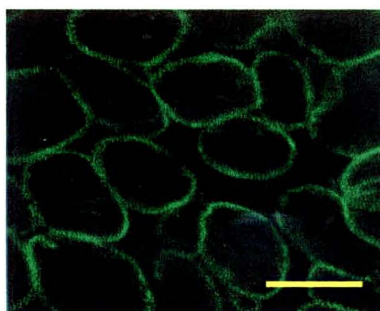


FIGURA 22 – Disferlina (caso 51): Normal. Traço 100 μ .

CASO 38 – DEFICIÊNCIA DE DISFERLINA

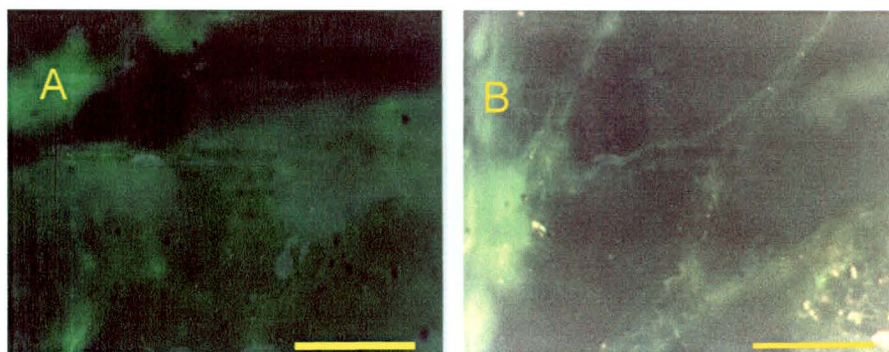


FIGURA 23 – A: Deficiência de disferlina (caso 38); B: disferlina normal. Barra 25 μ

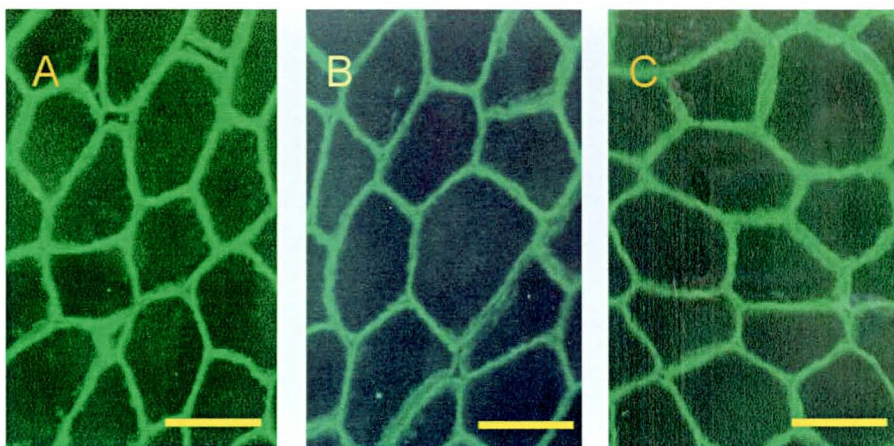


FIGURA 24 – Distrofinas normais (caso 38). A: Terminal Carboxila; B: Terminal Amino; C: Domínio

Rod. Barra 100 μ .

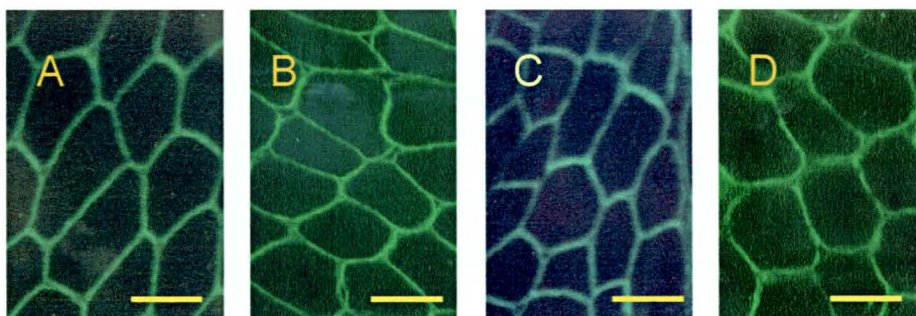


FIGURA 25 – Sarcoglicanos normais (caso 38). A: Alfa; B: Beta; C:Gama; D: Delta. Barra 100 μ .

CASO 30 – DEFICIÊNCIA DE CALPAÍNA-3



FIGURA 26 – Calpaína-3. A: normal (Marcador vermelho); B: ausência da banda (caso 30).

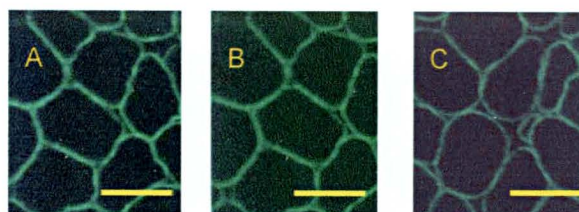


FIGURA 27 – Distrofina normal (caso 30). A: Terminal Carboxila; B: Terminal Amino; C: Domínio Rod. Barra 100 μ .

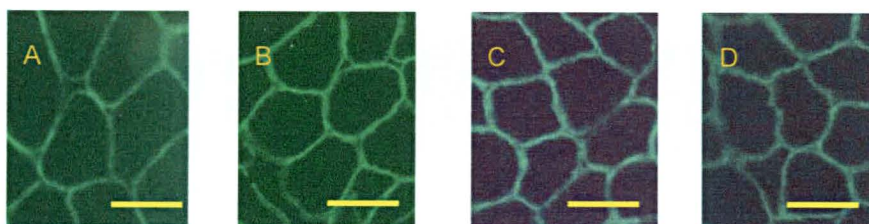


FIGURA 28 – Sarcoglicanos normais (caso 30). A: Alfa; B: Beta; C Gama; D: Delta. Barra 100 μ .



FIGURA 29 – Disferlina normal (caso 30). Barra 25 μ .

4.3 SEXO

Ambos os sexos foram acometidos, com discreto predomínio de casos do sexo masculino. Observou-se diferença estatística significativa entre os grupos com deficiência de disferlina e calpaína-3 (Tabela 19).

TABELA 19 – GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E SEXO

Grupo	A	B	C	D	Total
Número de casos	18	8	5	8	39
Sexo					
Feminino	8	7	-	3	18
	44,40%	87,50%	0,00%	37,50%	46,20%
Masculino	10	1	5	5	21
	55,60%	12,50%	100,00%	62,50%	53,80%

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado

Teste exato de Fisher: grupos A e B p = 0,084; grupos A e C p = 0,122; grupos A e D p = 1,000; grupos B e C p = 0,005; grupos B e D p = 0,119; grupos C e D p = 0,231.

4.4 HISTÓRIA FAMILIAR

A maioria dos casos ocorreu de forma esporádica. Nos casos com história familiar, observou-se o acometimento nos avós, pais ou filhos, como em história de casais consangüíneos (Anexo 2). Houve predomínio de casos com história familiar no grupo com deficiência de disferlina (62,50%), sem diferença estatística significativa (Tabela 20).

TABELA 20 – GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E HISTÓRIA FAMILIAR

Grupo	A	B	C	D	Total
Número de casos	18	8	5	8	39
História familiar					
Ausente	11	3	3	4	21
	61.10%	37.50%	60.00%	50.00%	53.80%
Presente	7	5	2	4	18
	38.90%	62.50%	40.00%	50.00%	46.20%

A = sarcoglicanopatia, B = disferlinopatia, C = calpainopatia, D = não classificado

Teste exato de Fisher: grupos A e B p = 0,401; grupos A e C p = 1,000; grupos A e D p = 0,683; grupos B e C p = 0,592; grupos B e D p = 1,000; grupos C e D p = 1,000.

4.5 INÍCIO DOS SINTOMAS

Na maioria dos casos, houve início dos sintomas entre a primeira e segunda década de vida. O grupo com deficiência de disferlina apresentou idade de início dos sintomas mais tardia em relação aos grupos com deficiência do complexo SG e calpaína-3 (Tabela 21).

TABELA 21 – GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E IDADE DE INÍCIO DOS SINTOMAS ⁽¹⁾

Grupos	A	B	C	D	Total
Numero de casos	18	8	5	8	39
Distribuição					
< 1 ano	-	-	1	-	1
	0,00%	0,00%	20,00%	0,00%	2,60%
1 – 10 anos	9	1	3	4	17
	50,00%	12,50%	60,00%	50,00%	43,60%
11 – 20 anos	6	2	1	-	9
	33,30%	25,00%	20,00%	0,00%	23,10%
21 – 30 anos	1	3	-	2	6
	5,60%	37,50%	0,00%	25,00%	15,40%
> 30 anos	2	2	-	2	6
	5,60%	37,50%	0,00%	25,00%	15,40%
Média	12,36	27,12	7,34	17,95	15,89
Desvio-padrão	10,68	15,72	6,42	15,89	13,80

(1) Idade em anos.

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado

Mann-Whitney: grupos A e B p = 0,014; grupos A e C p = 0,351; grupos A e D p = 0,656; grupos B e C p = 0,010; grupos B e D p = 0,400; grupos C e D p = 0,341.

4.6 IDADE NA AVALIAÇÃO

Avaliou-se a maioria dos casos entre a segunda e terceira década de vida. O grupo com deficiência de disferlina apresentou diferença significativa da idade na avaliação em relação aos grupos com deficiência do complexo SG e calpaína-3 (Tabela 22).

TABELA 22 – GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E IDADE NA AVALIAÇÃO ⁽¹⁾

Grupos	A	B	C	D	Total
Número de casos	18	8	5	8	39
Distribuição					
1 – 10 anos	4	-	1	-	5
	22,20%	0,00%	20,00%	0,00%	12,80%
11 – 20 anos	7	1	2	2	12
	38,90%	12,50%	40,00%	25,00%	30,80%
21 – 30 anos	3	4	2	3	12
	16,70%	50,00%	40,00%	37,50%	30,80%
> 30 anos	4	3	-	3	10
	22,20%	37,50%	0,00%	37,50%	25,60%
Média	19,28	33,87	17,40	27,50	23,72
Desvio-padrão	12,27	13,20	6,50	11,14	12,88

(1) Idade em anos.

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado

Mann-Whitney: grupos A e B p = 0,020; grupos A e C p = 0,881; grupos A e D p = 0,113 ; grupos B e C p = 0,010; grupos B e D p = 0,400; grupos C e D p = 0,124.

4.7 TEMPO DE DOENÇA NA AVALIAÇÃO

O tempo de doença variou de 0,4 a 28 anos (Anexo 1), ficando, na maioria dos casos, entre 5 e 10 anos. Não houve diferença significativa entre os grupos com deficiência do complexo SG, disferlina, calpaína-3 e o não classificado (Tabela 23).

TABELA 23 – GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E TEMPO DE DOENÇA ⁽¹⁾

Grupos	A	B	C	D	Total
Número de casos	18	8	5	8	39
Distribuição					
< 5 anos	12	6	1	3	22
	66,70%	75,00%	20,00%	37,50%	56,40%
6 – 10 anos	4	-	2	1	7
	22,20%	0,00%	40,00%	12,50%	17,90%
11 – 15 anos	1	1	1	3	6
	5,60%	12,50%	20,00%	37,50%	15,40%
> 15 anos	1	1	1	1	4
	5,60%	12,50%	20,00%	12,50%	10,30%
Média	6,35	6,81	10,58	9,80	7,68
Desvio-padrão	6,80	7,20	7,30	8,70	7,32

(1) Idade em anos.

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado

Mann-Whitney: grupos A e B p = 0,845; grupos A e C p = 0,073; grupos A e D p = 0,469; grupos B e C p = 0,087; grupos B e D p = 0,633; grupos C e D p = 0,883.

4.8 MANIFESTAÇÃO CLÍNICA INICIAL

Na apresentação dos sintomas, houve o acometimento dos MMII em 71,80% dos casos. Os grupos com deficiência do complexo SG, disferlina, calpaína-3 e não classificado apresentaram início dos sintomas na musculatura proximal dos MMSS (Tabela 24). Não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos de imunoidentificação.

TABELA 24 – GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E MANIFESTAÇÃO CLÍNICA INICIAL

Grupo	A	B	C	D	Total
Número de casos	18	8	5	8	39
Fraqueza muscular					
MMSS	3	2	1	-	6
	16,70%	25,00%	20,00%	0,00%	15,40%
MMII	13	6	3	7	29
	72,20%	75,00%	60,00%	87,50%	74,40%
MMSS e MMII	2	-	1	1	4
	11,10%	0,00%	20,00%	12,50%	10,30%

MMII = membros inferiores; MMSS = membros superiores

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado

Chi-Quadrado: grupos A e B p = 1,000; grupos A e C p = 1,000; grupos A e D p = 0,375; grupos B e C p = 1,000; grupos B e D p = 1,000; grupos C e D p = 0,504.

4.9 ATROFIA DA MUSCULATURA PROXIMAL DOS MEMBROS SUPERIORES

A atrofia da musculatura proximal dos MMSS foi um achado freqüente em todos os grupos de imunoidentificação, sem diferença estatística significativa (Tabela 25).

TABELA 25 – GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E ATROFIA MUSCULAR PROXIMAL MMSS

Grupos	A	B	C	D	Total
Número de casos	18	8	5	8	39
Atrofia proximal MMSS					
Ausente	8	3	-	1	12
	44,40%	37,50%	0,00%	12,50%	30,80%
Presente	10	5	5	7	27
	55,60%	62,50%	100,00%	87,50%	69,20%

MMSS = membros superiores

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado

Teste exato de Fisher: grupos A e B p = 1,000; grupos A e C p = 0,122; grupos A e D p = 0,190; grupos B e C p = 0,320; grupos B e D p = 0,569; grupos C e D p = 1,000.

4.10 ATROFIA DA MUSCULATURA DISTAL DOS MEMBROS SUPERIORES

Observou-se atrofia da musculatura distal dos MMSS em 23,10% dos casos, estando ausente apenas no grupo com deficiência de disferlina, não havendo diferença estatística significativa (Tabela 26).

TABELA 26 – GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E ATROFIA MUSCULAR DISTAL MMSS

Grupos	A	B	C	D	Total
Número de casos	18	8	5	8	39
Atrofia muscular					
Ausente	14	8	3	5	30
	77,80%	100,00%	60,00%	62,50%	76,90%
Presente	4	-	2	3	9
	22,20%	0,00%	40,00%	37,50%	23,10%

MMSS = membros superiores

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado

Teste exato de Fisher: grupos A e B p = 0,277; grupos A e C p = 0,576; grupos A e D p = 0,635; grupos B e C p = 0,128; grupos B e D p = 0,200; grupos C e D p = 1,000.

4.11 ATROFIA DA MUSCULATURA PROXIMAL DOS MEMBROS INFERIORES

Constatou-se atrofia da musculatura proximal dos MMII em 63,10% dos casos, sendo achado comum nos grupos com deficiência do complexo SG, calpaína-3 e não classificado. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos de imunoidentificação (Tabela 27).

TABELA 27 – GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E ATROFIA MUSCULAR PROXIMAL MMII

Grupos	A	B	C	D	Total
Número de casos	18	8	5	8	39
Atrofia proximal MMII					
Ausente	7	5	1	2	15
	38,90%	62,50%	20,00%	25,00%	38,50%
Presente	11	3	4	6	24
	61,10%	37,50%	80,00%	75,00%	61,50%

MMII = membros inferiores

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado

Teste exato de Fisher: grupos A e B p = 0,401; grupos A e C p = 0,621; grupos A e D p = 0,667; grupos B e C p = 0,266; grupos B e D p = 0,315; grupos C e D p = 1,000.

4.12 ATROFIA DA MUSCULATURA DISTAL DOS MEMBROS INFERIORES

Ocorreu atrofia da musculatura distal dos MMII em 20,50% dos casos. Apenas o grupo com deficiência de disferlina não apresentou atrofia distal dos MMII. Não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos de imunoidentificação (Tabela 28).

TABELA 28 – GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E ATROFIA MUSCULAR DISTAL MMII

Grupos	A	B	C	D	Total
Número de casos	18	8	5	8	39
Atrofia muscular					
Ausente	15	8	3	5	31
	83,30%	100,00%	60,00%	62,50%	79,50%
Presente	3	-	2	3	8
	16,70%	0,00%	40,00%	37,50%	20,50%

MMII = membros inferiores

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado

Teste exato de Fisher: grupos A e B p = 0,401; grupos A e C p = 0,291; grupos A e D p = 0,330; grupos B e C p = 0,128; grupos B e D p = 0,200; grupos C e D p = 1,000.

4.13 HIPERTROFIA DE PANTURRILHAS

A hipertrofia de panturrilhas foi observada em 10,30% dos casos, apenas nos grupos com deficiência do complexo SG, sem diferença estatística significativa (Tabela 29).

TABELA 29 – GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E HIPERTROFIA DE PANTURRILHAS

Grupos	A	B	C	D	Total
Número de casos	18	8	5	8	39
Hipertrofia					
Ausente	14	8	5	8	35
	77,80%	100,00%	100,00%	100,00%	89,70%
Presente	4	-	-	-	4
	22,20%	0,00%	0,00%	0,00%	10,30%

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado

Teste exato de Fisher: grupos A e B p = 0,277; grupos A e C p = 0,593; grupos A e D p = 0,277.

4.14 GRADUAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR PROXIMAL DOS MEMBROS

SUPERIORES

A graduação média da força muscular proximal dos MMSS foi de 4,85 (Escala MRC modificada). O grupo com deficiência de calpaína-3 apresentou a menor média. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos de imunoidentificação (Tabela 30).

TABELA 30 – GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E GRADUAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR PROXIMAL MMSS

Grupos	A	B	C	D	Total
Número de casos	18	8	5	8	39
Graduação da força distal MMSS					
Média	4,94	5,13	4,00	4,88	4,85
Desvio-padrão	1,43	1,13	1,00	0,99	1,25

MMSS = membros superiores

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado

Mann-Whitney: grupos A e B $p = 0,649$; grupos A e C $p = 0,153$; grupos A e D $p = 1,000$; grupos B e C $p = 0,078$; grupos B e D $p = 0,684$; grupos C e D $p = 0,140$.

4.15 GRADUAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR DISTAL DOS MEMBROS SUPERIORES

A graduação média da força muscular distal dos MMSS foi de 6,44 (escala MRC modificada). O grupo com deficiência de calpaína-3 apresentou a menor média. Não houve diferença significativa entre os grupos de imunoidentificação (Tabela 31).

TABELA 31 – GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E GRADUAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR DISTAL MMSS

Grupos	A	B	C	D	Total
Número de casos	18	8	5	8	39
Graduação da força distal MMSS					
Média	6,61	6,75	5,80	6,13	6,44
Desvio-padrão	0,92	0,71	1,30	0,99	0,97

MMSS = membros superiores

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado

Mann-Whitney: grupos A e B $p = 0,756$; grupos A e C $p = 0,074$; grupos A e D $p = 0,133$; grupos B e C $p = 0,089$; grupos B e D $p = 0,138$; grupos C e D $p = 0,638$.

4.16 GRADUAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR PROXIMAL DOS MEMBROS INFERIORES

A graduação média da força muscular proximal dos MMII foi de 4,64. O grupo com deficiência de calpaína-3 apresentou a menor média. Não houve diferença significativa entre os grupos de imunoidentificação (Tabela 32).

TABELA 32 – GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E GRADUAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR PROXIMAL MMII

Grupos	A	B	C	D	Total
Número de casos	18	8	5	8	39
Graduação da força distal MMII					
Média	4,83	4,63	4,20	4,50	4,64
Desvio-padrão	1,29	1,19	1,10	0,53	1,11

MMII = membros inferiores

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado

Mann-Whitney: grupos A e B p = 0,639; grupos A e C p = 0,208; grupos A e D p = 0,551; grupos B e C p = 0,438; grupos B e D p = 1,000; grupos C e D p = 0,332.

4.17 GRADUAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR DISTAL DOS MEMBROS INFERIORES

A graduação média da força muscular distal dos MMII foi de 6,41. O grupo com deficiência de calpaína-3 apresentou redução significativa da força muscular em relação ao grupo com deficiência do complexo SG e disferlina (Tabela 33).

TABELA 33 – GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E GRADUAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR DISTAL MMII

Grupos	A	B	C	D	Total
Número de casos	18	8	5	8	39
Graduação da força distal MMII					
Média	6,78	6,63	5,00	6,25	6,41
Desvio-padrão	0,65	0,74	1,22	1,16	1,02

MMII = membros inferiores

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado

Mann-Whitney: grupos A e B p = 0,425; grupos A e C p = 0,001; grupos A e D p = 0,124; grupos B e C p = 0,025; grupos B e D p = 0,522; grupos C e D p = 0,105.

4.18 AVALIAÇÃO DA MARCHA

A maioria dos casos apresentou marcha miopática na ocasião da avaliação. Apenas os grupos com deficiência do complexo SG e o não classificado apresentaram casos com perda de marcha. Não houve diferença significativa entre os grupos de imunoidentificação (Tabela 34).

TABELA 34 – GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E TIPO DE MARCHA

Grupos	A	B	C	D	Total
Número de casos	18	8	5	8	39
Tipo marcha					
Normal	2	2	1	1	6
	11,10%	25,00%	20,00%	12,50%	15,40%
Miopática	15	6	4	6	31
	83,30%	75,00%	80,00%	75,00%	79,50%
IR	1	-	-	1	2
	5,60%	0,00%	0,00%	12,50%	5,10%

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado; IR = incapaz de realizar
Chi-Quadrado: grupos A e B $p = 0,491$; grupos A e C $p = 0,702$; grupos A e D $p = 0,828$; grupos B e C $p = 1,000$; grupos B e D $p = 0,422$; grupos C e D $p = 0,580$.

4.19 MANOBRA DE GOWERS

Constatou-se a manobra de Gowers em todos os grupos de imunoidentificação. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos de imunoidentificação (Tabela 35).

TABELA 35 – GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E MANOBRA DE GOWERS

Grupos	A	B	C	D	Total
Número de casos	18	8	5	8	39
Manobra de Gowers					
Ausente	3	2	-	-	5
	16,70%	25,00%	0,00%	0,00%	12,80%
Presente	13	6	5	7	31
	72,20%	75,00%	100,00%	87,50%	79,50%
IR	2	-	-	1	3
	11,10%	0,00%	0,00%	12,50%	7,70%

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado; IR = incapaz de realizar
 Chi-Quadrado: grupos A e B $p = 0,578$; grupos A e C $p = 0,412$; grupos A e D $p = 0,470$; grupos B e C $p = 0,487$; grupos B e D $p = 0,215$; grupos C e D $p = 1,000$.

4.20 ESTADO FUNCIONAL MOTOR

Na avaliação funcional, observou-se que predominaram as dificuldades de marcha, correr e subir ou descer degraus. Apenas os grupos com deficiência do complexo SG e o não classificado apresentaram casos com grau de incapacidade funcional maior. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos de imunoidentificação (Tabela 36).

TABELA 36 – GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E ESTADO FUNCIONAL MOTOR⁽¹⁾

Grupos	A	B	C	D	Total
Número de casos	18	8	5	8	39
Escala funcional ⁽¹⁾					
1	2 11,10%	1 12,50%	- 0,00%	1 12,50%	4 10,3%
2	5 27,80%	2 25,00%	2 40,00%	2 25,00%	11 28,20%
3	8 44,40%	5 62,50%	3 60,00%	4 50,00%	20 51,30%
4	2 11,10%	- 0,00%	- 0,00%	- 0,00%	2 5,10%
7	- 0,00%	- 0,00%	- 0,00%	1 12,50%	1 2,60%
9	1 5,60%	- 0,00%	- 0,00%	- 0,00%	1 2,60%

(1) Escala de Vignos modificada.

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado

Chi-Quadrado: grupos A e B p = 0,787; grupos A e C p = 0,776; grupos A e D p = 0,601; grupos B e C p = 0,653; grupos B e D p = 0,754; grupos C e D p = 0,675.

4.21 ENZIMAS MUSCULARES

A elevação média dos níveis séricos de CK foi maior nos casos com deficiência de disferlina. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos de imunoidentificação (Tabela 37).

TABELA 37 – GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E DOSAGEM DO NÍVEL SÉRICO DA CK ⁽¹⁾

Grupos	A	B	C	D	Total
Número de casos	18	8	5	8	39
Casos estudados	18	7	2	6	33
Média	17,39	23,85	10,45	12,26	17,41
Desvio-padrão	22,53	18,25	14,21	7,40	19,08

(1) Número de vezes aumentado acima do normal.

CK = creatinaquinase

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado

Mann-Whitney: grupos A e B p = 0,333; grupos A e C p = 0,705; grupos A e D p = 0,548; grupos B e C p = 0,240; grupos B e D p = 0,252; grupos C e D p = 0,739.

A elevação média dos níveis séricos de LDH foi maior no grupo com deficiência do complexo SG, sem diferença estatística significativa (Tabela 38).

TABELA 38 – GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E DOSAGEM DO NÍVEL SÉRICO DA LDH⁽¹⁾

Grupos	A	B	C	D	Total
Número de casos	18	8	5	8	39
Casos estudados	15	7	2	5	29
Média	1,86	1,38	0,10	0,52	1,39
Desvio-padrão	2,74	1,33	0,14	0,84	2,15

(1) Número de vezes aumentado acima do normal.

LDH = desidrogenase láctica

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado

Mann-Whitney: grupos A e B p = 0,944; grupos A e C p = 0,154; grupos A e D p = 0,172; grupos B e C p = 0,140; grupos B e D p = 0,218; grupos C e D p = 0,453.

A elevação média dos níveis séricos de AST foi maior no grupo com deficiência de disferlina, não havendo diferença estatística significativa entre grupos de imunoidentificação (Tabela 39).

TABELA 39 – GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E DOSAGEM DO NÍVEL SÉRICO DA AST⁽¹⁾

Grupos	A	B	C	D	Total
Número de casos	18	8	5	8	39
Casos estudados	13	7	2	6	28
Média	1,13	16,01	0,70	4,08	5,45
Desvio-padrão	1,33	29,18	0,98	7,83	15,53

(1) Número de vezes aumentado acima do normal.

AST = aspartato aminotransferase

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado

Mann-Whitney: grupos A e B p = 0,152; grupos A e C p = 0,549; grupos A e D p = 0,825; grupos B e C p = 0,303; grupos B e D p = 0,387; grupos C e D p = 0,495.

A elevação média dos níveis séricos de ALT foi maior no grupo com deficiência do complexo SG, sem diferença estatística significativa (Tabela 40).

TABELA 40 – GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E DOSAGEM DO NÍVEL SÉRICO DA ALT ⁽¹⁾

Grupos	A	B	C	D	Total
Número de casos	18	8	5	8	39
Casos estudados	8	4	2	3	17
Média	0,68	0,37	1,00	0,16	0,55
Desvio-padrão	0,85	0,62	1,41	0,28	0,77

(1) Número de vezes aumentado acima do normal.

ALT = alanino aminotransferase

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado

Mann-Whitney: grupos A e B p = 0,536; grupos A e C p = 0,891; grupos A e D p = 0,333; grupos B e C p = 0,623; grupos B e D p = 0,696; grupos C e D p = 0,519.

A elevação média dos níveis séricos de aldolase foi maior no grupo com deficiência do complexo SG, sem diferença estatística significativa (Tabela 41).

TABELA 41 – GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E DOSAGEM DO NÍVEL SÉRICO DA ALDOLASE ⁽¹⁾

Grupos	A	B	C	D	Total
Número de casos	18	8	5	8	39
Casos estudados	9	2	2	1	19
Média	3,21	0,00	0,10	2,60	2,49
Desvio-padrão	4,40	-	0,14	-	3,89

(1) Número de vezes aumentado acima do normal.

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado

Mann-Whitney: grupos A e B p = 0,202; grupos A e C p = 0,159; grupos A e D p = 0,526; grupos B e C p = 0,480; grupos B e D p = 0,317; grupos C e D p = 0,221.

A elevação dos níveis séricos de CK apresentou correlação com elevação da AST (p=0,006), LDH (p<0,001) e aldolase (p=0,001) e tendência para ALT (p=0,078). O tempo de doença, a força muscular e a escala funcional de Vignos não apresentaram correlação com o aumento dos níveis séricos de CK, ALT, AST, LDH e aldolase (p>0,05).

4.22 ELETROMIOGRAFIA

A eletromiografia com padrão miopático foi observada em 82,00% dos casos. Também se constatou o padrão neuromiopático em todos os grupos de imunoidentificação. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos de imunoidentificação (Tabela 42).

TABELA 42 – GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E PADRÃO ELETROMIOGRÁFICO

Grupos	A	B	C	D	Total
Número de casos	18	8	5	8	39
Casos estudados	16	8	3	8	35
Padrão eletromiográfico					
Miopático	15	7	2	7	31
	93,80%	87,50%	66,70%	87,50%	82,00%
Misto	1	1	1	1	4
	6,30%	12,50%	33,30%	12,50%	12,00%

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado

Chi-Quadrado: grupo A e B p=1,000; grupos A e C p = 0,298; grupos A e D p = 1,000; grupos B e C p = 0,491; grupos B e D p = 1,000; grupos C e D p = 0,491.

4.23 BIÓPSIA MUSCULAR – HISTOPATOLOGIA

A variação do diâmetro de fibras foi o achado histoquímico comum a todos os grupos de imunoidentificação. A atrofia de fibras do tipo 1 e a hipertrofia de fibras tipo 1 foram mais freqüentes no grupo com deficiência de calpaína-3. A atrofia de pequenos grupos foi mais comum no grupo não classificado e a de fibras anguladas atroficas no grupo com deficiência de calpaína-3. A formação de grumos nucleares foi mais freqüente nos grupos com deficiência de disferlina e no não classificado (Tabela 43). Nenhuma dessas alterações foi estatisticamente significativa (Anexo 9).

TABELA 43 – GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E ALTERAÇÕES NO DIÂMETRO DAS FIBRAS

Grupos	A	B	C	D	Total
Número de casos	18	8	5	8	39
Varição do diâmetro de fibras/HE	18	8	5	7	38
	100,00%	100,00%	100,00%	87,50%	97,40%
Atrofia de fibras tipo 1/ATPase	15	7	5	7	34
	83,30%	87,50%	100,00%	87,50%	87,20%
Atrofia de fibras tipo 2/ATPase	14	6	4	5	29
	77,80%	75,00%	80,00%	62,50%	74,40%
Hipertrofia de fibras tipo 1/ATPase	12	6	4	5	27
	66,70%	75,00%	80,00%	62,50%	69,20%
Hipertrofia de fibras tipo 2/ATPase	12	6	4	7	29
	66,70%	75,00%	80,00%	87,50%	74,40%
Fibras anguladas atroficas/HE	6	2	-	2	10
	33,30%	25,00%	0,00%	25,00%	25,60%
Fibras anguladas atroficas/NADH-TR	6	4	3	1	14
	33,30%	50,00%	60,00%	12,50%	35,90%
Fibras anguladas atroficas/Esterase	9	4	4	4	21
	50,00%	50,00%	80,00%	50,00%	53,80%
Atrofia de pequenos grupos/HE	1	1	-	3	5
	5,60%	12,50%	0,00%	37,50%	12,80%
Grupos nucleares/HE	2	3	1	3	12
	11,10%	37,50%	20,00%	37,50%	23,10%

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado

HE = hematoxilina e eosina; ATPase = adenosina trifosfato; NADH-TR = desidrogenase adenina nicotinamida tetrazolium redutase

Teste exato de Fisher $p > 0,05$ (Anexo 9)

O predomínio de fibras foi um achado pouco freqüente nos grupos com deficiência do complexo SG, calpaína-3 e no não classificado (Tabela 44), não sendo estatisticamente significante (Anexo 9).

TABELA 44 – GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E ALTERAÇÃO NA DISTRIBUIÇÃO DE FIBRAS

Grupos	A	B	C	D	Total
Número de casos	18	8	5	8	39
Predomínio de fibras tipo 1/ATPase	3	-	2	1	6
	16,70%	0,00%	40,00%	12,50%	15,40%
Predomínio de fibras tipo 2/ATPase	1	-	-	1	2
	5,60%	0,00%	0,00%	12,50%	5,10%

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado

ATPase = adenosina trifosfato; HE = hematoxilina e eosina

Teste exato de Fisher $p > 0,05$ (Anexo 9)

Fibras em processo de necrose foram mais freqüentes no grupo com deficiência de calpaína-3, e em regeneração, no grupo com deficiência de disferlina e no não classificado (Tabela 45), não sendo estatisticamente significante (Anexo 9).

TABELA 45 – GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E PROCESSO DE DEGENERAÇÃO/REGENERAÇÃO

Grupos	A	B	C	D	Total
Número de casos	18	8	5	8	39
Fibras em necrose/HE	8	6	4	5	23
	44,40%	75,00%	80,0%	62,50%	59,00%
Fibras basofílicas/HE	4	3	1	4	12
	22,20%	37,50%	20,0%	50,00%	30,80%
Fibras em segmentação/HE	7	2	3	4	16
	38,90%	25,00%	60,0%	50,00%	41,00%

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado
HE = hematoxilina e eosina
Teste exato de Fisher $p > 0,05$ (Anexo 9)

A formação de infiltrado inflamatório perivascular foi mais comum no grupo com deficiência do complexo SG. Houve aumento do tecido conjuntivo endomysial no grupo com deficiência de calpaína-3 e do tecido adiposo no grupo com deficiência de disferlina (Tabela 46). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Anexo 9).

TABELA 46 – GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E ALTERAÇÕES INTERTICIAIS

Grupos	A	B	C	D	Total
Número de casos	18	8	5	8	39
Infiltrado inflamatório perivascular/HE	8	2	1	2	13
	44,40%	25,00%	20,00%	25,00%	33,30%
Proliferação do tecido adiposo/HE	8	6	3	4	21
	44,4%	75,0%	60,0%	50,0%	53,8%
Proliferação do tecido conjuntivo endomysial/HE	8	6	3	5	32
	44,4%	75,0%	60,0%	62,5%	56,4%
Proliferação do tecido conjuntivo endomysial/Sirius Red	5	5	1	1	12
	27,80%	62,50%	20,00%	12,50%	30,80%

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado
HE = hematoxilina eosina
Teste exato de Fisher $p > 0,05$ (Anexo 9)

A presença de fibras com núcleos centrais foi mais freqüente nos grupos com deficiência de disferlina e no não classificado, e a de fibras em anel, formação de saca-bocados, turbilhões e aumento do NBT reduzido no grupo com deficiência de calpaína-3 (Tabela 47), sem diferença estatisticamente significativa (Anexo 9). Houve aumento de gotículas de gorduras nos grupos com deficiência de disferlina e no não classificado, e de mitocôndria na coloração para citocromo C oxidase no grupo não classificado (Tabela 47), sem diferença estatística significativa (Anexo 9).

TABELA 47 – GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS

Grupos	A	B	C	D	Total
Número de casos	18	8	5	8	39
Núcleos centrais/HE	12	7	3	7	29
	66,70%	87,50%	60,00%	87,50%	74,40%
Saca-bocados/NADH-TR	7	4	3	1	15
	38,90%	50,00%	60,00%	12,50%	38,50%
Turbilhões/NADH-TR	5	3	4	2	14
	27,80%	37,50%	80,00%	25,00%	35,90%
Aumento do NBT reduzido/NADH-TR	2	1	2	2	7
	11,10%	12,50%	40,00%	25,00%	17,90%
Vacúolos/HE	-	1	2	1	4
	0,00%	12,50%	40,00%	12,50%	10,30%
Vacúolos marginados/HE	1	1	-	-	2
	5,60%	12,50%	0,00%	0,00%	5,10%
Aumento de gotículas de gordura/OIL-RED-0	-	2	-	1	3
	0,00%	25,00%	0,00%	12,50%	7,70%
Citocromo C oxidase	-	-	-	1	1
	0,00%	0,00%	0,00%	12,50%	2,60%

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado

HE = hematoxilina eosina; NADH-TR = desidrogenase adenina nicotinamida tetrazolium redutase, NBT = nitroblue tetrazolium; OIL-RED-0 = óleo vermelho zero

Teste exato de Fisher $p > 0,05$ (Anexo 9)

O padrão miopático da biópsia muscular foi o achado prevalente em todos os grupos de imunoidentificação, sendo também observado o padrão de

desinervação nos grupos com deficiência do complexo SG, disferlina e calpaína-3, e neuromiopático nos grupos com deficiência do complexo SG e no não classificado (Tabela 48). Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos de imunoidentificação (Anexo 9).

TABELA 48 – GRUPOS DE IMUNOIDENTIFICAÇÃO E PADRÃO DA BIÓPSIA MUSCULAR

Grupos	A	B	C	D	Total
Número de casos	18	8	5	8	39
Miopático	12	5	4	7	28
	66,70%	62,50%	80,00%	87,50%	71,80%
Desinervação	2	3	1	-	6
	11,10%	37,50%	20,00%	0,00%	15,40%
Neuromiopático	4	-	-	1	5
	22,20%	0,00%	0,00%	12,50%	12,80%

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado

Chi-Quadrado: grupos A e B $p = 0,150$; grupos A e C $p = 0,485$; grupos A e D $p = 0,475$; grupos B e C $p = 1,000$; grupos B e D $p = 0,115$; grupos C e D $p = 0,325$

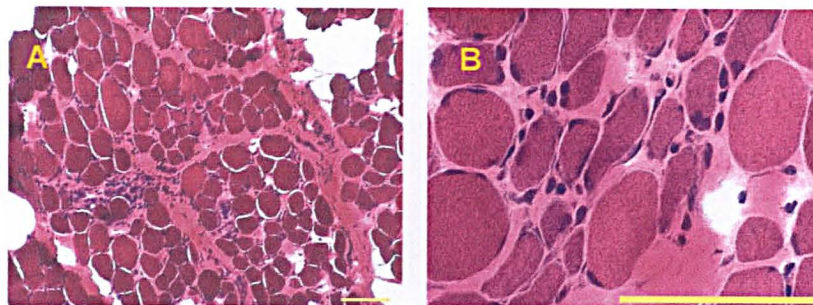
HISTOPATOLOGIA CASO 51 – DEFICIÊNCIA DO COMPLEXO SG

Figura 30 – A) discreta proliferação de tecido conjuntivo, infiltração por tecido adiposo, variação no diâmetro das fibras. B) Fibras atróficas basofílicas. H&E. Marca 100 μ .

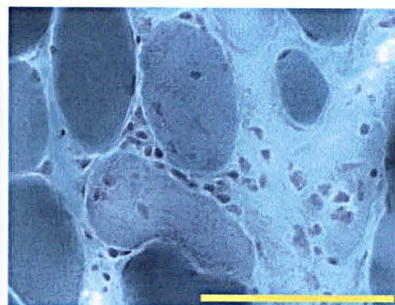


Figura 31 – Fibras em fase de degeneração e fagocitose. Tricromo de Gomori modificado. Marca 100 μ .

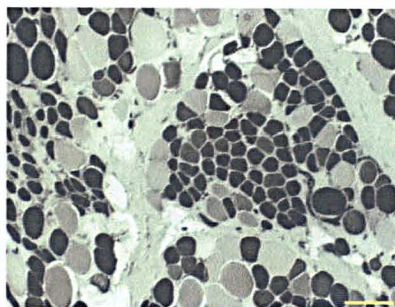


Figura 32 – Atrofia e hipertrofia de fibras tipo 1 e 2. ATPase pH 4.3. Marca 100 μ .

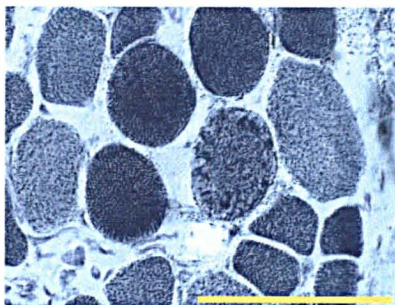


Figura 33 – Aumento do NBT reduzido e turbilhões. NADH-TR. Marca 100 μ .

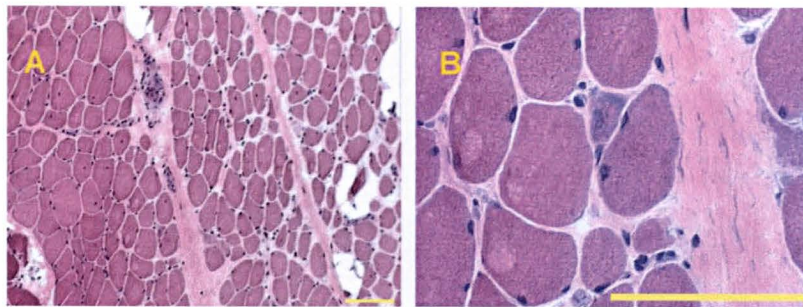
HISTOPATOLOGIA DO CASO 13 – DEFICIÊNCIA DE DISFERLINA

Figura 34 – A) Variação do diâmetro das fibras, proliferação tecido endomysial e adiposo. B) Fibras basofílicas. H&E. Marca 100 μ .

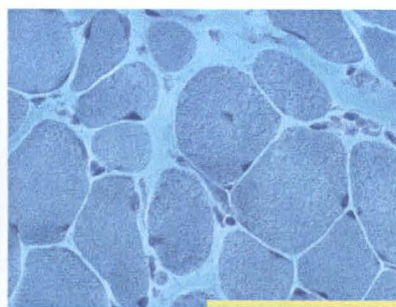


Figura 35 – Fibras atróficas, fibra com núcleo central. Tricromo de Gomori modificado. Marca 100 μ .

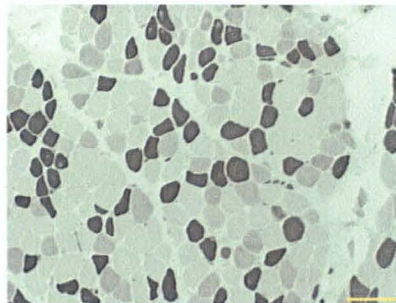


Figura 36– Atrofia de fibras tipo 1 e 2. ATPase pH 4.3. Marca 100 μ .

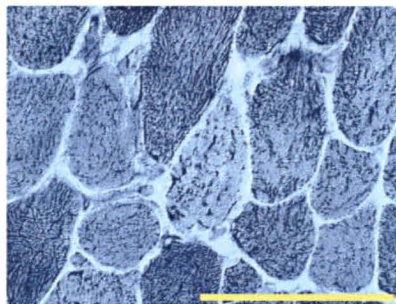


Figura 37 – Retículo sarcoplasmático irregular e sacabocados. NADH-TR. Marca 100 μ .

HISTOPATOLOGIA DO CASO 60 – DEFICIÊNCIA DE CALPAÍNA-3

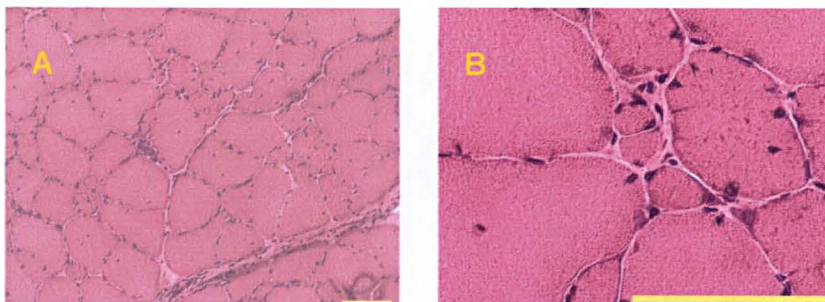


Figura 38 – A) Variação do diâmetro das fibras, fibras atróficas e hipertróficas fibras, sem padrão especial de distribuição e com núcleos centrais. B) Fibras em segmentação. H&E. Marca 100 μ .

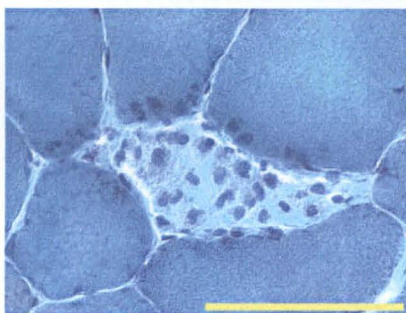


Figura 39 – Fibra em fase de degeneração e fagocitose. Tricromo de Gomori modificado. Marca 100 μ .

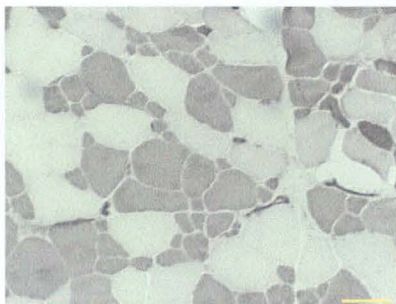


Figura 40 – Atrofia e hipertrofia de fibras tipo 1e 2. ATPase pH 4,3. Marca 100 μ .

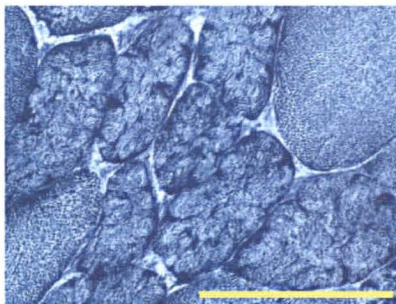


Figura 41 – Retículo sarcoplasmático irregular e sacabocados. Fibras lobuladas. NADH-TR. Marca 100 μ .

5 DISCUSSÃO

5.1 SEXO

As formas autossômicas recessivas e dominantes da DMC são caracterizadas pelo acometimento de ambos os sexos [WALTON & NATTRASS, 1954]; entretanto, o acometimento do sexo feminino não pode ser considerado achado específico, pois também é observado na DMD ou DMB [HOFFMAN et al., 1992]. Neste estudo, ambos os sexos também apresentaram fenótipos semelhantes [BEN HAMIDA, FARDEAU & ATTIA, 1983; FARDEAU et al., 1996a, 1996b; PASSOS-BUENO et al., 1999; UDD, KÄÄRIÄNEN & SOMER, 1991]. Os grupos com deficiência de disferlina e calpaína-3 apresentaram predomínio de casos do sexo feminino [ARGOV et al., 2000] e masculino, respectivamente. Tais resultados podem estar relacionados ao número reduzido da casuística deste trabalho.

5.2 HISTÓRIA FAMILIAR

Na maioria das vezes, é difícil estabelecer a identificação das formas de DMC com padrão de herança autossômico recessivo, em virtude do grande número de casos esporádicos, da falta de dados convincentes na história familiar e de sua grande similaridade clínica com a distrofia muscular de Duchenne e Becker. Este tipo de herança na DMC geralmente vem sendo caracterizado em grandes grupos familiares, localizados em comunidades isoladas, por causa dos altos índices de consangüinidade [BEN HAMIDA et al., 1983, BEN HAMIDA, FARDEAU & ATTIA, 1983; FARDEAU et al., 1996a, 1996b; SHOKEIR & KOBRINSKY, 1976]. O padrão de herança autossômico dominante, por ser

mais facilmente reconhecido, em razão do acometimento de várias gerações, pode auxiliar na abordagem da imunoidentificação dos casos [BUSHBY, 1999]. No presente estudo, a análise da história familiar foi sugestiva de herança autossômica recessiva em 14 casos e dominante em 1. Os caso autossômicos recessivos não apresentaram especificidade entre os grupos de imunoidentificação, foram mais freqüentes, porém, no grupo da disferlinopatia. A ausência de alterações na imunoidentificação, no caso com padrão autossômico dominante, corrobora os dados observados na literatura [BUSHBY, 1999; MCNALLY et al., 1998; VAN DER KOOI et al., 1997].

5.3 INÍCIO DOS SINTOMAS, IDADE NA AVALIAÇÃO E TEMPO DE DOENÇA

A variação importante da idade do início dos sintomas vem dificultando a caracterização de um padrão típico e único para cada forma de DMC, pois, mesmo que se apresente em faixas etárias de maior freqüência, esta ainda pode ser comum a mais de uma das formas — fato que vem impossibilitando a classificação da maioria do pacientes. As variações da idade de início dos sintomas constatadas neste estudo foram semelhantes às observadas na literatura [BUSHBY, 1999; CHAE et al., 2001; DINÇER et al., 1997; EYMARD, et al., 1997; PASSOS-BUENO et al., 1999; POLLITT et al., 2001]. O início mais precoce do grupo com deficiência de calpaína-3, em relação ao grupo com deficiência de disferlina, também foi descrito na literatura [PASSOS-BUENO et al., 1999]. No grupo com deficiência do complexo SG, o grau de deficiência não interferiu de forma significativa na idade de início dos sintomas [MORANDI et al., 1996]. A presença de maior número de casos com início na primeira década de vida, no grupo com deficiência do complexo SG, fez com que se observasse diferença significativa em relação ao grupo com deficiência de disferlina.

5.4 MANIFESTAÇÃO CLÍNICA INICIAL

Em algumas formas de DMC, o tipo de manifestação inicial dos sintomas pode apresentar padrões mais específicos, como observados nas formas DMC1A, 1D e na δ -sarcoglicanopatia (DMC2D), em que as alterações cardíacas podem preceder os sintomas musculares; na disferlinopatia (DMC2B), o comprometimento da musculatura posterior da perna; na teletoninopatia (DMC2G) e na forma DMC2J, o acometimento precoce da musculatura anterior da perna [FANIN et al., 2001; MATSUDA et al., 1999; MOREIRA et al., 2000]. Na maioria das vezes, o tipo de apresentação dos sintomas é inespecífico, sendo caracterizado pelo acometimento da musculatura proximal dos MMII. Ocasionalmente se pode observar o acometimento inicial da musculatura proximal dos MMSS ocorrer de forma generalizada, ou apenas há queixas de dores musculares e intolerância a exercícios [CHAE et al., 2001; CHOU et al., 1999; DUGGAN et al., 1996; EYMARD et al., 1996, 1997; KAWAI et al., 1998]. Neste estudo, apenas um caso apresentou o acometimento da musculatura proximal e distal dos MMII associado à deficiência do complexo SG. Os casos com início na musculatura proximal dos MMSS podem ter apresentado sintomas com pouca repercussão clínica nos MMII, em razão do comprometimento desta musculatura na ocasião da avaliação.

5.5 AVALIAÇÃO DO COMPROMETIMENTO MUSCULAR

Embora as DMC sejam caracterizadas pelo acometimento da musculatura proximal, tem-se observado comprometimento seletivo de grupos musculares nas sarcoglicanopatias (DMC2C-2F), calpainopatia (DMC2A), disferlinopatia (DMC2B) e teletoninopatia (DMC2G) [BECKMANN et al., 1999; BUSHBY, 1999; EYMARD et al., 1996; FARDEAU et al.,

1996a, 1996b; MATSUDA et al., 1999; MOREIRA et al., 2000; URTASUN et al. 1999; WEILER et al., 1996]. Neste estudo, não foi possível identificar qualquer padrão típico do acometimento muscular em virtude da falta de uma descrição mais detalhada. A variabilidade clínica das DMC pode ter ocasionado um maior acometimento da musculatura nos casos com deficiência de calpaína-3.

O acometimento da musculatura facial pode ser ocasionalmente observado em estágios avançados da doença, nas sarcoglicanopatias (DMC2C-2F), na calpainopatia (DMC2A), mais raramente na teletoninopatita (DMC2G) [BEN HAMIDA et al., 1996; FARDEAU et al., 1996a, 1996b; KAWAI et al., 1998; MOREIRA et al., 2000; SHOKEIR & KOBRINSKY, 1976; WEILER et al., 1998]. No presente estudo, observou-se que o comprometimento da musculatura facial ocorreu em estágios intermediários da doença em todos os grupos de imunoidentificação — se bem que, no grupo das sarcoglicanopatias, tenha-se observado apenas nos casos com deficiência específica de γ -SG. O acometimento importante da musculatura facial, no caso de padrão de herança autossômico dominante, faz pensar no diagnóstico diferencial de DFSH. A hipertrofia de panturrilhas — achado comum entre as sarcoglicanopatias — foi observada apenas no grupo com deficiência do complexo SG. Pode, também, ser observada ocasionalmente na fase inicial dos sintomas na calpainopatia (DMC2A) e disferlinopatia (DMC2B), mas não se constatou no presente estudo [BECKMANN et al., 1999; PASSOS-BUENO et al., 1999].

5.6 ENZIMAS MUSCULARES

As alterações na permeabilidade da membrana sarcoplasmática têm sido responsáveis pelas elevações dos níveis séricos das enzimas musculares nas

distrofias musculares [HOFFMAN & CLEMENS, 1996; ZATZ et al., 1991; ZATZ, VAINZOF & PASSOS-BUENO, 2001]. Nas fases pré-clínicas ou iniciais da doença, as elevações são geralmente mais importantes e tendem a apresentar declínio progressivo de acordo com a evolução da doença, em razão da perda progressiva da massa muscular [DINÇER et al., 1997; DUGGAN et al., 1997; EMERY, 1993; FARDEAU et al., 1996a, 1996b; KAWAI et al., 1998; PASSOS-BUENO et al., 1996a, 1999; URTASUN et al., 1998; ZATZ et al., 1991]. As elevações das enzimas musculares são mais discretas nas formas autossômicas dominantes (DMC1A – E) e na teletoninopatia (DMC2G). Nas demais formas recessivas, quase sempre são importantes, embora variações significativas possam ocorrer independentemente dos estágios da doença [EYMARD et al., 1997; MCNALLY et al., 1998; MESSINA et al., 1997; MOREIRA et al., 2000; SPEER et al., 1992, 1999; VAN DER KOOI et al., 1996, 1997]. No presente estudo, a elevação dos níveis séricos das enzimas musculares foi semelhante ao observado na literatura para os grupos com deficiência do complexo SG, disferlina, calpaína-3 e para o caso de herança autossômica dominante. Não foi possível reconhecer os diferentes grupos de imunoidentificação com base na dosagem dos níveis séricos das enzimas musculares.

5.7 ELETROMIOGRAFIA

A perda progressiva das fibras musculares, observada nas distrofias musculares, ocasiona o registro de potenciais ação das unidades motoras (PAUM) de características miopáticas na eletromiografia [DUMITRO, 1995; STALBERG et al., 1996]. Entretanto, PAUM de características neurogênicas também podem ser observados em áreas com formação de agrupamentos ou hipertrofia de fibras, por causa do remodelamento da unidade motora ocasionado pelo processo de necrose

segmentar, que pode deixar porções distais de fibras musculares isoladas da sua junção mioneural [SONOO, 2002; WERNECK, 1991]. O registro de unidades motoras com características neuromiopáticas tem sido observado na calpainopatia (DMC2A), disferlinopatia (DMC2B) e nas sarcoglicanopatias (DMC2C-2F), o que confirma os achados observados neste estudo [BEN HAMIDA et al., 1996; FARDEAU et al., 1996a, 1996b; KAWAI et al., 1998; MAHJNEH et al., 1996].

5.8 HISTOPATOLOGIA

A variação do tamanho das fibras musculares nas distrofias musculares ocorre de forma aleatória, com atrofia e hipertrofia de qualquer tipo histoquímico [WERNECK, 1991]. A intensidade da variação do tamanho das fibras geralmente ocorre de grau leve a moderado na calpainopatia e disferlinopatia, sendo quase sempre mais intensa nas sarcoglicanopatias (DMC2C-2F), teletoninopatia (DMC2G) e na forma DMC2H [BEN HAMIDA, et al., 1983, 1996; BEN HAMIDA, FARDEAU & ATTIA, 1983; BÖNNEMANN et al., 1995; CHOU et al., 1999; DUGGAN & HOFFMAN, 1996; EYMARD et al., 1997; FADIC et al., 1997; FARDEAU et al., 1996a, 1996b; KAWAI et al., 1995, 1998; MCNALLY et al., 2000; MOREIRA et al, 1997; SHOKEIR & KOBRINSKY, 1976]. O predomínio de fibras tipo 1 pode ser mais intenso no grupo das sarcoglicanopatias e na calpainopatia [ANGELINI et al., 1998; BEN HAMIDA et al., 1996; BÖNNEMANN et al., 1996; CHAE et al., 2001; EYMARD et al., 1997; KAWAI et al., 1995; LJUGGREN et al., 1995; MOREIRA et al., 1998]. Neste estudo, esses achados foram semelhantes aos observados na literatura.

A presença de fibras atroficas de formato angulado, caracterizadas nas reações da esterase inespecífica e NADH-TR por coloração escura, ocorre por causa do processo de necrose segmentar das fibras musculares, em que porções distais da fibra muscular passam a ficar isoladas de sua junção mioneural [DUBOWITZ,

1985; WERNECK, 1991]. Também se observou neste estudo a presença de fibras anguladas escuras atróficas nas reações para esterase inespecífica e NADH-TR, mas sem apresentar padrão específico, ocorrendo em todos os grupos de imunoidentificação. O processo de necrose segmentar caracterizou apenas um achado secundário.

É comum a presença de fibras com núcleos centrais nas doenças musculares, não existindo um padrão típico na DMC [BEN HAMIDA et al., 1983; BEN HAMIDA, FARDEAU & ATTIA, 1983; DRISS et al., 2000; EYMARD et al., 1997], como constatado no presente estudo. A formação de grumos nucleares geralmente ocorre no processo de desinervação crônica, mas pode ser ocasionalmente observada nas distrofias musculares em razão do processo de necrose segmentar das fibras musculares, o que explica a presença ocasional deste achado neste estudo [DUBOWITZ, 1985; WERNECK 1991].

Os processos de necrose e regeneração celular são comumente observados nas distrofias musculares, portanto não caracterizam de forma específica as DMC. Neste estudo, também foram observados achados semelhantes [BUSHBY, 1999; CHAE et al., 2001; CHOU et al., 1999; EYMARD et al., 1997; FARDEAU et al., 1996b, KAWAI et al., 1998; URTASUN et al., 1998].

As reações celulares nas distrofias musculares são inespecíficas, geralmente variam de acordo com o grau de necrose muscular, por causa da ativação e liberação do complemento [DUBOWITZ, 1985; WERNECK, 1991]. Na disferlinopatia, pode ocorrer aumento de células inflamatórias, até mesmo em regiões perivasculares, muito semelhante ao observado nas miopatias inflamatórias [BECKMANN et al., 1999; MCNALLY et al., 2000]. O aumento da atividade inflamatória também foi descrito na α -sarcoglicanopatia (DMC2C) [EYMARD et al., 1996]. Observou-se, neste estudo, a presença de infiltrado inflamatório em todos os grupos de

imunoidentificação, traduzindo apenas a sua relação com o processo de necrose celular.

A proliferação do tecido conjuntivo endomisial e adiposo, decorrente da evolução da doença, em geral tende a ser mais intensa nos estágios finais da doença [DUBOWITZ, 1985; WERNECK, 1991]. Neste estudo, tais achados também destacaram o caráter progressivo do processo de necrose das fibras musculares; entretanto, foi um achado inespecífico para os grupos de imunoidentificação.

As alterações estruturais, na maioria das formas autossômicas da DMC, são pouco intensas e inespecíficas. Na teletoninopatia (DMC2G) e na forma DMC2I, descreveu-se a presença de vacúolos centrais marginados [MOREIRA et al., 1997; UDD, KÄÄRIÄNEN & SOMER, 1991; UDD et al., 1993]. Todavia, a presença de vacúolos marginados é um achado inespecífico e tem sido descrita em várias doenças neuromusculares, como observado na miosite com corpos de inclusão citoplasmáticos, atrofia muscular espinhais e neuropatias periféricas [HAUSER et al., 2000; SCOLA, WERNECK & FRANCO, 1996; VAN DER KOOI, et al., 1996]. A formação de vacúolos ocorreu em um pequeno número de casos, não caracterizando qualquer grupo de imunoidentificação.

5.9 IMUNO-HISTOQUÍMICA E WESTERN BLOT

As formas autossômicas recessivas da DMC têm sido diferenciadas das distrofinopatias por meio da imunoidentificação normal da distrofina e se dividem em dois grupos principais: o das sarcoglicanopatias (DMC2C-2E), caracterizado por alterações do complexo SG, e o do grupo com preservação do complexo SG, constituído pela formas DMC2A, 2B, 2G, 2H e 2I.

Nas sarcoglicanopatias (DMC2C-2F), as alterações do complexo SG também podem ocasionar deficiência secundária de distrofina, tornando custoso diferenciá-las das distrofinopatias. Optou-se, portanto, por incluir apenas casos com distrofina normal [VAINZOF et al., 1996]. A imunoidentificação de α -SG tem sido utilizada como principal marcador das sarcoglicanopatias, por causa das alterações estruturais do complexo SG ocasionadas pelas mutações nos genes dessas proteínas [BEN JELLOUN-DELLAGI et al., 1990; HAYASHI et al., 1995]. A deficiência de α -sarcoglicano varia de 9% a 30% dos casos, dependendo da população estudada [CHAE et al., 2001; DUGGAN et al., 1997; HAYASHI et al., 1995; MORANDI et al., 1996; SEWRY et al., 1996; VAN DER KOOI, et al., 1998]. Diante da possibilidade de ocorrer a preservação desse marcador na forma DMC2C, preferiu-se utilizar, no presente estudo, os demais marcadores de imunoidentificação para as proteínas do complexo SG [EYMARD et al., 1997; PASSOS-BUENO et al., 1996a, 1999; ZATZ et al., 1994]. Tal escolha pode ter contribuído para a identificação de um número discretamente maior de casos em relação à literatura [CHAE et al., 2001; DUGGAN et al., 1997; HAYASHI et al., 1995; MORANDI et al., 1996; SEWRY et al., 1996; VAN DER KOOI, et al., 1998]. As alterações do complexo SG devem ser analisadas com cautela, pois comumente não são acompanhadas por mutações dos genes das proteínas do complexo SG, o que abre a possibilidade de ocorrer a deficiência secundária do complexo por mutações ainda desconhecidas. Apenas na forma γ -sarcoglicanopatia (DMC2C) é que a deficiência importante da proteína γ -SG parece ser um achado específico, o que sugere uma forte correlação desta doença com os casos observados neste estudo [BÖNNEMANN et al., 2002; VORGERD et al., 2001]. Na α -sarcoglicanopatia (DMC2D), também pode existir uma maior correlação com o grau de deficiência do α -sarcoglicano. Entretanto, seria necessário quantificar o grau de redução das demais proteínas do complexo SG por meio da técnica de Western Blot. Na β e δ -sarcoglicanopatia (DMC2E e 2F), a

deficiência das proteínas do complexo SG, por ocorrer de maneira mais uniforme, não apresenta um padrão específico [DINÇER et al., 1997; DUGGAN et al., 1997; EYMARD et al., 1997; FANIN et al., 1997; HAYASHI et al., 1995; SEWRY et al., 1996; ZATZ et al., 1994]. Neste estudo, o padrão de deficiência das proteínas do complexo SG foi inespecífico na maioria dos casos; existe, porém, um grau de correlação maior com mutações do complexo SG quanto àqueles com deficiência importante [DUGGAN et al., 1996]. Desta forma, os casos com redução difusa poderiam estar correlacionados a outros tipos de mutações, ainda desconhecidas, que ocasionassem a deficiência secundária das proteínas do complexo SG, a exemplo do observado na forma DMC2I, em que existe a deficiência secundária de α -dístroglicano [BROCKINGTON et al., 2001].

No grupo das formas com preservação do complexo SG, pode-se identificar a calpainopatia (DMC2A), disferlinopatia (DMC2B), teletoninopatia (DMC2G) e as formas DMC2I e DMC2J, utilizando-se marcadores imunológicos. Neste estudo, os casos com preservação do complexo SG foram inicialmente pesquisados para deficiência de disferlina.

A imunoidentificação da disferlina, por meio da imuno-histoquímica, revelou ser uma técnica cujos resultados são de difícil interpretação, em razão da fraca intensidade da fluorescência, pois não permite uma melhor graduação desta [JOHNSON, 2001]. A disferlinopatia vem ocorrendo entre 5% a 55% dos casos de DMC, com preservação do complexo SG [DINÇER et al., 1996; DUGGAN et al., 1997; FANIN et al., 1997; PASSOS-BUENO et al., 1999]. A deficiência secundária de disferlina ainda é desconhecida e isto fez com que os casos observados neste estudo apresentassem uma forte correlação com a doença. Embora o comprometimento da musculatura distal seja mais freqüente na disferlinopatia (DMC2B), o mesmo não foi observado neste estudo, talvez em consequência do tamanho da amostra [FANIN et al., 2001].

A imunoidentificação da calpaína-3, por ser uma enzima citoplasmática, somente é detectada através da técnica de Western Blot [ANDERSON 1999, 2001]. A deficiência da calpaína-3 tem sido freqüentemente correlacionada com mutações do próprio gene da proteína. Entretanto, reduções secundárias também foram observadas nos casos com mutações no gene da disferlina (DMC2B) e titina (DMC2J). Outras alterações também podem ser ocasionadas graças ao tempo de armazenamento da biópsia muscular, à quantidade de proteína presente e ao processo de homogeneização do tecido muscular [ANDERSON, 2001]. No presente estudo, a deficiência da calpaína-3 foi observada em 8,9% dos casos. Consideraram-se apenas os casos com ausência da banda da calpaína-3, tendo em vista a dificuldade em caracterizar o grau de redução, por causa da presença de contaminantes e alterações no gradiente do gel da eletroforese [ANDERSON et al., 2001]. A falta de tecido muscular impossibilitou a realização de um novo exame para a correção desse problema, sendo possível haver casos com redução da calpaína-3 não diagnosticados neste estudo. As mutações no gene da calpaína-3 têm sido observadas entre 9% a 40% dos casos com DMC [CHOU et al., 1999; MINAMI et al., 1999; PASSOS-BUENO et al., 1996a, 1999]; estima-se, porém, que aproximadamente 10% das mutações do gene da calpaína-3 não sejam detectadas pela técnicas moleculares atualmente empregadas [FANIN et al., 2001].

5.10 COMENTÁRIOS FINAIS

O diagnóstico da DMC tem-se mostrado uma tarefa desafiadora, desde que Walton e Natrass o introduziram como nova entidade clínica, em 1954. A sobreposição dos achados clínicos, a dificuldade na caracterização do padrão

autossômico dominante ou recessivo e a falta de achados laboratoriais específicos fazem que a maioria dos casos de DMC não tenham um fenótipo típico associado. Por outro lado, o grande número de genes e diferentes tipos de mutações envolvidos na DMC têm dificultado a identificação dos defeitos genéticos, bem como a correlação da mutação com o fenótipo. A utilização da imunoidentificação de proteínas da biópsia muscular por meio das técnicas de imuno-histoquímica e Western Blot vem proporcionando uma melhor aproximação diagnóstica das formas autossômicas recessivas e dominantes da distrofia muscular de cinturas, mesmo que estas ainda não garantam a identificação do defeito genético primário [ANDERSON, 1996; DINÇER et al., 1997; FANIN et al., 2001; PASSOS-BUENO et al., 1991; 1999; RICHARD et al., 1999a].

6 CONCLUSÕES

6.1 CONFIRMATÓRIAS

- a) Existe importante variação clínica da distrofia muscular de cinturas.
- b) A disferlinopatia teve início mais tardio.
- c) A análise do histórico familiar não caracterizou nenhum grupo de imunoidentificação.
- d) A hipertrofia de panturrilhas foi observada unicamente nas sarcoglicanopatias.
- e) A dosagem dos níveis séricos das enzimas musculares não caracterizou nenhum grupo de imunoidentificação.
- f) Os dados da eletromiografia e biópsia muscular não permitiram diferenciar os grupos de imunoidentificação.
- g) A deficiência na imunoidentificação das proteínas α , β , γ e δ -sarcoglicano permitiu classificar os casos com deficiência do complexo-SG.
- h) A deficiência específica na imunoidentificação da proteína γ -sarcoglicano permitiu classificar os casos na γ -sarcoglicanopatia (DMC2C).
- i) A deficiência de disferlina permitiu classificar os casos na disferlinopatia (DMC2B).
- j) A deficiência de calpaína-3 permitiu classificar os casos na calpainopatia (DMC2A).

6.2 ORIGINAIS

- a) A presença isolada de alterações desinervatórias na eletromiografia ou biópsia muscular não deve ser utilizada como critério de exclusão da distrofia muscular de cinturas.
- b) A deficiência de disferlina ocorreu mais no sexo feminino.
- c) A deficiência de calpaína-3 ocorreu mais no sexo masculino e teve maior comprometimento da força muscular.
- d) A deficiência do complexo sarcoglicano foi mais freqüentes, seguidas da disferlina e calpaína-3.

REFERÊNCIAS

- Anderson LVB. Optimized protein diagnosis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 1996;6:443-446.
- Anderson LVB, Davison K. Multiplex western blot system for the analysis of muscular dystrophy proteins. *Am J Pathol* 1999;154:1017-1022.
- Anderson LVB, Davison K, Moss JA, Young C, Cullen MJ, Walsh J, Johnson MA, Bashir R, Britton S, Keers S, Argov Z, Mahjneh I, Fougerousse F, Beckmann JS, Bushby KMD. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Hum Mol Genet* 1999;5:855-861.
- Anderson LVB, Harrison RM, Pogue R, Vafiadaki E, Pollitt C, Davison K, Moss JA, Keers S, Pyle A, Shaw PJ, Mahjneh I, Argov Z, Greenberg CR, Wrogemann K, Bertorini T, Goebel HH, Beckmann JS, Bashir R, Bushby KMD. Secondary reduction in calpain-3 expression in patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies). *Neuromuscul Disord* 2000;10:553-559.
- Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of muscular dystrophy proteins. In: Bushby KMD and Anderson LVB. *Muscular dystrophy methods and protocols*. New Jersey: Humana Press, 2001. p.369-386.
- Angelini C, Fanin M, Menegazzo E, Freda MP, Duggan DJ, Hoffman EP. Homozygous α -sarcoglycan mutation in two siblings: one asymptomatic and one steroid-responsive mild limb-girdle muscular dystrophy patient. *Muscle Nerve* 1998;21:769-775.
- Aoki M, Liu J, Richard I, Bashir R, Britton S, Keers SM, Oeltjen J, Brown HEV, Marchand S, Bourg N, Beley C, McKenna-Yasek D, Arahata K, Bohlega S, Cupler E, Illa I, Mahjneh I, Barohn RJ, Urtizbera JA, Fardeau M, Amato A, Angelini C, Bushby K, Beckmann JS, Brown RH. Genomic organization of the dysferlin gene and novel mutations in Miyoshi myopathy. *Neurology* 2001;57:271-278.
- Arahata K, Ishiura S, Ishiguro T, Tsukahara T, Suhara Y, Eguchi C, Ishiara T, Nonaka I, Ozawa E, Sugita H. Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide. *Nature* 1988;333:861-863.
- Arahata K, Ishihara T, Kamakura K, Tsukahara T, Ishiura S, Baba C, Matsumoto T, Nonaka I, Sugita H. Mosaic expression of dystrophin in symptomatic carriers of Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 1989;320:138-142.
- Arahata K, Ishii H, Hayashi YK. Congenital muscular dystrophies. *Cur Opin Neurol* 1995;8:385-390.

- Argov Z, Sadeh M, Mazor K, Soffer D, Kahana E, Eisenberg I, Mitrani-Rosenbaum S, Richard I, Beckmann J, Keers S, Ashir R, Bushby K, Rosenmann H. Muscular dystrophy due to dysferlin deficiency in Libyan Jews – clinical and genetic features. *Brain* 2000;123:1229-1237.
- Arikawa E, Ishihara T, Nonaka I, Sugita H, Arahata K. Immunocytochemical analysis of dystrophin in congenital muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 1991;105:79-87.
- Bacon PA, Smith K. Familial muscular dystrophy of late onset. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1971;34:93-97.
- Bashir R, Strachan T, Keers S, Stephenson A, Mahjneh I, Marconi G, Nashef L, Bushby KMD. A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 2p. *Hum Mol Genet* 1994;3:455-457.
- Bashir R, Keers S, Strachan T, Passos-Bueno R, Zatz M, Weissenbach J, Le Paslier D, Meisler M, Bushby K. Genetic and physical mapping at the limb-girdle muscular dystrophy locus (LGMD2B) on chromosome 2p. *Genomics* 1996;33:46-52.
- Baumbach LL, Chamberlain JS, Ward PA, Farwel NJ, Caskey CT. Molecular and clinical correlation of deletions leading to Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Neurology* 1989;39:465-474.
- Beckmann JS, Bushby K. Advances in the molecular genetics of the limb-girdle type of autosomal recessive muscular dystrophy. *Cur Opin Neurol* 1996;9:389-393.
- Beckmann JS, Richard I, Broux O, Fougousse F, Allamand V, Chiannilkuchai N, Lim LE, Duclos F, Bourg N, Brenguier L, Pasturaud P, Quétier F, Roudaut C, Sunada Y, Meyer J, Dinçer P, Lefranc G, Merlini L, Topaloglu H, Tomé FMS, Cohen D, Jackson CE, Campbell KP, Fardeau M. Identification of muscle-specific calpain and beta-sarcoglycan genes in progressive autosomal recessive muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord* 1996;6:455-462.
- Beckmann JS, Brown H, Muntoni F, Urtizberea A, Bonnemann C, Bushby KMD. 66th67th ENMC sponsored international workshop: the limb-girdle muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord* 1999;9:436-445.
- Bejaoui K, Hirabayashi K, Hentati F, Haines JL, Ben-Hamida C, Belal S, Miller RG. Linkage of Miyoshi myopathy (distal autosomal recessive muscular dystrophy) locus to chromosome 2p12-14. *Neurology* 1995;45: 768-772.
- Ben Hamida M, Marrakchi D. Dystrophie musculaire progressive de type Duchenne en Tunisie – A propos de 13 familles et 31 cas d'une forme en apparence récessive autosomique. *J Génét Hum* 1980a;28:1-9.
- Ben Hamida M, Marrakchi D. Etude génétique des myopathies en Tunisie. *Union Med Can* 1980b;109:1609-1628.

- Ben Hamida M, Attia N, Chabouni, Fardeau M. Une myopathie proximale et sévère de l'enfance récessive autosomique, fréquente en Tunisie. *Rev Neurol (Paris)* 1983;139:289-297.
- Ben Hamida M, Fardeau M, Attia N. Severe childhood muscular dystrophy affecting both sexes and frequent in Tunisia. *Muscle Nerve* 1983;6:469-480.
- Ben Hamida M, Ben Hamida C, Zouari M, Belal S, Hentati F. Limb-girdle muscular dystrophy 2C: clinical aspects. *Neuromuscul Disord* 1996;8:493-494.
- Ben Jelloun-Dellagi S, Chaffey P, Ben Hamida CH, Tome F, Colinh H, Dellagi K, Kaplan JC, Fardeau M, Ben Hamida M. Presence of normal dystrophin in Tunisian severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *Neurology* 1990;40:1903.
- Boddie HG, Stewart-Wynne EG. Quadriceps myopathy – entity or syndrome? *Arch Neurol* 1974;31:60-62.
- Bonilla E, Samitt CE, Miranda AF, Hays AF, Salviati G, Dimauro S, Kunkel LM, Hoffman EP, Rowland LP. Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell* 1988a;54:447-452.
- Bonilla E, Schimdt B, Samitt CE, Miranda AF, Hays AP, de Oliveira AB, Chang HW, Servidei S, Ricci E, Younger DS, Dimauro S. Normal and dystrophin deficient muscle fibers in carriers of the gene for Duchenne muscular dystrophy. *Am J Pathol* 1988b;133:440-445.
- Bönnemann CG, Modi R, Noguchi S, Mizuno Y, Yoshida M, Gussoni E, McNally EM, Duggan DJ, Angelini C, Hoffman EP, Ozawa E, Kunkel LM. Beta sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nature* 1995;11:266-273.
- Bönnemann CG, Passos-Bueno MR, McNally EM, Vainzof M, de Sá Moreira E, Marie SK, Pavanello RCM, Noguchi S, Ozawa E, Zatz M, Kunkel LM . Genomic screening for beta-sarcoglycan gene mutations: missense mutations may cause severe limb-girdle muscular dystrophy type 2E (LGMD 2E). *Hum Mol Genet* 1996;5:1956-1961.
- Bönnemann CG, Wong J, Jones KJ, Lidov HGW, Feener CA, Shapiro F, Darras BT, Kunkel LM, North KN. Primary γ -sarcoglycanopathy (LGMD2C): broadening of the mutational spectrum guided by the immunohistochemical profile. *Neuromuscul Disord* 2002;12:273-280.
- Brockington M, Blake DJ, Prandini P, Brown SC, Torelli S, Benson MA, Ponting CP, Estournet B, Romero NB, Mercuri E, Voit T, Sewry CA, Guicheney P, Muntoni F. Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) cause a form of congenital muscular dystrophy with secondary laminin α 2 deficiency and abnormal glycosylation of α -dystroglycan. *Am J Hum Genet* 2001a;69:1198-1209.

- Brockington M, Yuva Y, Prandini P, Brown SC, Torelli S, Benson MA, Herrmann R, Anderson LVB, Bashir R, Burgunder JM, Fallet S, Romero N, Fardeau M, Straub V, Storey G, Pollitt C, Richard I, Sewry CA, Bushby K, Voit T, Blake DJ, Muntoni F. Mutation in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Hum Mol Genet* 2001b;10:2851-2859.
- Brockington M, Blake DJ, Torrelli S, Brown SC, Muntoni F. The gene for a novel glycosyltransferase is mutated in congenital muscular dystrophy MDC1C and limb girdle muscular dystrophy 2I. *Nueromuscul Disord* 2002;12:233-234
- Brodensteiner JB, Engel AG. Intracellular calcium accumulation in Duchenne dystrophy and other myopathies: A study of 567.000 muscle fibers in 114 biopsies. *Neurology* 1978;28:439-446.
- Brooke MH, Fenichel GM, Griggs RC, Mendell JR, Moxley R, Florence J, King WM, Pandya S, Robison J, Schierbecker J, Signore L, Miller JP, Gilder BF, Kaiser KK, Mandel S, Arfken C. Duchenne muscular dystrophy: patterns of clinical progression and effects of supportive therapy. *Neurology* 1989;39:475-481.
- Brown SC, Muntoni F, Sewry A. Non-sarcolemmal muscular dystrophy. *Brain Pathol* 2001.
- Bulman DE, Murphy EG, Zubrzycka-Gaarn EE, Worton RG, Ray PN. Differentiation of Duchenne and Becker muscular dystrophy phenotypes with amino-and carboxyl-terminal antiserum specific for dystrophin. *Am J Hum Genet* 1991;48:295-304.
- Bushby KMD, Bakker E, Beckmann J, Ben Hamida M, Chamberlain J, Clarke A, Dubowitz V, Emery A, Fardeau M, Gardner-Medwin D, Grimm T, Hausmanowa-Petrusewicz I, Jackson C, Jacobsen J, Kaplan JC, Kress W, Mahjneh I, Marconi G, Martin J, Mechler F, Nashef L, Nicholson L, Passos-Bueno MR, Somer H, Speer M, Stromme P, Suthers G, Tomé F, Udd B, Van Ommen GJ, de Visser M, Viot T, Wallgren-Pettersson C, Zatz M. Diagnostic criteria for the limb-girdle muscular dystrophy: report of the ENMC consortium on lib-girdle dystrophies. *Neuromuscul Disord* 1995a;5:71-74.
- Bushby KMD, Beckmann JS. The limb-girdle muscular dystrophies – proposal for a new nomenclature. *Neuromuscul Disord* 1995b;5:337-343.
- Bushby KMD. Towards the classification of the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 1996;6:439-441.
- Bushby KMD, Anderson LV, Pollitt C, Naom I, Muntoni F, Bindoff L. Abnormal merosin in adults. A new form of late onset muscular dystrophy not linked to chromosome 6q2. *Brain* 1998;121:581-588.
- Bushby KMD. The limb-girdle muscular dystrophies – multiple genes, multiple mechanisms. *Hum Mol Genet* 1999;10:1875-1882.

- Bushby KMD, Beckmann JS. The 105th ENMC sponsored workshop: pathogenesis in the non-sarcoglycan limb-girdle muscular dystrophies, Naarden, April 12-14, 2002. *Neuromuscul Disorder* 2003;80-90.
- Campbell KP, Khal SD. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature* 1989;338:259-262.
- Campbell KP. Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 1995a;80:675-679.
- Campbell KP. Adhalin gene mutations and autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy. *Neurology* 1995b;38:353-354.
- Cartier L, Hernández JE, Stuardo A, Gonzáles J, Villagra R. Quadriceps myopathy: a type of late focal dystrophy in a case. *Rev Med Chil* 1995;123:81-84.
- Chae J, Minami N, Jin Y, Nakagawa M, Murayama, Igarashi F, Nonaka I. Calpain 3 gene mutations: genetic and clinical-pathologic findings in limb-girdle muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 2001;11:547-555.
- Chelly J, Kaplan JC, Maire P, Gautron S, Kahn A. Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues. *Nature* 1988;333:858-860.
- Chou FL, Angelini C, Daentl D, Garcia C, Greco C, Hausmanowa-Petrusewicz I, Fidzianska A, Wessel H, Hoffman EP. Calpain III mutation analysis of a heterogeneous limb-girdle muscular dystrophy population. *Neurology* 1999;52:1015-1020.
- Clemens PR, Ward PA, Caskey CT, Bulman DE, Fenwick RG. Premature chain termination mutation causing Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 1992;42:1775-1782.
- Davis DB, Delmonte AJ, Ly CT, McNally EM. Myoferlin, a candidate gene and potential modifier of muscular dystrophy. *Hum Mol Gen* 2000;9:217-226.
- Dinçer P, Leturcq F, Richard I, Piccolo F, Yalnizoglu D, Tome C, Akçören Z, Broux O, Deburgrave N, Brenguier L, Roudaut C, Urtizberea JA, Jung D, tan E, Jeanpierre M, Campbell KP, Kaplan JC, Beckmann JS, Topaloglu H. A biochemical, genetic, and clinical survey of autosomal recessive limb girdle muscular dystrophies in Turkey. *Ann Neurol* 1997;42:222-229.
- Driss A, Amouri C, Hamida CB, Souilem N, Gouider-Khouja N, Hamida, M. B, Hentati F. A new locus for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in a large consanguineous Tunisian family maps to chromosome 19q13.3. *Neuromuscul Disord* 2000;10: 240-246.
- Dubowitz V. *Muscle biopsy – a practical approach*. London: Bailliure Tindall, 1985.

- Dubowitz V. Workshop report: 22nd ENMC sponsored workshop on congenital muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 1994;4:75-81.
- Duchenne GBA. Recherches sur la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique ou paralysie myosclérosique. *Arch Gen Med* 1868;11:5-25,179-209,305-321,552-588.
- Duclos F, Broux O, Bourg N, Straub V, Feldman GL, Sunada Y et al. β -sarcoglycan: genomic analysis and identification of a novel missense mutation in the LGMD2E. *Neuromuscul Disord* 1998;8:30-38.
- Duggan DJ, Hoffman EP. Autosomal recessive muscular dystrophy and mutations of the sarcoglycan complex. *Neuromuscul Disord* 1996;6:475-482.
- Duggan DJ, Gorospe R, Fanin M, Hoffman EP, Angelini C. Mutations in the sarcoglycan genes in patients with myopathy. *N Engl J Med* 1997;336:618-624.
- Dumitro D. Electrodiagnostic medicine. In: Dumitro D. *Needle electromyography*. 2nd ed. Philadelphia: Hanley & Belfus, 1995. p.22-26,211-280.
- Emery AEH. *Duchenne muscular dystrophy* 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 1993, p.45-107.
- Engel AG. Duchenne dystrophy. In Engel AG, Banker BQ. *Myology*. New York; McGraw-Hill, Inc. 1986 p.1185-1240.
- Engel AG, Shields RW. Limb-girdle muscular dystrophy. In Engel AG, Banker BQ. *Myology*. New York; McGraw-Hill, Inc. 1986 p.1349-1366.
- Engelman JA, Zhang X, Galbiati F, Volnté D, Sotgia F, Pestell RG, Minetti C, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MO. Molecular genetics of the caveolin gene family: implication for human cancers, diabetes, Alzheimer diseases and muscular dystrophy. *Am J Hum Gen* 1998;63:1578-1587.
- England SB, Nicholson LV, Johnson MA, Forrest SM, Love DR, Zubrzycka-Gaarn EE, Bulman DE, Harris JB, Davies KE. Very mild muscular dystrophy associated with deletion of 46% of dystrophin. *Nature* 1989;343:180-182.
- Erb WH. Ueber die juvenil Form der progressiven Muskelatrophie und ihre Beziehungen zur sogenannten pseudohypertrophie der muskeln. *Dt Arch Klin Med* 1891;34:467-519.
- Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, Gaver MG, Campbell KP. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* 1990;345:315-319.
- Ervasti JM, Kahl SD, Campbell KP. Purification of dystrophin from skeletal muscle. *J Biol Chem* 1991;266:9161-9165.

- Ervasti JM, Campbell KP. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 1991;66:1121-1131.
- Espir ML, Matthews WB. Hereditary quadriceps myopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1973;36:1041-105.
- Eymard B, Fardeau M, Mignard C, Tomé FMS, Richard I, Beckmann JS. Chromosome 15-linked limb-girdle muscular dystrophy: clinical phenotypes in Reunion Island and French metropolitan communities. *Neuromuscul Disord* 1996;6:447-453.
- Eymard B, Romero NB, Leturcq F, Piccolo F, Carrie A, Jeanpierre M, Collin H, Deburgrave N, Azibi K, Chaouch M, Merlini L, Thémar-Noël C, Penisson I, Mayer M, Tanguy O, Campbell KP, Kaplan JC, Tomé FMS, Fardeau M. Primary adhalinopathy (α -sarcoglycanopathy): clinical, pathologic, and genetic correlation in 20 patients with autosomal recessive muscular dystrophy. *Neurology* 1997;48:1227-1234.
- Fadic R, Waclawik AJ, Lewandoski PJ, Lotz BP. Muscle pathology and clinical features of the sarcolemmopathies. *Pediatr Neurol* 1997;16:79-82.
- Fanin M, Duggan DJ, Mostacciuolo ML, Martinello F, Freda MP, Sorarù G, Trevisan CP, Hoffman EP, Angelini C. Genetic epidemiology of muscular dystrophies resulting from sarcoglycan gene mutations. *J Med Genet* 1997;34:973-977.
- Fanin M, Pegoraro E, Matsuda-Asada C, Brown RH, Angelini C. Calpain-3 and dysferlin protein screening in patients with limb-girdle muscular dystrophy. *Neurology* 2001;56:660-665.
- Fardeau M, Eymard B, Mignard B, Tomé FMS, Richard I, Beckmann JS. Chromosome 15-linked limb-girdle muscular dystrophy: clinical phenotypes in Reunion Island and French metropolitan communities. *Neuromuscul Disord* 1996a;6:447-453.
- Fardeau M, Hillaire D, Mignard C, Feingold N, Mignard D, de Ubeda B, Collin H, Tomé FMS, Richard I, Beckmann JS. Juvenil limb-girdle muscular dystrophy – clinical, histopathological and genetic data from a small community living in Reunion Island. *Brain* 1996b;119:295-308.
- Finelli PF. Quadriceps myopathy in two brothers: rare familial myopathy confirmed by muscle biopsy. *R I Med J* 1979;62:125-9.
- Francke U, Ochs HD, De Martinville B, Giacalone J, Lindgren V, Distéche C, Pagon RA, Hofker MH, Van Ommen GJ, Person PL, Wedegwood RJ. Minor XP21 chromosome deletion in a male associated with expression of Duchenne muscular dystrophy, chronic granulomatous disease, retinitis pigmentosa, and McLeod syndrome. *Am J Hum Genet* 1985;37:250-267.

- Gillard EF, Chamberlain JS, Murphy EG, Duff CL, Smith B, Burghes AHM, Thompson MW, Sutherland J, Oss I, Bodrug SE, Klamut HJ, Ray PN, Worton RG. Molecular and phenotypic analysis of patients with deletions within the deletion-rich region of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene. *Am J Hum Genet* 1989;45:507-520.
- Goonewardena P, Gustavson KH, Gamstorp I, Lundstrom NR, Pettersson U. A new type of muscular dystrophy in two brothers: analysis by use of DNA probes suggests autosomal recessive inheritance. *Clin Genet* 1988;34:299-305.
- Gowers WR. Pseudo-hypertrophic muscular paralysis. *Lancet* 1879a;5:1-2,
- Gowers WR. Pseudo-hypertrophic muscular paralysis. *Lancet* 1879b;12:37-29.
- Gowers WR. Pseudo-hypertrophic muscular paralysis. *Lancet* 1879c;19:73-75.
- Gowers WR. Pseudo-hypertrophic muscular paralysis. *Lancet* 1879d;26:113-116.
- Greenstein RM, Reardon MP, Chan TS. An X/ autosomal translocation in a girl with Duchenne muscular dystrophy (DMD): Evidence for DMD gene localization. *Ped Res* 1977;11:457.
- Greenstein RM, Reardon MP, Chan TS, Middleton AB, Mulivor RA, Greene AE, Corriel LL. An (X;11) translocation in a girl with Duchenne muscular dystrophy. Repository identification no GM 1695. *Cytogenet Cell Genet* 1980;27:268.
- Guedson JL, Ternyck T, Avrameas S, The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem* 1979;27:1131-1139.
- Haravuori H, Vihola A, Straub V, Auranen M, Richard I, Marchand S, Viot T, Labeit S, Somer H, Pelton L, Beckmann JS, Udd B. Secondary calpain3 deficiency in 2q-linked muscular dystrophy – Titin is the candidate gene. *Neurology* 2001;56:869-877.
- Hauser MA, Horrigan SK, Salamikangas P, Torian UM, Viles KD, Dancel R, Tim RW, Taivainen A, Bartolini L, Gilchrist JM, Stajich JM, Gaskell PC, Gilbert JR, Vance JM, Pericak-Vance MA, Carpen O, Westbrook CA, Speer MC. Myotilin is mutated in limb-girdle muscular dystrophy 1A. *Hum Mol Genet* 2000;9:2141-2147.
- Hayashi YK, Mizuto Y, Yoshida M, Nonaka I, Ozawa E, Arahata K. The frequency of patients with 50-kd dystrophin-associated glycoprotein (50DAG or adhalin) deficiency in a muscular dystrophy patient population in Japan: immunocytochemical analysis of 50DAG, 43DAG, dystrophin, and utrophin. *Neurology* 1995;45:551-554.
- Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987;51:919-928.

- Hoffman EP, Fischbeck K, Brown RH, Johnson M, Medori R, Loike JD, Harris JB, Waterston R, Brooke M, Specht L, Kupsky W, Chamberlain J, Caskey T, Shapiro F, Kunkel LM. Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 1988;318:1363-1668.
- Hoffman EP, Garcia CA, Chamberlain JS, Angelini C, Lupski JR, Fenwick R. Is the carboxyl-terminus of dystrophin required for membrane association? A novel, severe case of Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 1991;30:605-610.
- Hoffman EP, Arahata K, Minetti C, Bonilla E, Rowland LP. Dystrophinopathy in isolated cases of myopathy in females. *Neurology* 1992;42:967-975.
- Hoffman EP, Clemens PR. Hyperckmic, proximal muscular dystrophies and the dystrophin membrane cytoskeleton, including dystrophinopathies, sarcoglycanopathies, and merosinopathies. *Cur Opin Rheumatol* 1996;8:528-538.
- Hu X, Ray PN, Murphy EG, Thompson MW, Worton RG. Duplicational mutation at the Duchenne muscular dystrophy locus: its frequency, distribution, origin, and phenotype-genotype correlation. *Am J Hum Genet* 1990;46:682-695.
- Hurwitz LJ, Carson NAJ, Allen IV, Fanin TF, Lyttle JA, Neill DW. Clinical, biochemical and histopathological findings in a family with muscular dystrophy. *Brain*. 1967;90:799-816.
- Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extra cellular matrix. *Nature* 1992;355:696-702.
- Ilarioshkin SN, Ivanova-Smolenskaya IA, Greenberg CR, Nylén E, Sukhorukov VS, Poleshchuk VV, Markova ED, Wrogemann K. Identical dysferlin mutation in limb-girdle muscular dystrophy type 2B and distal myopathy. *Neurology* 2000;54:1931-1933.
- Jackson CE, Strehler DA. Limb-girdle muscular dystrophy: clinical manifestations and detection of preclinical disease. *Pediatrics*. 1968 Feb;41:495-502.
- James M, Campbell KP. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 1991;66:1121-1131.
- Jia Z, Petronecitch V, Wong A, Moldoveanu T, Davies PL, ElceJS, Beckmann JS. Mutations in calpain 3 associated with limb-girdle muscular dystrophy: analysis by molecular modeling and mutation in m-calpain. *Biophysical J* 2001;80:2590-2596.
- Johnson MA. Immunocytochemical Analysis. In: Bushby KMD and Anderson LVB. *Muscular dystrophy methods and protocols*. New Jersey: Humana Press, 2001. p.339-368.

- Jung D, Yang B, Meyer J, Chamberlain J, Campbell KP. Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on β -dystroglycan. *J Biol Chem* 1995;270:27305-27309.
- Jung D, Duclos F, Apostol B, Straub V, Lee JC, Allamand V, vanzke DP, Sunada Y, Moomaw CR, Leveille CJ, Slaughter CA, Crwaford TO, McPherson JD, Campbell KP. Characterization of delta-sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy. *J Biol Chem* 1996;271:32321-32329.
- Kakulas BA. The differential diagnosis of the human dystrophinopathies and related disorders. *Cur Opin Neurol* 1996;9:380-388.
- Kamen G, Caldwell GE. Physiology and interpretation of the electromyogram. *J Clin Neurophysiol* 1996;13:366-384.
- Kawai H, Akaike M, Endo T, Adachi K, Inui T, Mitsui, Kashiwagi S, Fujiwara T, Okuno S, Shin S, Mioyshi K, Campbell KP, Yamada H, Shimizu T, Matsumura K, Saito S. Adhalin gene mutations in patients with autosomal recessive childhood onset muscular dystrophy with adhalin deficiency. *J Clin Invest* 1995;96:1202-1207.
- Kawai H, Akaike M, Kunishige M, Inui T, Adachi K, Kimura C, Kawajiri M, Nishida Y, Endo I, Kashiwagi S, Nishino H, Fujiwara T, Okuno S, Roudaut C, Richard I, Beckmann JS, Miyoshi K, Matsumoto T. Clinical, pathological, and genetic features of limb-girdle muscular dystrophy type 2A with new calpain 3 gene mutations in seven patients from three Japanese families. *Muscle Nerve* 1998;21:1493-1501.
- Kim YJ, Chung YK, Fisk JR. Myopathy limited to the quadriceps and gastrocnemius muscles occurring in three brothers. *South Med J*. 1979;72:429-432.
- Kitaguchi T, Matsubara Shiro, Sato M, Miyamoto K, Hirai S, Schwartz K, Bonne G. A missense mutation in the exon 8 of lamin A/C gene in a Japanese case of autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy and cardiac conduction block. *Neuromuscul Disord* 2001;11:542-546.
- Koenig M, Hoffmann EP, Beterlson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987;50:509-517.
- Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 1988;53:219-228.
- Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T, Meng G, Müller CR, Lindlöf M, Kaariainen H, de la Chapelle A, Kiuru A, Savontaus ML, Gilgenkrantz H, Récan D, Chelly J, Kaplan JC, Covone AE, Archidiacono N,

- Romeo G, Liecthi-Gallati S, Schneider V, Braga S, Moser H, Darras BT, Murphy P, Francke U, Chen D, Morgan G, Denton M, Greenberg CR, van Ommen GJB, Kunkel LM. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet* 1989;45:498-506.
- Kunkel LM, Monaco AP, Middlesworth W, Ochs HD, Latt AS. Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of male patient with an X chromosome deletion. *Proc Natl Acad Sci* 1985;82:4778-4782.
- Labeit S, Kolmer B. Titins: giant proteins of muscle ultra structure and elasticity. *Science* 1995;270:293-296.
- Lim LE, Duclos F, Broux O, Bourg N, Sunada Y, Allamand V, Meyer J, Richard I, Moomaw C, Slaughter C, Tomé FMS, Fardeau M, Jackson CE, Bexkmann JS, Campbell KP. Beta- sarcoglycan: characterization and role in limb- girdle muscular dystrophy linked to 4q12. *Nat Genet* 1995;11:257-265.
- Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C, et al. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 1998;20:31-36.
- Ljunggren A, Duggan DJ, McNally E, Boylan KB, Gama CH, Kunkel LM, Hoffman EP. Primary adhalin deficiency as a cause of muscular dystrophy in patients with normal dystrophin. *Ann Neurol* 1995;38:367-372.
- Lopes AP. *Probabilidades & Estatística*. Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso, 1999.
- Mahjneh I, Bushby K, Pizzi A, Bashir R, Marconi G. Limb-girdle muscular dystrophy: a follow-up study of 79 patients. *Acta Neurol Scand* 1996;94:177-189.
- Mahjneh I, Marconi G, Bushby, Anderson LVB, Tolvanen-Mahjneh H, Somer H. Dysferlinopathy (LGMD2B): a 23-year follow-up study of 10 patients homozygous for frameshifting dysferlin mutations. *Neuromuscul Disord* 2001;11:20-26.
- Markan ON, North RR, D'Agostini A, Daly DD. Benign sex-linked muscular dystrophy. Clinical and pathological features. *Neurology* 1969;19:617-633.
- Markesbery WR, Griggs RC, Leach RP, Laphan LW. Late onset hereditary distal myopathy. *Neurology* 1974;23:127-134.
- Matsuda C, Aoki M, Hayashi, Arahata K, Brown RH. Dysferlin is a surface membrane-associated protein that is absent in Miyoshi myopathy. *Neurology* 1999;53:1119-1122.
- Matsumura K, Tomé FMS, Collin Huguette, Azibi Kemal, Chaouch M, Kaplan JC, Fardeau M, Campbell KP. Deficiency of the 50K dystrophin-associated

- glycoprotein in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *Nature* 1992;359:320-322.
- Matsumura K, Campbell KP. Deficiency of dystrophin-associated proteins: a common mechanism leading to muscle cell necrosis in severe childhood muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord* 1993;3:109-118.
- Matsumura K, Ervasti JM, Ohlendleck K, Khal SD, Campbell KP. Association of dystrophin-related protein with dystrophin-associated proteins in mdx mouse muscle. *Nature* 1993;360:588-590.
- Mayans O, van der Ven PF, Wilm M, Mues A, Young P, Wilmanns M, Gautel M. Structural basis for activation of the titin kinase domain during myofibrillogenesis. *Nature* 1998;29:846-847.
- McNally EM, Duggan D, Gorospe JR, Bönnemann CG, Fanin M, Pegoraro E, Lidov HGW, Noguchi S, Ozawa E, Finkel RS, Cruse RP, Angelini C, Kunkel LM, Hoffman EP. Mutations that disrupt the carboxyl-terminus of γ -sarcoglycan cause muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 1996a;5:1841-1847.
- McNally EM, Passos-Bueno MR, Bönnemann CG, Vainzof M, Moreira ES, Lidov HGW, Othmane KB, Denton PH, Vance JM, Zatz M, Kunkel LM. Mild and severe muscular dystrophy caused by a single gamma-sarcoglycan mutation. *Am J Hum Genet* 1996b;59:1040-1047.
- McNally EM, Ly CT, Kunkel LM. Human ϵ -sarcoglycan is highly related to α -sarcoglycan (adhalin), the limb girdle muscular dystrophy 2D gene. *FEBS* 1998;422:27-32.
- McNally EM, Moreira ES, Duggan DJ, Bönnemann CG, Lisanti MP, Lidov HGW, Vainzof M, Passos-Bueno MR, Hoffman EP, Zatz M, Kunkel LM. Caveolin-3 in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 1998;7:871-877.
- McNally EM, Chantal TL, Rosenmann H, Rosenbaum SM, Jiang W, Anderson LVB, Soffer D, Argov Z. Splicing mutation in dysferlin produces limb-girdle muscular dystrophy with inflammation. *Am J Med Genet* 2000;91:305-312.
- Medori R, Brooke MH, Waterston RH. Genetic abnormalities in Duchenne and Becker dystrophies: clinical correlations. *Neurology* 1989;39:461-465.
- Mendell JR, Florence J. Manual muscle testing. *Muscle Nerve* 1990;13:16-20.
- Mendell JR, Sahenk Z, Prior TW. The Childhood Muscular Dystrophies: Diseases sharing a common pathogenesis of membrane instability. *J Child Neurology* 1995;10:150-159.
- Mercuri E, Brockington M, Straub Volker, Quijano-Roy S, Yuva Y, Herrmann R, Brown SC, Torelli S, Dubowitz V, Blake DJ, Romero NB, Estournet B, Sewry

- CA, Guicheney P, Voit T, Muntoni F. Phenotypic spectrum associated with mutations in the fukutina-related-protein gene. *Ann Neurol* 2003;53:537-542.
- Merlini L, Kaplan JC, Navarro C, Barois A, Bonneau D, Brasa J, Echenne; Gallano P, Jarre L, Jeanpierre M, Kalaydjieva L, Leturcq F, Levi-Gomes A, Toutain A, Tournev I, Urtizberea A, Vallat JM, Voit T, Warter JM. Homogeneous phenotype of the gypsy limb-girdle muscular dystrophy with γ -sarcoglycan C283Y mutation. *Neurology* 2000;54:1075-1079.
- Messina DL, Speer MC, Pericak-Vance MA, McNally EM. Linkage of familial dilated cardiomyopathy with conduction defect and muscular dystrophy to chromosome 6q23. *Am J Hum Genet* 1997;61:909-917.
- Minami N, Nishino I, Kobayashi, Ikezoe K, Yu-ichi G, Nonaka I. Mutation of calpain 3 gene in patients with sporadic limb-girdle muscular dystrophy in Japan. *J Neurol Sci* 1999;171:31-37.
- Minetti C, Sotgia F, Bruno C, Scartezzini P, Broda P, Bado M, Masetti E, Mazzocco M, Egeo A, Donati MA, Volonté, Galbiati F, Cordone G, Bricarelli FD, Lisanti MP, Zara F. Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat Gen* 1998;18:365-368.
- Morandi L, Barresi R, Di Blasi C, Jung D, Sunada Y, Confalonieri V, Dworzak F, Mantegazza R, Antozzi C, Jarre L, Pini A, Gobbi G, Bianchi C, Cornelio F, Campbell KB, Mora M. Clinical heterogeneity of adhalin deficiency. 1996;39;196-202.
- Moreira ES, Vainzof M, Marie SK, Sertié AL, Zatz M, Passos-Bueno MR. The seventh form of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy is mapped to 17q11-12. *Am J Hum Genet* 1997;61:151-159.
- Moreira ES, Vainzof M, Marie SK, Nigro V, Zatz M, Passos-Bueno MR. A first missense mutation in the delta sarcoglycan gene associated with a severe phenotype and frequency of limb-girdle muscular dystrophy type 2F (LGMD2F) in Brazilian sarcoglycanopathies. *J Med Genet* 1998;35:951-953.
- Moreira Es, Wiltshire TJ, Faulkner G, Nilforoushan A, Vaizof M, Suzuki OT, Valle G, Reeves R, Zatz M, Passos-Bueno MR, Jenne DE. Limb-girdle muscular dystrophy type 2G is caused by mutation in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin. *Nat Gene* 2000;24:163-166.
- Morki B, Engel AG. Duchenne dystrophy: electron microscopic finding pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. *Neurology* 1975;25:1111-1120.
- Moxley RT. Functional testing. *Muscle Nerve* 1990;13(S);26S-39S.
- Muchir A, Bonne G, van der Kooi AJ, van Meegen M, Baas F, Bolhuis PA, Visser M, Schwartz K. Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in

autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances. *Hum Mol Genet* 2000;9:1453-1459.

Munain AL, Urtasun A, Poza JJ, Ruiz J, Sáenz A, Cobo AM, Lasa A, Gallano P, Baiget M, Martí-Massó JF. Alteraciones en las proteínas funcionales – déficit de calpaína 3. *Rev Neurol* 1999;28:158-164.

Naom I, D'Alessandro M, Sewry CA. Laminin- α 2 chain gene mutations in two siblings presenting with limb-girdle muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 1998;8:495-501.

Nicholson LV, Johnson MA, Gardner-Medwin D, Bhattacharya S, Harris JB. Heterogeneity of dystrophin expression in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Acta Neuropathol* 1990;80:239-250.

Nicholson LV, Johnson MA, Bushby KM, Gardner MD, Curtis A, Ginjaar IB, Den Dunnen JT, Welch JL, Butler TJ, Bakker E, Van Ommen GT, Harris JB. Integrated study of 100 patients with Xp21-linked muscular dystrophy using clinical, genetic, immunochemical and histopathological data. *J Med Genet* 1993;30:728-751.

Nigro V, Piluso G, Belsito A, Politano L, Pucca AA, Paparella S, Rossi E, Viglietto G, Esposito MG, Abbondanza C, Medici N, Molinari AM, Nigro G, Puca A. Identification of a novel sarcoglycan gene at 5q33 encoding a sarcolemmal 35 kDa glycoprotein. *Hum Mol Gen* 1996;5:1179-1186.

Noguchi S, McNally EM, Ben Othmane K, Hagiwara Y, Mizuno Y, Yoshida M, Yamamoto H, Bönnemann CG, Gussoni E, Denton PH, Kyriakides T, Middleton L, Hentati F, Ben Hamida M, Nonaka I, Vance JM, Kunkel LM, Ozawa E. Mutations in the dystrophin-associated protein γ -sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. *Science* 1995;270:819-822.

Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing preassembled signaling complex at the plasma membrane. *J Biol Chem* 1998;273:5419-5422.

Ono Y, Shimada H, Sorimachi H, Richard I, Saido TC, Beckmann JS, Ishiura S, Suzuki K. Functional defects of a muscle-specific calpain, p94, caused by mutation associated with limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *J Biol Chem* 1998;273:17073-17078.

Ozawa E, Noguchi S, Mizuno Y, Hagiwara Y, Yoshida M. From dystrophinopathy to sarcoglycanopathy: evolution of a concept of muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 1998;21:421-438.

Ozawa E, Nishino I, Nonaka I. Sarcolemmopathy: muscular dystrophies with cell membrane defects. *Brain Pathology* 2001;11:218-230.

- Passos-Bueno MR, Richard I, Vainzof M, Fougèrouse F, Weissenbach J, Broux O, Cohen D, Akiyama J, Marie SK, Carvalho AA, Guilherme L, Kalil J, Tsanaclis AM, Zatz M, Beckmann JS. Evidence of genetic heterogeneity in the autosomal recessive adult forms of limb-girdle muscular dystrophy following linkage analysis with 15q probes in Brazilian families. *J Med Genet* 1993;30:385-387.
- Passos-Bueno MR, Bashir R, Moreira ES, Vainzof M, Marie SK, Vasquez L, Iughetti P, Bakker , Keers S, Stephenson A, Strachant T, Mahmeh I, Weissenbach, Bushby K, Zatz M. Confirmation of the 2p locus for the mild autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy gene (LGMD 2B) in three families allows refinement of the candidate region. *Genomics* 1995a;27:192-195.
- Passos-Bueno MR, Moreira ES, Vainzof M, Chamberlain J, Marie SK, Pereira L, Akiyama J, Roberds SL, Campbell KP, Zatz M. A common missense mutation in the *adhalin* gene in three unrelated Brazilian families with a relatively mild form of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy. *Hum Mol Gen* 1995b;4:1163-1167.
- Passos-Bueno MR, Moreira ES, Bashir R, Vasquez L, Love DR, Vainzof M, Iughetti P, Oliveira JR, Bakker E, Strachan T, Bushby K, Zatz M. Main clinical features of the three mapped autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies and estimated proportion of each form in 13 Brazilian families. *J Med Genet* 1996a;22:97-102.
- Passos-Bueno MR, Moreira ES, Vainzof M, Marie SK, Zatz M. Linkage analysis in autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy (AR LGMD) maps a sixth form to 5q33-34 (LGMD2F) and indicates that there is at least one more subtype of AR LGMD. *Hum Mol Genet* 1996b;5:818-820.
- Passos-Bueno MR, Vainzof M, Moreira ES, Zatz M. Seven autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies in the Brazilian population: from LGMD2A to LGMD2G. *Am J Med Genet* 1999;82:392-398.
- Piccolo F, Roberds SL, Jeanpierre M, Leturcq F, Azibi K, Beldjord C, Cerrie A, Recan D, Chaouch M, Reghis A. Primary *adhalin*opathy: a common case of autosomal recessive muscular dystrophy of variable severity. *Nat Genet* 1995;10:243-245.
- Pini A, Merlini L, Tomé FMS, Chevally M, Gobbi G. Merosin-negative congenital muscular dystrophy, occipital epilepsy with periodic spasms and focal cortical dysplasia – report of three Italian cases in tow families. *Brain Dev* 1996;18:316-322.
- Pollitt C, Anderson LVB, Pogue R, Davison K, Pyle A, Bushby KMD. The phenotype of calpainopathy: diagnosis based on a multidisciplinary approach. *Neuromuscul Disord* 2001;11:287-296.

- Richard I, Broux O, Allamand V, Fougerousse F, Chiannikulchai N, Bourg N, Breguier L, Devaud C, Pasturaud P, Roudaut C, Hillaire D, Passos-Bueno MR, Zatz M, Tischfield JA, Fardeau M, Jackson C, Cohen D, Beckmann J. Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* 1995;81:27-40.
- Richard I, Bourg N, Marchand S, Alibert O, Eymard B, van der Kooi A, E Jackson C, Garcia C, Burgunder J, Legum C, Visser M, Fardeau M, Beckmann JS. A diagnostic fluorescent marker kit for six limb girdle muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord* 1999a;9:555-563.
- Richard I, Roudaut C, Saenz A, Pogue R, Grimbergen JEMA, Anderson LVB, Bely C, Cobo A-M, Diego C, Eymard B, Gallano P, Ginjaar HB, Lasa A, Pollitt C, Topalagu H, Urtizbera JA, Visser M, Van der Kooi A, Bushby K, Bakker E, Munain AL, Fardeau M, Beckmann JS. Calpainopathy a survey of mutations and polymorphisms. *Am J Hum Gen* 1999b;64:1524-1540.
- Richard I, Roudaut, Marchand S, Baghdiguian S, Herasse M, Stockholm D, Ono Y, Suel L, Bourg N, Sorimachi H, Lefranc G, Fardeau M, Sébille A, Beckmann J. Loss of calpain 3 proteolytic activity leads to muscular dystrophy and to apoptosis-associated I κ B α /nuclear factor κ B pathway perturbation in mice. *J Cell Biol* 2000;151:1583-1590.
- Roberds S, Anderson RD, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Campbell KP. Primary structure and muscle-specific expression of the 50-kDa dystrophin-associated glycoprotein (Adhalin). *J Biol Chem* 1993;268:23739-23742.
- Roberds S, Leturcq F, Allamand V, Piccolo F, Jeanpierre M, Anderson RD, Lim LE, Lee JC, Tomé FMS, Romero NB, Fardeau M, Beckmann JS, Kaplan JC, Campbell KP. Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell* 1994;78:625-633.
- Rosman NP. The cerebral defect and myopathy in Duchenne muscular dystrophy. A comparative clinicopathological study. *Neurology*. 1970;20:329-335.
- Rowland LP. Merreitt's textbook of neurology. In: Rowland LP. Myopathies. 9th ed. Houston: Williams & Wilkins, 1995. p.766-780.
- Salamikangas P, Mykkänen OM, Grönholm M, Heiska L, Kere J, Carpén O. Myotilin, a novel sarcomeric protein with two Ig-like domains, is encoded by a candidate gene for limb-girdle muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 1999;8:1329-1336.
- Salih MAM, Bayoumi RA, Omer MIA, Johnson OKM. Severe autosomal recessive muscular dystrophy in an extended Sudanese kindred. *Dev Med Child Neurol*. 1983;25:43-52.
- Salih MAM, Mahdi AH, Al-Rikabi AC, Al-Banayan M, Roberds SL, Anderson RD, Campbell KP. Clinical and molecular pathological features of severe childhood

- autosomal recessive muscular dystrophy in Saudi Arabia. *Dev Med Child Neurol*. 1996;38:262-270.
- Sargiacomo M, Scherer PE, Tang Z, Kübler E, Song KS, Sanders MC, Lisanti MP. Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc Nat Acad Sci* 1995;92:9407-9411.
- Scola RH. Análise da distrofina pelo método de imunocitoquímica – estudo de 517 casos [tese doutorado]. Ribeirão Preto (SP): Universidade de São Paulo; 1999.
- Scola RH, Werneck LC, Franco CRC. Corpos de inclusão citoplasmática. *Arq Neuropsiq* 1996;54:245-259.
- Serratrice G, Gustaut JL, Pellissier JF, Cros D, Pouget J. Myopathie quadricipitale ou syndrome amyotrophique quadricipital – étude nosologique á propos de 10 observations. *Rev Neurol (Paris)* 1983;139:367-373.
- Serratrice G, Pou-Serradel A, Pellissier JF, Roux H, Lamarco-Civro J, Pouget J. Chronic neurogenic quadriceps amyotrophies. *J Neurol* 1985;232:150-3.
- Sewry CA, Philpot J, Mahony D, Wilson LA, Muntoni F, Dubowitz V. Expression of laminin subunits in congenital muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 1995;5:307-316.
- Sewry CA, Taylor J, Anderson LVB, Ozawa E, Pogue R, Piccolo F, Bushby K, Dubowitz V, Muntoni F. Abnormalities in α , β and γ sarcoglycan in patients with limb-girdle muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 1996;6:467-474.
- Shaul PW, Smart EJ, Robinson LJ, German Z, Yuhanna I, Ying Y, Anderson RGW, Michel T. Ancylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem* 1996;271:6518-6522.
- Shokeir MHK, Kobrinsky NL. Autosomal recessive muscular dystrophy in Manitoba Hutterites. *Clin Genet* 1976;9:197-202.
- Speer MC, Yamoaka LH, Gilchrist JH, Gaskell CP, Stajich JM, Vance JM, Kazantsev A, Lastra AA, Haynes CS, Beckmann JS, Cohen D, Weber JL, Roses AD, Pericak-Vance MA. Confirmation of genetic heterogeneity in limb-girdle muscular dystrophy: linkage of an autosomal dominant form to chromosome 5q. *Am J Hum Genet* 1992;50:1211-1217.
- Speer MC, Yamoaka LH, Gilchrist JH. Evidence for genetic heterogeneity in the dominant form of limb-girdle muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 1993;53S:A1082.
- Speer MC, Vance JM, Graham FL. Exclusion of identified LGMD1 loci from four dominant limb-girdle muscular dystrophy families. *Hum Hered* 1998;48:179-84.

- Speer MC; Vance JM; Grubber JM; Graham FL, Stajich JM, Viles KD, Rogala A, McMichael R, Chutkow J, Goldsmith C, Tim RW, Pericak-Vance MA. Identification of a new autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy locus on chromosome 7. *Am J Hum Genet* 1999;64:556-562.
- Spencer MJ, Tidball JG, Anderson LVB, Bushby KMD, Harris JB, Passos-Bueno MR, Somer H, Vainzof M, Zatz M. Absence of calpain 3 in a form of limb-girdle muscular dystrophy (LGMD2A). *J Neurol Sci* 1997;146:173-178.
- Song KS, Scherer PE, Tang Z, Okamoto T, Li S, Chafel M, Chu C, Khotz DS, Lisanti MP. Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac and smooth muscles cells. *J Biol Chem* 1996;271:15160-15165.
- Sonoo M. New attempts to quantify concentric needle electromyography. *Muscle Nerve*. 2002;S11:S98-S102.
- Stalberg E, Nandedkar SD, Sanders DB, Flack B. Quantitative motor unit potential analysis. *J Clin Neurophysiol* 1996;13:401-422.
- Stevenson AC. Muscular dystrophy in Northern Ireland I: an account of the condition in fifty-one families. *Ann Eugenics* 1953;18:50-93.
- Stevenson AC. Muscular dystrophy in Northern Ireland II: an account of nine additional families. *Ann Human Genet* 1955;19:159-164.
- Sunada Y, Campbell KP. Dystrophin-glycoprotein complex: molecular organization and critical roles in skeletal muscle. *Cur Opin Neurol* 1995;8:379-384.
- Sunada Y, Saito F, Higuchi I, Matsumura K, Shimizu T. Deficiency of a 180-kDa extra cellular matrix protein in Fukuyama type congenital muscular dystrophy skeletal muscle. *Neuromuscul Disord* 2002;12:117-120.
- Swinscow TDV. *Statistics at Square One*. London: Dawson & Goodball, 1978.
- Tan E, Topaloglu H, Sewry C, Zorlu Y, Naom I, Erdem S, D'Alessandro M, Muntoni F, Dubowitz V. Late onset muscular dystrophy with cerebral white matter changes due to partial merosin deficiency. *Neuromuscul Disord* 1997;7:85-89.
- Tang K, Scherer PE, Okamoto T, Song K, Chu C, Kohtz DS, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP. Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem* 1996;271:2255-2261.
- Tidball JG, Spencer MJ. Calpains and muscular dystrophies. *IJBCB* 2000;32:1-5.
- Tinsley AM, Blake DJ, Roche A, Fairbrother U, Riss J, Byth BC, Knight AE, Kendrick-Jones J, Suthers CK, Love DR, Edwards YH. Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature* 1992;360:591-593.

- Tsubata S, Bowles KR, Vatta M, Zintz C, Titus J, Mohonen L, Bowles NE, Towbin JA. Mutations in the human δ -sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2000;106:655-662.
- Tyler F, Wintrobe MM. Studies in disorders of muscle I – The problem of progressive muscular dystrophy. *Ann Int Med* 1950;32:72-79.
- Udd B, Kääriäinen H, Somer H. Muscular dystrophy with separate clinical phenotypes in a large family. *Muscle Nerve*. 1991;14:1050-1058.
- Udd B, Partanen J, Halonen P, Falck B, Hakamies L, Heikkilä H, Ingo S, Kalimo H, Kääriäinen H, Laulumaa V, Paljärvi L, Rapola J, Reunanen M, Sonninen V, Somer H. Tibial muscular dystrophy – late adult-onset distal myopathy in 66 Finnish patients. *Arch Neurol* 1993;50:604-608.
- Ueyama H, Kukamoto T, Fujimoto S, Marakami T, Tsuda T. Expression of three calpain isoform genes in human skeletal muscles. *J Neurol Sci* 1998;155:163-169.
- Urtasun M, Sáenz A, Roudant C, Poza JJ, Ustizbera JA, Cobo AM, Richard I, García Bragado F, Leturcq F, Kaplan JC, Martin Massó, JF, Beckmann JS, Muanain LA. Limb-girdle muscular dystrophy in Guipúzcoa (Basque Contry, Spain). *Brain* 1998;121:1735-1747.
- Urtasun M, Munain LA. Distrofia muscular de cinturas: un síndrome clinica y genéticamente heterogéneo. *Neurologia* 1999;14:97-101.
- Vainzof M, Pavanello RC, Pavanello-Filho I, Rapaport D, Passos-Bueno MR, Zubrzycka-Gaarn EE, Bulman DE, Zatz M. Screening of male patients with autosomal recessive Duchenne dystrophy through dystrophin and DNA studies. *Am J Med Genet* 1991a;39:38-41.
- Vainzof M, Zubrzscka-Graarn EE, Rapaport D, Passos-Bueno MR, Pavanello RCM, Pavanello-Filho I, Zatz M. Immunofluorescence dystrophin study in Duchenne dystrophy trough the concomitant use of tow antibodies directed against the carboxyl-terminal and the amino-terminal region of the protein. *J Neurol Sci* 1991b;101:141-147.
- Vainzof M, Pavavello RCM, Pavanello Filho I, Pasos-Bueno MR, Rapaport D, His CT, Levy JA, Carvalho M, Salum P, Zatz M. A dystrophin immunohistochemistry study in muscle of patients with muscular dystrophy. *Brazil J Genetics* 1991c;14:799-812.
- Vainzof M, Passos-Bueno MR, Canovas M, Moreira ES, Pavanello RCM, Marie SK, Anderson LVB, Bonnemann CG, McNally EM, Nigro V, Kunkel LM, Zatz M. The sarcoglycan complex in the six autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Hum Mol Genet* 1996;5:1963-1969.

- Valle G, Faulkner G, De Antoni A, Pacchioni B, Pallavicini A, Pandolfo D, Tiso N, Toppo S, Trevisan S, Lanfranchi G. Telethonin, a novel sarcomeric protein of heart and skeletal muscle. *FEBS Lett* 1997;415:163-168.
- Van der Kooi AJ, van Meegen M, Ledderhof TM, Voogt WG, Res JCJ, Bouwsma G, Troots D, Busch HFM, Becker AE, Visser M. A newly recognized autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with cardiac involvement. *Ann Neurol* 1996;39:636-642.
- Van der Kooi AJ, Ledderhof TM, McNally EM, de Visser M, Bolhuis PA. Genetic localization of a newly recognized autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy with cardiac involvement (LGMD1B) to chromosome 1q11-21. *Am J Hum Genet* 1997;60:891-895.
- Van der Kooi AJ, Ginjaar HB, Busch HF, Wokke JH, Barth PG, de Visser M. Limb girdle muscular dystrophy: a pathological and immunohistochemical re-evaluation. *Muscle Nerve* 1998;21:584-590.
- Van Wijngaarden GK, Hagen CJ, Bethlem, Meijer AEFH. Myopathy of the quadriceps muscles. *J Neurol Sci* 1968;7:201-206.
- Venema VJ, Ju H, Zou R, Venema RC. Interaction of neuronal nitric-oxide synthase with caveolin-3 in skeletal muscle. *J Biol Chem* 1997;272:28187-28190.
- Vignos PJ, Spencer GE, Archibald KC. Management of progressive muscular dystrophy of childhood. *JAMA* 1963;184:89-96.
- Vorgerd M, Gencik M, Mortier J, Epplen JT, Malin JP, Mortier W. Isolated loss of γ -sarcoglycan: diagnostic implications in autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Muscle nerve* 2001;24:421-424.
- Walton JN, Nattrass FJ. On the classification, natural history and treatment of myopathies. *Brain* 1954 ;77:169-231.
- Walton JN. On the inheritance of muscular dystrophy. *Hum Gen* 1956;20:1-38.
- Watkins SC, Hoffman EP, Slayter HS, Kunkel LM. Immunoelectron microscopic localization of dystrophin in myofibrils. *Nature* 1988;333:863-866.
- Weiler T, Greenberg CR, Nylén E, Halliday W, Morgan K, Eggertson D, Wrogemann K. Limb-girdle muscular dystrophy and Miyoshi myopathy in an aboriginal Canadian kindred map to LGMD2B and segregate with the same haplotype. *Am J Hum Genet* 1996;59:872-878.
- Weiler T, Greenberg CR, Zelinski T. A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in Manitoba Hutterites maps to chromosome region 9q31-q33: evidence for another limb-girdle muscular dystrophy locus. *Am J Hum Genet* 1998;63:140-147.

- Werneck LC. Estudo da biópsia muscular e sua correlação com enzimas séricas e eletromiográficas nas doenças neuromusculares. 1991. Tese (Concurso para Professor Titular do Departamento de Clínica Médica) – Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Werneck LC, Bonilla E. Immunohistochemical alterations of dystrophin in congenital muscular dystrophy. *Arq Neuropsiq* 1995;53:416-423.
- Werneck LC, Scola RH, Iwamoto FM. Congenital muscular dystrophy and merosin deficiency. *Arq Neuropsiq* 1997;55:780-787.
- Wewer UM, Engvall E. Merosin/lamini-2 and muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 1996;6:409-418.
- Yamamoto H, Hagiwara Y, Mizuno Y, Yoshida M, Ozawa E. Heterogeneity of dystrophin-associated proteins. *J Biochem* 1993;114:132-139.
- Yamamoto H, Mizuno Y, Hayashi K, Nonaka I, Yoshida M, Ozawa E. Expression of dystrophin-associated protein 35DAG (A4) and 50DAG (A2) is confined to striated muscle. *J Biochem* 1994;115:162-167.
- Yoshida M, Ozawa E. Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma. *J Biochem* 1990;108:748-752.
- Zatz M, Passos-Bueno MR, Rapaport D. Estimate of the proportion of Duchenne muscular dystrophy with autosomal recessive inheritance. *Am J Med Genet* 1989;32:407-410.
- Zatz M, Rapaport D, Vainzof M, Passos-Bueno MR, Bortolini ER, Pavanello RCM, Peres CA. Serum creatine-kinase (CK) and pyruvate-kinase (PK) activities in Duchenne (DMD) as compared with Becker (BMD) muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 1991;102:190-196.
- Zatz M, Matsumura K, Vainzof M, Passos-Bueno MR, Pavanello RC, Marie SK, Campbell KP. Assessment of the 50-kDa dystrophin-associated glycoprotein in Brazilian patients with severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 1994;123:122-128.
- Zatz M, Vainzof M, Passos-Bueno MR. Serum creatin kinase progressive muscular dystrophies. Johnson MA. In: Bushby KMD and Anderson LVB. *Muscular dystrophy methods and protocols*. New Jersey: Humana Press, 2001. p.31-49.
- Zubrzycka-Gaarn EE, Bulman DE, Karpati G, Burghes AHM, Belfall B, Klamut HJ, Talbot J, Hodges RS, Ray PN, Worton RG. The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. *Nature* 1988;333:466-469.

ANEXOS

LISTA DE ANEXOS

- ANEXO 1 SEXO, IDADE, INÍCIO DOS SINTOMAS, TEMPO DE DOENÇA E MANIFESTAÇÃO CLÍNICA INICIAL
- ANEXO 2 HISTÓRIA FAMILIAR: PRESENÇA DE AVÓS, PAIS, TIOS, IRMÃOS E FILHOS AFETADOS – PAIS CONSANGÜÍNEOS
- ANEXO 3 TROFISMO MUSCULAR, FORÇA MUSCULAR, MARCHA, MANOBRA DE GOWERS E ESCALA FUNCIONAL
- ANEXO 4 DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS DAS ENZIMAS MUSCULARES – NÚMERO DE VEZES AUMENTADO ACIMA DO NORMAL
- ANEXO 5 PADRÃO DA ELETROMIOGRAFIA E BIÓPSIA MUSCULAR
- ANEXO 6 HISTOPATOLOGIA
- ANEXO 7 SOLUÇÕES
- ANEXO 8 IMUNOIDENTIFICAÇÃO DA DISTROFINA, α -SG, β -SG, γ -SG, δ -SG, DISFERLINA, β -DG E CALPAÍNA-3.
- ANEXO 9 CÁLCULOS ESTATÍSTICOS

ANEXO 1

SEXO, IDADE, INÍCIO DOS SINTOMAS, TEMPO DE DOENÇA E MANIFESTAÇÃO CLÍNICA INICIAL					
Caso	Sexo	Idade de início dos sintomas (anos)	Idade na avaliação (anos)	Tempo de doença (anos)	Manifestação clínica inicial (fraqueza)
1	F	7,0	11	4,0	MMII e MMSS
2	M	12,0	22	10,0	MMII
8	F	10,0	19	9,0	MMSS
10	M	20,0	23	3,0	MMII
11	M	1,0	24	23,0	MMII
12	M	31,0	36	5,0	MMII e MMSS
13	F	26,0	28	2,0	MMII
14	M	16,0	24	8,0	MMSS
15	F	15,0	20	5,0	MMII
16	M	28,0	30	2,0	MMII
17	F	0,5	12	11,5	MMII
19	M	3,0	21	18,0	MMII
20	M	17,0	22	5,0	MMII
21	M	23,0	28	5,0	MMII
22	F	30,0	42	12,0	MMII
23	F	15,0	43	28,0	MMSS
25	M	14,0	16	2,0	MMII
27	M	24,0	30	6,0	MMII
28	F	25,0	28	3,0	MMII e MMSS
29	F	9,0	27	18,0	MMII e MMSS
30	M	0,1	8	7,9	MMII e MMSS
31	F	10,0	33	23,0	MMII
32	M	36,1	37	0,8	MMSS
33	F	35,0	39	4,0	MMII
34	F	47,0	55	8,0	MMSS
35	M	6,0	17	11,0	MMII
36	M	10,0	15	5,0	MMSS
37	F	25,0	29	4,0	MMII
38	F	25,0	29	4,0	MMII
39	M	13,0	17	4,0	MMSS
40	F	3,0	21	18,0	MMII
41	F	19,0	37	28,0	MMII
42	M	27,0	35	8,0	MMII
43	M	8,0	15	7,0	MMII
44	M	20,0	23	3,0	MMII
45	F	23,0	25	2,0	MMSS
46	M	50,0	56	6,0	MMII
47	F	57,0	61	4,0	MMII
48	M	25,0	30	5,0	MMSS
49	M	1,5	26	25,5	MMII
50	F	42,5	44	1,5	MMSS
51	F	3,0	6	3,0	MMII
52	F	1,2	4,1	2,9	MMII
55	M	26,0	41	15,0	MMSS
56	M	11,5	14,5	3,0	MMII e MMSS
57	M	18,0	25,0	7,0	MMSS
58	M	12,6	17,6	5,0	MMII
59	F	2,0	20,0	7,0	MMII
60	M	17,0	23,0	6,0	MMII
61	M	39,0	41,0	2,0	MMII e MMSS
62	M	1,3	2,0	0,7	MMII
63	M	32,6	33,0	0,4	MMII
64	F	6,0	7,0	1,0	MMII
65	M	13,0	14,0	1,0	MMII
66	M	8,0	11,0	3,0	MMII
67	F	18,0	30,0	12,0	MMII

F = feminino; M = masculino; MMSS = membros superiores; MMII = membros inferiores

ANEXO 2

HISTÓRIA FAMILIAR: PRESENÇA DE AVÓS, PAIS, TIOS, IRMÃOS E FILHOS AFETADOS – PAIS CONSANGÜÍNEOS

Caso	Avós	Pais	Tios	Irmãos	Filhos	Pais consangüíneos
1	-	-	-	+	-	-
2	-	-	-	+	-	-
8	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	+	-	-
19	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	+	-	+
32	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	+	-	-
34	-	-	-	-	-	-
35	-	-	+	+	-	-
36	-	-	-	-	-	-
37	-	-	+	+	-	+
38	-	-	-	+	-	-
39	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	+	-	-
43	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	+	+
45	+	+	+	+	-	-
46	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-	-
48	-	-	+	+	-	-
49	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	+	-	+
51	-	-	-	-	-	+
52	-	-	-	-	-	-
55	-	-	-	-	-	-
56	-	-	-	-	-	-
57	-	-	-	-	-	-
58	-	+	-	+	-	-
59	-	-	-	+	-	-
60	-	-	-	+	-	-
61	-	-	-	-	-	-
62	-	-	-	-	-	-
63	-	-	-	-	+	-
64	-	-	-	-	-	-
65	-	-	-	-	-	-
66	-	-	-	-	-	-
67	-	-	-	+	-	-

(-) = ausente, (+) = presente

ANEXO 3

TROFISMO MUSCULAR, FORÇA MUSCULAR, MARCHA, MANOBRA DE GOWERS E ESCALA FUNCIONAL

Caso	Trofismo Muscular					Força Muscular ⁽¹⁾					Marcha	Gowers	Escala Funcional ⁽²⁾
	MMSS		MMII		PAN	MMSS		MMII		Facial			
	PRO	DIS	PRO	DIS		PRO	DIS	PRO	DIS				
1	D	N	D	N	A	5	7	5	7	N	M	P	2
2	D	D	D	D	N	3	5	2	5	N	IR	IR	9
8	N	N	D	N	N	5	7	4	7	N	M	P	3
10	N	N	D	N	N	5	5	3	5	N	M	P	2
11	D	N	D	N	N	5	7	4	4	N	M	P	3
12	D	N	N	N	A	5	7	4	7	N	N	C	2
13	N	N	N	N	N	6	7	4	7	N	M	C	3
14	D	N	N	N	N	7	7	7	7	N	N	N	0
15	N	N	N	N	A	5	7	3	5	N	M	P	3
16	D	N	D	N	N	6	7	5	7	N	M	P	2
17	D	D	D	D	N	3	5	4	5	D	M	P	3
19	D	N	D	N	N	5	7	4	7	N	M	P	4
20	N	N	D	N	N	5	7	5	7	N	M	C	2
21	D	N	D	N	N	4	7	5	7	N	M	P	3
22	D	N	D	N	N	5	7	5	7	N	M	P	3
23	D	N	N	N	N	7	7	5	7	D	M	C	2
25	D	D	D	D	N	4	7	4	7	N	M	P	3
27	D	N	D	N	N	7	7	5	5	N	N	C	1
28	D	N	N	N	N	3	4	2	4	N	IR	IR	5
29	N	N	N	N	N	4	4	5	5	D	M	P	3
30	D	D	D	D	N	3	4	4	5	N	M	P	2
31	D	N	D	N	N	5	7	5	7	N	M	P	3
32	D	D	D	D	N	5	7	5	7	N	M	P	3
33	D	N	D	N	N	5	7	4	7	N	M	P	3
34	N	N	N	N	N	5	2	5	7	N	N	C	1
35	D	D	D	D	N	3	6	3	4	N	M	P	3
36	D	N	N	N	N	4	7	6	7	N	N	C	2
37	D	N	D	N	N	5	7	5	6	N	M	P	3
38	D	N	D	N	N	5	7	4	7	N	M	P	2
39	D	N	N	N	N	3	5	7	7	D	N	N	1
40	D	D	D	D	N	5	7	4	7	N	M	C	2
41	N	N	D	N	A	6	6	3	4	N	IR	IR	7
42	N	N	D	N	N	7	7	6	7	N	M	P	1
43	D	D	D	D	N	6	6	4	6	D	M	P	3
44	D	D	D	D	N	4	5	3	4	N	IR	IR	7
45	D	N	N	N	N	4	6	5	6	D	M	P	2
46	N	N	D	N	N	4	5	4	5	N	M	P	3
47	N	N	N	N	N	7	7	4	7	N	M	C	3
48	D	N	N	N	N	3	7	5	7	N	N	N	1
49	N	N	N	N	N	4	5	4	4	N	IR	IR	7
50	D	N	N	N	N	5	7	5	7	N	N	N	2
51	N	N	N	N	A	5	7	5	7	N	M	P	3
52	D	N	D	N	N	5	7	4	7	N	M	P	3
55	D	N	N	N	N	3	7	5	7	N	M	P	3
56	N	N	N	N	N	4	7	7	7	N	M	P	3
57	D	D	N	N	N	7	7	7	7	N	N	C	1
58	D	N	N	N	N	3	5	4	7	D	M	N	3
59	N	D	N	N	N	2	4	3	5	N	M	IR	4
60	D	N	D	N	N	5	5	4	5	D	M	C	3
61	D	N	N	N	N	5	7	5	7	N	N	P	1
62	N	N	N	N	A	7	7	7	7	N	N	N	2
63	D	N	D	N	N	5	5	8	7	N	M	P	3
64	D	N	D	N	A	5	7	5	7	N	M	P	2
65	N	N	N	N	N	7	7	5	7	N	N	N	2
66	N	N	N	N	N	7	7	7	7	N	N	N	1
67	N	N	N	N	N	5	7	3	5	N	M	P	3

(1) escala MRC modificada; (2) escala de Vignos modificada

PRO = proximal; DIS = distal; N = normal / ausente; A = aumentado; D = diminuído; P = presente; IR = incapaz de realizar; M = miopática

ANEXO 4

DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS DAS ENZIMAS MUSCULARES – NÚMERO DE VEZES AUMENTADO ACIMA DO NORMAL

Caso	CK	ALT	AST	LDH	Aldolase
1	2,90	2,00	2,90	3,60	NR
2	1,10	0,20	1,70	N	NR
8	59,00	NR	NR	1,00	5,00
10	32,20	2,80	2,50	0,20	N
11	20,50	2,00	1,40	N	NR
12	4,10	NR	NR	0,00	NR
13	19,30	N	N	N	NR
14	0,00	N	N	N	N
15	3,50	N	N	0,20	NR
16	17,40	0,50	1,00	NR	2,60
17	8,40	N	N	0,20	NR
19	14,74	0,50	0,20	N	NR
20	7,60	N	N	N	0,80
21	16,20	0,50	0,60	N	4,40
22	14,40	NR	NR	N	NR
23	N	NR	NR	NR	NR
25	23,60	2,00	0,50	0,10	10,10
27	NR	NR	NR	NR	NR
28	33,70	NR	27,70	NR	12,10
29	27,00	NR	NR	NR	NR
30	0,40	N	N	0,20	N
31	3,30	NR	NR	NR	N
32	4,50	0,80	0,40	NR	0,20
33	N	N	N	NR	N
34	N	NR	NR	NR	N
35	NR	NR	NR	NR	0,20
36	NR	NR	NR	NT	NR
37	21,60	1,30	1,00	1,20	NR
38	30,00	NR	7,70	1,60	NR
39	NR	NR	0,40	0,20	NR
40	NR	NR	NR	NR	NR
41	10,40	N	1,10	1,10	NR
42	2,90	N	N	0,70	NR
43	7,80	NR	1,50	NR	NR
44	19,00	7,00	5,50	NR	NR
45	N	N	N	N	NR
46	NR	NR	NR	NR	NR
47	0,80	N	21,00	0,40	NR
48	N	N	9,00	0,20	NR
49	NR	N	20,00	0,40	NR
50	46,00	0,20	80,00	3,30	NR
51	66,00	NR	NR	11,00	12,00
52	6,10	NR	0,08	1,85	N
55	3,05	NR	N	0,70	NR
56	55,71	NR	2,45	2,85	NR
57	1,31	NR	N	0,17	NR
58	9,80	NR	0,54	1,03	1,75
59	2,20	NR	NR	0,80	1,25
60	NR	NR	NR	NR	NR
61	23,00	NR	2,00	2,00	NR
62	1,96	NR	2,00	1,00	NR
63	2,60	NR	N	N	NR
64	10,00	NR	NR	2,00	1,00
65	8,00	NR	1,00	0,70	NR
66	45,00	NR	4,00	2,00	NR
67	46,00	NR	2,00	3,00	NR

NR = não realizado; N = normal; CK = creatinaquinase; ALT = alanino aminotransferase; AST = aspartato aminotransferase; LDH = desidrogenase láctica

ANEXO 5

PADRÃO DA ELETROMIOGRAFIA E BIÓPSIA MUSCULAR

Caso	Padrão eletromiográfico	Padrão da biópsia muscular
1	Não realizado	Miopático
2	Misto	Miopático
8	Miopático	Miopático
10	Miopático	Miopático
11	Não realizado	Miopático
12	Miopático	Miopático
13	Miopático	Miopático
14	Miopático	Normal
15	Miopático	Miopático
16	Miopático	Neuromiopático
17	Miopático	Miopático
19	Miopático	Miopático
20	Miopático	Neuromiopático
21	Miopático	Miopático
22	Miopático	Miopático
23	Miopático	Desinervação
25	Não realizado	Miopático
27	Normal	Miopático
28	Miopático	Miopático
29	Normal	Limítrofe para miopatia inflamatória
30	Misto	Miopático
31	Miopático	Miopático
32	Miopático	Miopático
33	Miopático	Miopatia
34	Normal	Miopatia
35	Não realizado	Miopático
36	Miopático	Desinervação
37	Miopático	Desinervação
38	Miopático	Desinervação
39	Miopático	Miopático
40	Miopático	Miopático
41	Miopático	Miopático
42	Miopático	Miopático
43	Miopático	Miopático
44	Miopático	Miopático
45	Miopático	Inespecífica
46	Miopático	Neuromiopático
47	Miopático	Desinervação
48	Misto	Inespecífica
49	Misto	Miopático
50	Misto	Miopatia
51	Miopático	Miopático
52	Miopático	Limítrofe para miopatia inflamatória
55	Não realizado	Neuromiopático
56	Miopático	Inespecífica
57	Misto	Desinervação
58	Miopático	Desinervação
59	Miopático	Miopático
60	Miopático	Miopático
61	Miopático	Miopático
62	Miopático	Neuromiopático
63	Miopático	Miopático
64	Miopático	Neuromiopático
65	Não realizado	Inespecífica
66	Miopático	Miopático
67	Miopático	Miopático

ANEXO 6

HISTOPATOLOGIA

BIÓPSIA MUSCULAR – HISTOPATOLOGIA

continua

Caso	1	2	8	10	11	12	13
Músculo estudado:	B	Q	B	Q	Q	B	B
Hematoxilina Eosina/Tricromo de Gomori modificado							
Atrofia de pequenos grupos	-	-	-	-	-	-	-
Fagocitose	+	+	+	+	+	+	+
Fibras anguladas atroficas	-	-	-	-	-	-	-
Fibras basofílicas	-	-	-	+	-	+	+
Fibras em segmentação	-	-	+	-	+	+	-
Fibras enrodilhadas	-	-	-	-	-	+	-
Grumos nucleares	-	-	-	-	+	+	-
Infiltração tecido adiposo	+	-	+	+	+	-	+
Infiltrado inflamatório perivascular	+	+	+	+	-	+	-
Necrose	+	+	+	+	+	+	+
Núcleos centrais	+	-	+	+	+	+	+
Proliferação tecido conjuntivo endomisial	+	+	+	+	+	+	+
Vacúolos marginados	-	-	-	-	-	-	-
Vacúolos	-	-	-	-	-	-	-
Varição diâmetro de fibras.	+	+	+	+	+	+	+
ATPASES							
Atrofia de fibras tipo 1	+	+	+	+	+	+	+
Atrofia de fibras tipo 2	+	+	+	+	+	-	+
Hipertrofia de fibras tipo 1	-	+	+	+	+	+	+
Hipertrofia de fibras tipo 2	-	+	+	+	+	+	+
Predomínio de fibras tipo 1	+	-	-	-	+	-	-
Predomínio de fibras tipo 2	-	-	-	-	-	+	-
Agrupamento de fibras tipo 1 e 2	-	-	-	-	-	-	-
NADH-tetrazolium redutase							
Anéis	+	-	-	-	-	-	-
Aumento focal do NBT reduzido	+	-	-	-	+	+	-
Fibras angulares escuras atroficas	-	-	-	-	+	-	+
Saca-bocados	+	-	+	-	+	+	+
Turbilhões	+	-	-	+	+	+	+
ESTERASE INESPECÍFICA							
Aumento em placa motora	-	-	-	+	+	-	+
Aumento atividade mononuclear	-	+	-	+	+	-	+
Angulares atroficas	-	-	+	+	+	-	-
FOSFATASE ÁCIDA							
Aumento focal	-	-	+	+	-	+	-
Células inflamatórias e mononucleares.	+	+	+	-	+	+	+
Conteúdo do vacúolo positivo	-	-	-	-	-	-	-
Fibras positivas	-	+	-	+	+	-	+
Mononucleares perivasculars	-	-	-	-	-	-	-
Paredes vasculares positivas	-	-	-	-	-	-	-
FOSFATASE ALCALINA							
Fibras positivas	+	+	+	-	+	+	+
DESIDROGENASE SUCCÍNICA							
Acúmulo subsarcolemal	-	-	+	-	+	+	-
OIL-RED-0							
Aumento de gotículas de gordura	-	-	-	-	-	+	-
<i>Sirus RED</i>							
Aumento tecido conjuntivo	-	-	-	-	-	+	+
PAS							
Cresil Violeta	-	-	-	-	-	-	-
Citocromo C-oxidase	-	-	-	-	-	-	-
Adenilato deaminase	-	-	-	-	-	-	-
Fosforilase	-	-	-	-	-	-	-

Q = quadríceps; B = bíceps; D = deltóide; (-) = ausente; (+) = presente; NADH-TR = nicotinamida adenina dinucleotídeo-tetrazolium redutase; ATPase = adenina trifosfatase; NBT = nitroblue tetrazolium; PAS = ácido periódico Schiff; óleo vermelho zero = OIL-RED-0

ANEXO 6

BIÓPSIA MUSCULAR – HISTOPATOLOGIA

continuação

Caso	12	15	16	17	19	20	21
Músculo estudado:	B	B	Q	Q	B	Q	B
Hematoxilina Eosina/Tricromo de Gomori modificado							
Atrofia de pequenos grupos.	-	-	-	-	-	-	-
Fagocitose.	-	+	+	+	+	-	+
Fibras anguladas atroficas.	-	-	-	-	-	-	-
Fibras basofílicas.	-	+	-	+	+	-	+
Fibras em segmentação.	-	+	-	+	+	+	-
Fibras enrodilhadas.	-	-	-	-	-	-	-
Grumos nucleares.	-	-	-	-	-	+	-
Infiltração tecido adiposo.	-	-	-	+	+	+	+
Infiltrado inflamatório perivascular.	-	+	+	-	+	-	+
Necrose.	-	+	+	+	+	-	+
Núcleos centrais.	-	+	-	+	+	+	+
Proliferação tecido conjuntivo endomisial.	-	+	-	+	-	+	+
Vacúolos marginados.	-	-	-	-	-	-	-
Vacúolos.	-	+	-	-	-	-	-
Varição diâmetro de fibras.	+	+	-	+	+	+	+
ATPASES							
Atrofia de fibras tipo 1	-	+	-	+	+	-	+
Atrofia de fibras tipo 2	-	+	-	+	+	+	+
Hipertrofia de fibras tipo 1	-	+	-	+	+	-	+
Hipertrofia de fibras tipo 2	-	+	-	+	+	+	+
Predomínio de fibras tipo 1	-	+	-	-	-	-	-
Predomínio de fibras tipo 2	-	-	-	+	-	+	-
Agrupamento de fibras tipo 1 e 2	-	-	-	-	-	-	-
NADH-tetrazolium redutase							
Anéis	-	+	-	-	+	-	-
Aumento focal do NBT reduzido	+	-	-	-	-	-	-
Fibras angulares escuras atroficas	-	+	-	-	-	-	-
Scabocados	-	+	-	-	-	+	+
Turbilhões	-	+	-	-	+	+	+
ESTERASE INESPECÍFICA							
Aumento em placa motora	-	+	-	-	-	-	-
Aumento atividade mononuclear	-	-	-	+	-	-	-
Angulares atroficas	-	+	+	-	+	+	+
FOSFATASE ÁCIDA							
Aumento focal	-	+	-	-	+	-	+
Células inflamatórias e mononucleares.	-	+	-	+	+	-	+
Conteúdo do vacúolo positivo	-	-	-	+	-	-	-
Fibras positivas	-	+	-	-	+	-	+
Mononucleares perivascularares.	-	-	-	-	-	-	-
Paredes vasculares positivas.	-	-	-	-	-	-	-
FOSFATASE ALCALINA							
Fibras positivas	-	+	-	+	+	+	+
DESIDROGENASE SUCCÍNICA							
Acúmulo subsarcolemal	-	-	-	-	-	-	-
OIL-RED-0							
Aumento de gotículas de gordura	-	-	-	+	-	-	-
Sirus RED							
Aumento tecido conjuntivo	-	-	-	-	+	-	-
PAS							
Cresil Violeta	-	-	-	-	-	-	-
Citocromo C-oxidase	-	-	-	-	-	-	-
Adenilato deaminase	-	-	-	-	-	-	-
Fosforilase	-	-	-	-	-	-	-

Q = quadríceps; B = bíceps; D = deltóide; (-) = ausente; (+) = presente

NADH-TR = nicotinamida adenina dinucleotídeo-tetrazolium redutase; ATPase = adenina trifosfatase; NBT = nitroblue tetrazolium; PAS = ácido periódico Schiff; óleo vermelho zero = OIL-RED-0

ANEXO 6

BIÓPSIA MUSCULAR – HISTOPATOLOGIA

continuação

Caso	22	23	25	27	28	29	30
Músculo estudado:	B	Q	B	D	B	B	B
Hematoxilina Eosina/Tricromo de Gomori modificado							
Atrofia de pequenos grupos.	+	-	-	-	-	-	-
Fagocitose.	-	-	-	-	-	-	+
Fibras anguladas atroficas.	-	-	-	-	-	-	-
Fibras basofílicas.	-	-	-	-	-	-	-
Fibras em segmentação.	+	-	+	-	-	+	+
Fibras enrodilhadas.	-	-	-	-	-	-	-
Grumos nucleares.	+	+	-	-	-	+	+
Infiltração tecido adiposo.	-	+	-	-	-	-	+
Infiltrado inflamatório perivascular.	-	-	-	-	-	-	+
Necrose.	-	-	-	-	-	-	+
Núcleos centrais.	+	+	+	-	-	-	+
Proliferação tecido conjuntivo endomisial.	+	-	+	-	-	-	+
Vacúolos marginados.	-	-	-	-	-	-	-
Vacúolos.	-	-	-	-	-	-	-
Variação diâmetro de fibras.	+	+	+	+	+	+	+
ATPASES							
Atrofia de fibras tipo 1	+	+	+	+	+	-	+
Atrofia de fibras tipo 2	+	+	+	-	+	+	+
Hipertrofia de fibras tipo 1	+	+	+	-	-	-	+
Hipertrofia de fibras tipo 2	+	+	+	+	-	-	+
Predomínio de fibras tipo 1	-	-	-	-	-	+	-
Predomínio de fibras tipo 2	-	-	-	-	-	-	-
Agrupamento de fibras tipo 1 e 2	-	-	-	-	-	+	-
NADH-tetrazolium redutase							
Anéis	-	-	-	-	-	-	-
Aumento focal do NBT reduzido	-	-	-	-	-	-	-
Fibras angulares escuras atroficas	-	+	-	-	-	-	-
Scabocados	+	+	+	-	-	-	+
Turbilhões	+	-	+	-	-	-	+
ESTERASE INESPECÍFICA							
Aumento em placa motora	-	-	-	-	-	-	-
Aumento atividade mononuclear	-	-	-	-	-	-	-
Angulares atroficas	+	+	-	-	-	+	-
FOSFATASE ÁCIDA							
Aumento focal	+	-	-	-	-	-	-
Células inflamatórias e mononucleares.	-	-	+	-	+	-	-
Conteúdo do vacúolo positivo	-	-	-	-	-	-	-
Fibras positivas	-	-	-	-	-	+	-
Mononucleares perivascularares.	-	-	-	-	-	-	-
Paredes vasculares positivas.	-	-	-	-	-	-	-
FOSFATASE ALCALINA							
Fibras positivas	-	-	-	-	-	+	-
DESIDROGENASE SUCCÍNICA							
Acúmulo subsarcolemal	+	-	-	-	-	-	-
OIL-RED-0							
Aumento de gotículas de gordura	-	-	-	-	-	-	-
"Sirus RED"							
Aumento tecido conjuntivo	-	+	+	-	-	-	+
PAS	-	-	-	-	-	-	-
Cresil Violeta	-	-	-	-	-	-	-
Citocromo C-oxidase	-	-	-	-	-	-	-
Adenilato deaminase	-	-	-	-	-	-	-
Fosforilase	-	-	-	-	-	-	-

Q = quadríceps; B = bíceps; D = deltóide; (-) = ausente; (+) = presente

NADH-TR = nicotinamida adenina dinucleotídeo-tetrazolium redutase; ATPase = adenina trifosfatase, NBT = nitroblue tetrazolium; PAS = ácido periódico Schiff; óleo vermelho zero = OIL-RED-0

ANEXO 6

BIÓPSIA MUSCULAR – HISTOPATOLOGIA

continuação

Caso	31	32	33	32	35	36	37
Músculo estudado:	B	B	B	B	B	D	Q
Hematoxilina Eosina/Tricromo de Gomori modificado							
Atrofia de pequenos grupos.	-	-	-	-	-	-	-
Fagocitose.	+	+	-	-	+	-	-
Fibras anguladas atroficas.	-	-	-	-	-	-	-
Fibras basofílicas.	-	-	-	-	-	-	-
Fibras em segmentação.	+	+	-	-	+	-	+
Fibras enrodilhadas.	-	-	-	-	+	-	-
Grumos nucleares.	+	-	-	+	-	-	+
Infiltração tecido adiposo.	+	+	-	-	+	-	+
Infiltrado inflamatório perivascular.	+	+	-	-	-	-	-
Necrose.	+	+	-	-	+	-	-
Núcleos centrais.	+	+	+	-	-	-	+
Proliferação tecido conjuntivo endomisial.	+	+	-	-	+	-	+
Vacúolos marginados.	-	+	-	-	-	-	+
Vacúolos.	-	-	-	-	-	-	-
Variação diâmetro de fibras.	+	+	+	+	+	+	+
ATPASES							
Atrofia de fibras tipo 1	+	+	-	-	+	+	+
Atrofia de fibras tipo 2	+	-	+	-	+	+	+
Hipertrofia de fibras tipo 1	+	+	-	-	+	-	+
Hipertrofia de fibras tipo 2	+	+	-	-	+	-	+
Predomínio de fibras tipo 1	-	-	-	-	-	-	-
Predomínio de fibras tipo 2	-	-	-	-	-	-	-
Agrupamento de fibras tipo 1 e 2	-	-	-	-	-	-	-
NADH-tetrazolium redutase							
Anéis	-	-	-	-	+	-	+
Aumento focal do NBT reduzido	-	-	-	-	-	-	-
Fibras angulares escuras atroficas	-	+	-	-	-	+	+
Scabocados	+	+	-	-	-	-	+
Turbilhões	+	+	-	-	+	-	-
ESTERASE INESPECÍFICA							
Aumento em placa motora	-	-	+	-	-	-	-
Aumento atividade mononuclear	-	-	-	-	-	-	-
Angulares atroficas	-	-	-	-	+	+	+
FOSFATASE ÁCIDA							
Aumento focal	-	+	-	-	-	-	-
Células inflamatórias e mononucleares.	-	-	-	-	-	-	-
Conteúdo do vacúolo positivo	-	+	-	-	-	-	-
Fibras positivas	-	-	-	-	+	-	+
Mononucleares perivascularares.	-	-	-	-	-	-	-
Paredes vasculares positivas.	-	+	-	-	-	-	-
FOSFATASE ALCALINA							
Fibras positivas	-	-	-	-	+	-	+
DESIDROGENASE succínica							
Acúmulo subsarcolemal	-	+	-	-	-	-	-
OIL-RED-0							
Aumento de gotículas de gordura	-	-	-	-	-	-	-
Sirus RED							
Aumento tecido conjuntivo	+	+	-	-	-	-	+
PAS	-	-	-	-	-	-	-
Cresil Violeta	-	-	-	-	-	-	-
Citocromo C-oxidase	-	-	-	-	-	-	-
Adenilato deaminase	-	-	-	-	-	-	-
Fosforilase	-	-	-	-	-	-	-

Q = quadríceps; B = bíceps; D = deltóide, (1) = ausente, (+) = presente

NADH-TR = nicotinamida adenina dinucleotídeo-tetrazolium redutase, ATPase=adenina trifosfatase,

NBT = nitroblue tetrazolium; PAS = ácido periódico Schiff; óleo vermelho zero = OIL-RED-0

ANEXO 6

BIÓPSIA MUSCULAR – HISTOPATOLOGIA

continuação

Caso	38	39	40	41	42	43	44
Músculo estudado:	Q	D	B	Q	Q	B	B
Hematoxilina Eosina/Tricromo de Gomori modificado							
Atrofia de pequenos grupos.	-	+	-	+	-	-	-
Fagocitose.	-	+	-	-	-	+	+
Fibras anguladas atroficas.	-	+	-	-	-	+	+
Fibras basofílicas.	-	+	+	-	-	+	+
Fibras em segmentação.	-	-	-	-	+	-	-
Fibras enrodilhadas.	-	+	-	-	-	-	-
Grumos nucleares.	+	-	+	-	-	-	-
Infiltração tecido adiposo.	-	+	+	+	-	+	+
Infiltrado inflamatório perivascular.	-	+	-	-	-	+	+
Necrose.	+	+	-	-	-	+	+
Núcleos centrais.	+	+	+	+	+	+	+
Proliferação tecido conjuntivo endomisial.	-	+	-	+	-	+	+
Vacúolos marginados.	-	-	-	-	-	-	-
Vacúolos.	-	-	-	-	-	+	+
Variação diâmetro de fibras.	+	+	+	+	+	+	+
ATPASES							
Atrofia de fibras tipo 1	+	+	+	+	+	+	+
Atrofia de fibras tipo 2	-	+	-	+	-	+	+
Hipertrofia de fibras tipo 1	-	+	-	+	+	+	+
Hipertrofia de fibras tipo 2	-	+	+	+	-	+	+
Predomínio de fibras tipo 1	-	-	-	-	-	-	-
Predomínio de fibras tipo 2	-	-	-	-	-	-	-
Agrupamento de fibras tipo 1 e 2	-	-	-	-	-	-	-
NADH-tetrazolium redutase							
Anéis	-	-	+	-	-	-	-
Aumento focal do NBT reduzido	+	-	-	-	-	+	+
Fibras angulares escuras atroficas	-	-	-	-	-	+	+
Scabocados	-	+	-	-	-	-	-
Turbilhões	-	+	-	-	-	+	+
ESTERASE INESPECÍFICA							
Aumento em placa motora	-	-	-	-	-	+	+
Aumento atividade mononuclear	-	-	-	-	-	-	-
Angulares atroficas	+	-	-	-	-	+	+
FOSFATASE ÁCIDA							
Aumento focal	-	+	-	-	-	+	+
Células inflamatórias e mononucleares	-	-	+	-	-	+	+
Conteúdo do vacúolo positivo	-	-	-	-	-	+	+
Fibras positivas	+	+	-	-	-	+	+
Mononucleares perivasculares.	-	-	-	-	-	+	+
Paredes vasculares positivas.	-	-	-	-	-	+	+
FOSFATASE ALCALINA							
Fibras positivas	+	-	-	-	-	+	+
DESIDROGENASE succínica							
Acúmulo subsarcolemal	-	-	+	-	+	-	-
OIL-RED-0							
Aumento de gotículas de gordura	+	-	-	-	-		
Sirus RED							
Aumento tecido conjuntivo	-	+	-	-	-	+	+
PAS	-	-	-	-	-	-	-
Cresil Violeta	-	-	-	-	-	-	-
Citocromo C-oxidase	-	-	-	-	-	-	-
Adenilato deaminase	-	-	-	-	-	-	-
Fosforilase	-	-	-	-	-	-	-

Q = quadríceps; B = bíceps; D = deltóide; (-) = ausente; (+) = presente

NADH-TR = nicotinamida adenina dinucleotídeo-tetrazolium redutase; ATPase = adenina trifosfatase, NBT = nitroblue tetrazolium; PAS = ácido periódico Schiff; óleo vermelho zero = OIL-RED-0

ANEXO 6

BIÓPSIA MUSCULAR – HISTOPATOLOGIA

continuação

Caso	45	46	47	48	49	50	51
Músculo estudado:	2	1	2	3	2	B	Q
Hematoxilina Eosina/Tricromo de Gomori modificado							
Atrofia de pequenos grupos.	-	+	-	-	+	-	+
Fagocitose.	-	-	-	-	-	-	+
Fibras anguladas atroficas.	+	-	+	-	-	-	+
Fibras basofílicas.	-	-	-	-	-	-	+
Fibras em segmentação.	-	+	-	-	-	-	-
Fibras enrodilhadas.	-	-	-	-	-	-	-
Grumos nucleares.	-	-	-	-	-	-	-
Infiltração tecido adiposo.	-	-	-	-	+	-	+
Infiltrado inflamatório perivascular.	-	-	-	-	-	-	+
Necrose.	-	-	-	-	-	+	+
Núcleos centrais.	-	+	-	-	+	-	-
Proliferação tecido conjuntivo endomisial.	-	-	-	-	+	-	+
Vacúolos marginados.	-	-	-	-	-	-	-
Vacúolos.	-	-	-	-	-	+	-
Variação diâmetro de fibras.	+	+	+	+	+	+	+
ATPase							
Atrofia de fibras tipo 1	+	-	+	+	+	+	+
Atrofia de fibras tipo 2	+	-	+	+	+	-	+
Hipertrofia de fibras tipo 1	-	+	-	+	+	-	+
Hipertrofia de fibras tipo 2	-	+	-	+	+	-	+
Predomínio de fibras tipo 1	-	-	-	-	-	-	+
Predomínio de fibras tipo 2	-	-	-	+	-	-	-
Agrupamento de fibras tipo 1 e 2	-	-	-	-	-	-	-
NADH-tetrazolium redutase							
Anéis	-	-	-	-	-	-	-
Aumento focal do NBT reduzido	-	+	-	-	-	-	-
Fibras angulares escuras atroficas	+	-	+	-	-	-	-
Scabocados	-	-	-	-	-	-	-
Turbilhões	-	+	-	-	-	-	-
ESTERASE INESPECÍFICA							
Aumento em placa motora	-	-	-	-	-	-	-
Aumento atividade mononuclear	-	-	-	-	-	-	-
Angulares atroficas	-	-	-	+	-	-	+
FOSFATASE ÁCIDA							
Aumento focal	-	-	-	-	-	-	-
Células inflamatórias e mononucleares.	-	-	-	-	-	-	-
Conteúdo do vacúolo positivo	-	-	-	-	-	-	-
Fibras positivas	-	-	-	-	-	-	-
Mononucleares perivascularares.	-	-	-	-	-	-	-
Paredes vasculares positivas.	-	-	-	-	-	-	-
FOSFATASE ALCALINA							
Fibras positivas	-	-	-	-	-	-	-
DESIDROGENASE succínica							
Acúmulo subsarcolemal	-	-	-	-	-	-	-
OIL-RED-0							
Aumento de gotículas de gordura	-	+	-	-	-	+	-
Sirus RED							
Aumento tecido conjuntivo	-	-	-	-	-	-	-
PAS							
Cresil Violeta	-	-	-	-	-	-	-
Citocromo C-oxidase	-	-	-	-	-	-	-
Adenilato deaminase	-	-	-	-	-	-	-
Fosforilase	-	-	-	-	-	-	-

Q = quadríceps; B = bíceps; D = deltóide; (-) = ausente; (+) = presente

NADH-TR = nicotinamida adenina dinucleotídeo-tetrazolium redutase; ATPase = adenina trifosfatase,

NBT = nitroblue tetrazolium; PAS = ácido periódico Schiff; óleo vermelho zero = OIL-RED-0

ANEXO 6

BIÓPSIA MUSCULAR – HISTOPATOLOGIA

continuação

Caso	52	55	56	57	58	59	60
Músculo estudado:	Q	Q	B	D	B	B	B
Hematoxilina Eosina/Tricromo de Gomori modificado							
Atrofia de pequenos grupos.	-	-	-	-	-	+	+
Fagocitose.	-	+	-	-	-	+	-
Fibras anguladas atroficas.	-	+	+	-	+	+	-
Fibras basofílicas.	-	-	-	-	-	+	-
Fibras em segmentação.	-	-	-	-	-	-	-
Fibras enrodilhadas.	-	-	-	-	-	-	-
Grumos nucleares.	-	-	-	-	-	-	-
Infiltração tecido adiposo.	-	-	-	-	-	+	-
Infiltrado inflamatório perivascular.	-	-	-	-	-	+	+
Necrose.	-	+	-	-	-	+	+
Núcleos centrais.	-	-	+	-	-	-	-
Proliferação tecido conjuntivo endomisial.	-	-	-	-	-	-	-
Vacúolos marginados.	-	-	-	-	-	-	+
Vacúolos.	-	-	-	-	-	+	+
Variação diâmetro de fibras.	+	+	+	+	+	-	-
ATPases							
Atrofia de fibras tipo 1	+	+	+	-	-	+	+
Atrofia de fibras tipo 2	+	-	-	-	+	-	-
Hipertrofia de fibras tipo 1	-	+	-	-	+	+	+
Hipertrofia de fibras tipo 2	-	+	-	+	+	+	+
Predomínio de fibras tipo 1	+	-	-	+	-	-	-
Predomínio de fibras tipo 2	-	-	-	-	-	-	-
Agrupamento de fibras tipo 1 e 2	-	-	-	-	-	-	-
NADH-tetrazolium redutase							
Anéis	-	-	-	-	-	-	-
Aumento focal do NBT reduzido	+	+	-	+	-	-	+
Fibras angulares escuras atroficas	-	-	+	-	+	-	+
Scabocados	-	-	-	+	-	+	+
Turbilhões	-	+	-	-	-	-	+
ESTERASE INESPECÍFICA							
Aumento em placa motora	-	-	-	-	-	-	-
Aumento atividade mononuclear	-	-	-	-	-	+	-
Angulares atroficas	-	-	+	-	+	-	-
FOSFATASE ÁCIDA							
Aumento focal	-	-	-	-	-	-	+
Células inflamatórias e mononucleares.	-	-	-	-	-	+	-
Conteúdo do vacúolo positivo	-	-	-	-	-	-	-
Fibras positivas	-	-	-	-	-	+	+
Mononucleares perivasculares.	-	-	-	-	-	+	-
Paredes vasculares positivas.	-	-	-	-	-	-	-
FOSFATASE ALCALINA							
Fibras positivas	-	-	-	-	-	-	+
DESIDROGENASE succínica							
Acúmulo subsarcolemal	+	-	+	-	+	-	+
OIL-RED-0							
Aumento de gotículas de gordura	-	-	-	-	-	-	-
Sirus RED							
Aumento tecido conjuntivo	-	-	-	-	-	+	-
PAS							
Cresil Violeta	-	-	-	-	-	-	-
Citocromo C-oxidase	-	-	-	-	-	-	-
Adenilato deaminase	-	-	-	-	-	-	-
Fosforilase	-	-	-	-	-	-	-

Q = quadríceps; B = bíceps; D = deltóide; (-) = ausente; (+) = presente

NADH-TR = nicotinamida adenina dinucleotídeo-tetrazolium redutase; ATPase = adenina trifosfatase; NBT = nitroblue tetrazolium; PAS = ácido periódico Schiff; óleo vermelho zero = OIL-RED-0

ANEXO 6

BIÓPSIA MUSCULAR – HISTOPATOLOGIA

Caso	conclusão						
	61	62	63	62	65	66	67
Músculo estudado:	B	Q	B	Q	B	B	B
Hematoxilina Eosina/Tricromo de Gomori modificado							
Atrofia de pequenos grupos.	+	-	-	-	-	-	-
Fagocitose.	+	-	+	-	-	+	+
Fibras anguladas atroficas.	+	-	-	+	-	+	-
Fibras basofílicas.	+	-	-	-	-	+	+
Fibras em segmentação.	+	-	+	-	-	-	-
Fibras enrodilhadas.	-	-	-	-	-	-	-
Grupos nucleares.	-	-	+	-	-	-	-
Infiltração tecido adiposo.	-	-	-	-	-	+	+
Infiltrado inflamatório perivascular.	-	-	-	-	-	+	-
Necrose.	+	-	+	-	-	+	+
Núcleos centrais.	+	-	+	+	-	-	+
Proliferação tecido conjuntivo endomisial.	+	-	-	-	-	+	+
Vacúolos marginados.	-	-	-	-	-	-	-
Vacúolos.	-	-	-	-	-	-	-
Varição diâmetro de fibras.	+	+	+	+	+	+	+
ATPASES							
Atrofia de fibras tipo 1	+	+	+	+	+	+	-
Atrofia de fibras tipo 2	+	+	-	+	-	+	+
Hipertrofia de fibras tipo 1	+	-	-	+	-	+	+
Hipertrofia de fibras tipo 2	+	-	+	+	-	+	+
Predomínio de fibras tipo 1	-	-	+	-	-	-	-
Predomínio de fibras tipo 2	-	-	-	-	-	-	-
Agrupamento de fibras tipo 1 e 2	-	-	-	-	-	-	-
NADH-tetrazolium redutase							
Anéis	-	-	-	-	-	-	-
Aumento focal do NBT reduzido	+	-	-	-	-	-	-
Fibras angulares escuras atroficas	-	-	-	+	-	+	+
Scabocados	-	-	-	-	-	-	-
Turbilhões	-	-	-	-	-	-	-
ESTERASE INESPECÍFICA							
Aumento em placa motora	-	-	-	-	-	-	-
Aumento atividade mononuclear	-	-	-	-	-	-	-
Angulares atroficas	+	-	-	+	-	+	+
FOSFATASE ÁCIDA							
Aumento focal	+	-	-	-	-	-	+
Células inflamatórias e mononucleares.	+	-	-	-	-	+	-
Conteúdo do vacúolo positivo	-	-	-	-	-	-	-
Fibras positivas	+	-	-	+	-	+	+
Mononucleares perivascularares.	-	-	-	-	-	-	-
Paredes vasculares positivas.	+	-	-	-	-	-	-
FOSFATASE ALCALINA							
Fibras positivas	+	-	-	-	-	+	+
DESIDROGENASE succínica							
Acúmulo subsarcolemal	+	-	-	-	-	-	+
OIL-RED-0							
Aumento de gotículas de gordura	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sirus RED</i>							
Aumento tecido conjuntivo	-	-	-	-	-	-	-
PAS							
Cresil Violeta	-	-	-	-	-	-	-
Citocromo C-oxidase	+	-	-	-	-	-	-
Adenilato deaminase	-	-	-	-	-	-	-
Fosforilase	-	-	-	-	-	-	-

Q = quadríceps; B = bíceps; D = deltóide; (-) = ausente; (+) = presente

NADH-TR = nicotinamida adenina dinucleotídeo-tetrazolium redutase; ATPase = adenina trifosfatase; NBT = nitroblue tetrazolium; PAS = ácido periódico Schiff; óleo vermelho zero = OIL-RED-0

ANEXO 7

SOLUÇÕES

continua

TAMPÃO DE FOSFATO SALINO pH 7,4

Água destilada	500 ml
Fosfato de sódio	6,7 g
Cloreto de sódio	4,0 g
pH da solução	7,4

SOLUÇÃO DE ALBUMINA 1%

Albumina bovina	0,2 g
Tampão fosfato salino	20 ml

GEL DE CORRIDA 10%

Água destilada	4.0 ml
Acrilamida 30 %	3.3 ml
Tris 1.5 Molar (pH 8.8)	2.5 ml
Duodecil sulfato de sódio (SDS) 10%	0.1 ml
Persulfato de amônia 10%	0.1 ml
N,N,N',N'-tetrametilenediamine (TEMED)	0.004 ml

GEL DE EMPILHAMENTO 5%

Água destilada	6.8 ml
Acrilamida 30 %	1.7 ml
Tris 1.0 Molar (pH 6.8)	1.25 ml
SDS 10%	0.1 ml
Persulfato de amônia 10%	0.1 ml
TEMED	0.01 ml

SOLUÇÃO TRIS 1.5 Molar (pH 8.8)

Água destilada	1000 ml
Tris	18.171 g
pH da solução	8.8

SOLUÇÃO TRIS 1 MOLAR (pH 6.8)

Água destilada	1000 ml
Tris	12.114 g
pH da solução	6.8

ANEXO 7

continuação

SOLUÇÃO TRIS-HCL 0,125 MOL/L

Água destilada	500 ml
Tris	
pH da solução	6,4

SOLUÇÃO DE HOMOGENEIZAÇÃO

Solução Tris-HCl 0,125 mol/L pH 6.4	100 ml
Glicerol 10%	10 ml
SDS 10%	4 ml
Uréia	24.02 g
Mercaptoetanol 10%	10 ml
Bromofenol azul	0.001 g

SOLUÇÃO DE CORRIDA

Água destilada	1300 ml
Tris	3.9 g
SDS 10 %	2,6 g
Glicínia	18.72 g

SOLUÇÃO DE TRANSFERÊNCIA

Água destilada	800 ml
Metanol	200 ml
Tris	6 g
Glicínia	28.8 g
SDS	0.10 g

SOLUÇÃO TRIS/TWENN 20 (TBST)

Água destilada	1000 ml
Twenn 20	0.5 ml
Tris	0.12114 g
Cloreto de sódio	8.7675 g
pH da solução	8

SOLUÇÃO PRÉ-INCUBADORA

Solução de TBST	1000 ml
Leite desnatado em pó	50 g

ANEXO 7

conclusão

SOLUÇÃO INCUBADORA

Solução de TBST	50 ml
Anticorpo anticalpaína (Novocastra/NCL-12A2, Newcastle upon Tyne - UK)	500 µl

SOLUÇÃO PÓS-INCUBADORA

Solução de TBST	50 ml
Anticorpo de ovelha anticamundogo, para reação por peroxidase (Amersham/NA931, Littel Chalfont - UK)	50 µl

SOLUÇÃO DE EXPOSIÇÃO

Tampão fosfato salino 1 molar, pH 7.2	100 ml
Diaminobenzidine	0.05 g
Peróxido de Hidrogênio	0.1 g

ANEXO 8

BIÓPSIA MUSCULAR – IMUNO-HISTOQUÍMICA DA DISTROFINA, α -SG, β -SG, γ -SG, δ -SG, DISFERLINA, β -DG E WESTERN BLOT DA CALPAÍNA-3.

Caso	Distrofina Carboxila	Distrofina Amino	Distrofina Rod	α -SG	β -SG	γ -SG	δ -SG	Disferlina	β -DG	Calpaina-3
1	N	N	N	A	A	A	A	N	T	NR
2	N	N	N	T	A	T	T	N	T	NR
8	N	N	N	T	R	T	R	N	R	NR
10	N	N	N	N	NR	N	NR	NR	R	NR
11	N	N	N	N	N	N	N	N	N	D
12	N	N	N	N	NR	N	NR	NR	N	NR
13	N	N	N	N	N	N	N	A	N	NR
14	N	N	N	N	N	N	N	N	N	NR
15	N	N	N	N	NR	N	NR	NR	N	NR
16	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
17	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
19	N	N	N	N	R	N	R	N	N	NR
20	N	N	N	N	R	N	R	N	N	NR
21	N	N	N	N	N	N	N	T	N	NR
22	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
23	N	N	N	T	NR	A	N	N	A	NR
25	N	N	N	R	NR	N	N	N	N	NR
27	N	N	N	N	NR	N	NR	NR	N	NR
28	N	N	N	N	NR	N	NR	NR	N	NR
29	N	N	N	N	NR	N	NR	NR	N	NR
30	N	N	N	N	N	N	N	N	N	D
31	N	N	N	N	N	N	N	A	N	NR
32	N	N	N	R	R	R	R	N	R	NR
33	N	N	N	R	NR	N	NR	NR	N	NR
32	N	N	N	N	NR	N	NR	NR	N	NR
35	N	N	N	N	N	N	N	N	N	D
36	N	N	N	N	N	N	N	N	N	D
37	N	N	N	N	N	N	N	A	N	NR
38	N	N	N	N	N	N	N	A	N	NR
39	N	N	N	N	N	N	N	A	N	NR
20	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
21	N	N	N	N	NR	N	NR	NR	N	NR
22	N	N	N	N	R	R	R	N	N	NR
23	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
22	N	N	N	N	NR	N	NR	NR	N	NR
25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	NR
26	N	N	N	N	N	N	N	N	N	NR
27	N	N	N	N	N	N	N	A	N	NR
28	N	N	N	N	N	N	N	N	N	NR
29	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
50	N	N	N	N	N	N	N	A	N	NR
51	N	N	N	N	A	A	A	N	T	NR
52	N	N	N	R	N	N	N	N	N	NR
55	N	N	N	N	NR	N	NR	NR	N	NR
56	N	N	N	R	T	T	R	N	N	NR
57	N	N	N	N	N	N	N	N	N	NR
58	N	N	N	R	N	A	R	N	N	N
59	N	N	N	T	A	A	T	N	R	NR
60	N	N	N	N	NR	N	N	N	NR	D
61	N	N	N	N	NR	N	N	N	NR	N
62	N	N	N	D	NR	N	N	N	NR	NR
63	N	N	N	N	NR	N	N	N	NR	N
62	N	N	N	N	N	N	D	N	NR	NR
65	N	N	N	N	N	N	N	N	NR	NR
66	N	N	N	T	T	T	T	N	NR	NR
67	N	N	N	N	N	N	N	A	NR	NR

A = ausente; T = traços; R = reduzido; N = normal; NR = não realizado

ANEXO 9

CÁLCULOS ESTATÍSTICOS

TESTE EXATO DE FICHER REFERENTE À TABELA 43 continua

Grupos de imunoidentificação Variáveis	A e B	A e C	A e D	B e C	B e D	C e D
Varição diâmetro fibras/HE	(1)	(1)	p=0,308	(1)	p=1,000	p=1,000
Atrofia fibras tipo 1/ATPase	p=1,000	p=1,000	p=1,000	p=1,000	p=1,000	p=1,000
Atrofia de fibras tipo 2/ATPase	p=1,000	p=1,000	p=0,635	p=1,000	p=1,000	p=1,000
Hipertrofia fibras tipo 1/ATPase	p=1,000	p=1,000	p=1,000	p=1,000	p=1,000	p=1,000
Hipertrofia fibras tipo 2/ATPase	p=1,000	p=1,000	p=0,375	p=1,000	p=1,000	p=1,000
Fibras atroficas/HE	p=1,000	p=0,272	p=1,000	p=0,487	p=1,000	p=0,487
Fibras anguladas atroficas/NADH-TR	p=0,664	p=0,343	p=0,375	p=1,000	p=0,282	p=0,217
Fibras anguladas atroficas/Esterase	p=1,000	p=0,339	p=1,000	p=0,565	p=1,000	p=0,565
Atrofia de pequenos grupos/HE	p=0,529	p=1,000	p=0,072	p=1,000	p=0,569	p=0,231

(1) Não pode ser calculado em razão de os valores serem uma constante

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado

HE = hematoxilina e eosina; ATPase = adenosina trifosfatase; NADH-TR = nicotinamida adenina dinucleotídeo tetrazolium redutase

TESTE EXATO DE FICHER REFERENTE À TABELA 44

Grupos de imunoidentificação Variáveis	A e B	A e C	A e D	B e C	B e D	C e D
Predomínio de fibras tipo 1/ATPase	p=0,529	p=0,291	p=1,000	p=0,128	p=1,000	p=0,510
Predomínio de fibras tipo 2/ATPase	p=1,000	p=1,000	p=0,529	(1)	p=1,000	p=1,000
Agrupamentos de fibras 1 e 2/ATPase	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)

(1) Não pode ser calculado em razão de os valores serem uma constante.

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado

HE = hematoxilina e eosina; ATPase = adenosina trifosfatase; NADH-TR = nicotinamida adenina dinucleotídeo - tetrazolium redutase

TESTE EXATO DE FICHER REFERENTE À TABELA 45

Grupos de imunoidentificação Variáveis	A e B	A e C	A e D	B e C	B e D	C e D
Núcleos centrais/HE	p=0,375	p=1,000	p=0,375	p=0,510	p=1,000	p=0,510
Grupos nucleares/HE	p=0,218	p=0,539	p=0,281	p=1,000	p=1,000	p=1,000

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado

HE = hematoxilina e eosina

TESTE EXATO DE FICHER REFERENTE À TABELA 46

Grupos de imunoidentificação						conclusão
	A e B	A e C	A e D	B e C	B e D	C e D
Variáveis						
Fibras em necrose/HE	p=0,216	p=0,317	p=0,673	p=1,000	p=1,000	p=1,000
Fibras basofílicas/HE	p=0,635	p=1,000	p=0,197	p=1,000	p=1,000	p=0,565
Fibras em segmentação/HE	p=0,667	p=0,618	p=0,683	p=0,293	p=0,608	p=1,000

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado
HE = hematoxilina e eosina

TESTE EXATO DE FICHER REFERENTE À TABELA 47

Grupos de imunoidentificação						
	A e B	A e C	A e D	B e C	B e D	C e D
Variáveis						
Infiltrado inflamatório perivascular/HE	p=0,420	p=0,611	p=0,420	p=1,000	p=1,000	p=1,000
Proliferação do tecido adiposo/HE	p=0,216	p=0,640	p=1,000	p=1,000	p=0,608	p=1,000
Proliferação do tecido endomisial/HE	p=0,216	p=0,640	p=0,673	p=1,000	p=1,000	p=1,000
Proliferação do tecido endomisial/ "Sirius Red"	p=0,189	p=1,000	p=0,628	p=0,266	p=0,119	p=1,000

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado
HE = hematoxilina e eosina

TESTE EXATO DE FICHER REFERENTE À TABELA 48

Grupos de imunoidentificação						
	A e B	A e C	A e D	B e C	B e D	C e D
Variáveis						
Saca-bocados/NADH-TR	p=0,683	p=0,618	p=0,360	p=1,000	p=0,282	p=0,217
Turbilhões/NADH-TR	p=0,667	p=0,056	p=1,000	p=0,266	p=1,000	p=0,103
Aumento NBT reduzido/NADH-TR	p=1,000	p=0,194	p=0,563	p=0,510	p=1,000	p=1,000
Vacúolos/NADH-TR	p=0,308	p=0,080	p=0,308	p=0,510	p=1,000	p=0,510
Vacúolos marginados/NADH-TR	p=0,529	p=1,000	p=1,000	p=1,000	p=1,000	(1)
Aumento de gotículas de gordura/OIL-RED-0	p=0,086	(1)	p=0,308	p=0,487	p=1,000	p=1,000
Citocromo C oxidase	(1)	p=0,308	(1)	(1)	p=1,000	p=1,000

(1) Não pode ser calculado em razão de os valores serem uma constante

A = sarcoglicanopatia; B = disferlinopatia; C = calpainopatia; D = não classificado
HE = hematoxilina e eosina; ATPase = adenosina trifosfatase; NADH-TR = nicotinamida adenina dinucleotídeo - tetrazolium redutase; NBT = nitroblue tetrazolium; óleo vermelho zero = OIL-RED-0