

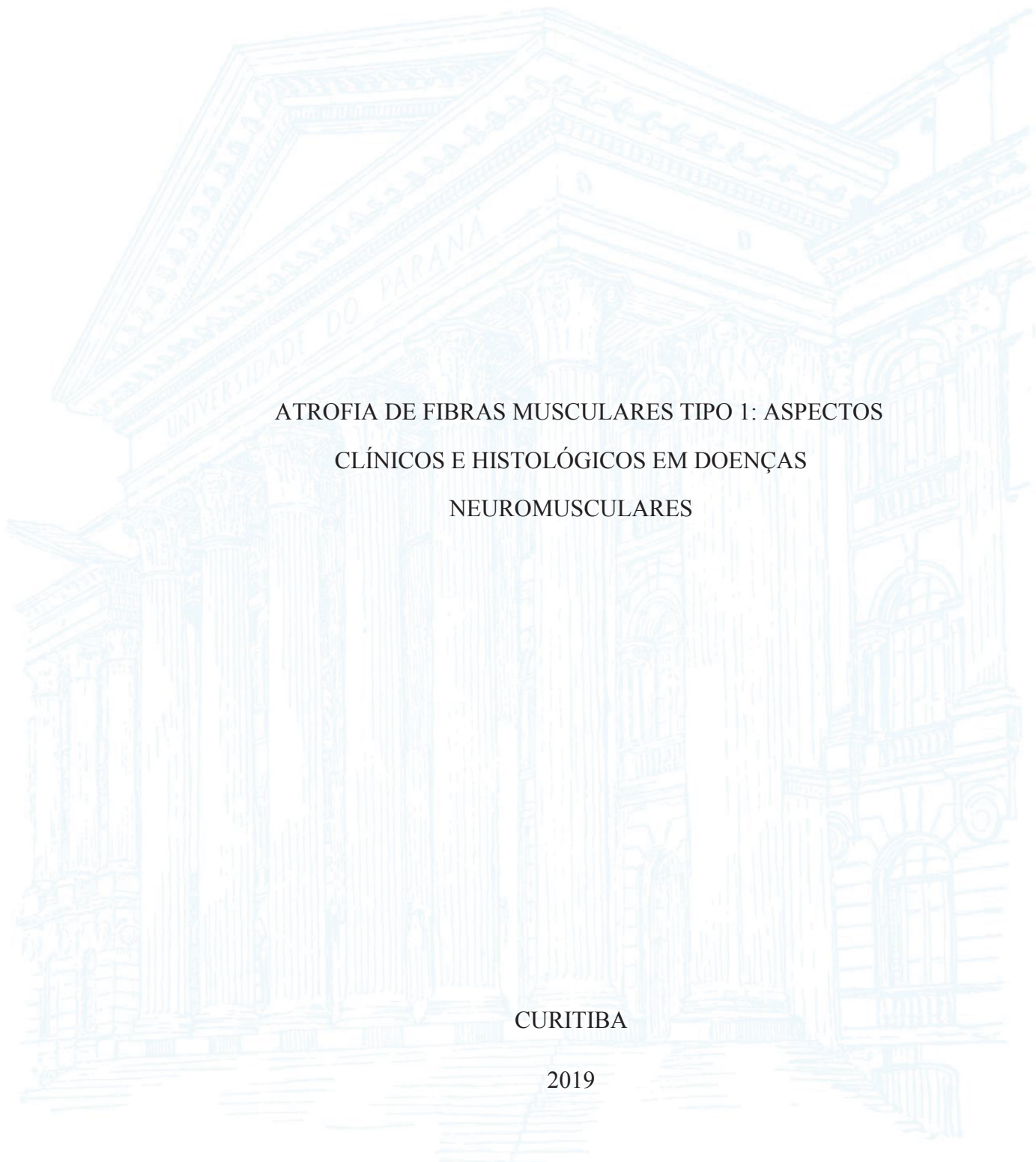
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCIANE FILLA

ATROFIA DE FIBRAS MUSCULARES TIPO 1: ASPECTOS  
CLÍNICOS E HISTOLÓGICOS EM DOENÇAS  
NEUROMUSCULARES

CURITIBA

2019



LUCIANE FILLA

ATROFIA DE FIBRAS MUSCULARES TIPO 1: ASPECTOS  
CLÍNICOS E HISTOLÓGICOS EM DOENÇAS  
NEUROMUSCULARES

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Setor Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Medicina Interna.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosana H. Scola

CURITIBA

2019

F484 Filla, Luciane

Atrofia de fibras musculares tipo 1: aspectos clínicos e histológicos em doenças neuromusculares [recurso eletrônico] / Luciane Filla. – Curitiba, 2019.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosana Herminia Scola

1. Fibras musculares de contração lenta. 2. Doenças neuromusculares. 3. Biópsia. I. Scola, Rosana Herminia. II. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

NLMC: WE 550

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR  
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, BIBLIOTECÁRIA: RAQUEL PINHEIRO COSTA  
JORDÃO CRB 9/991

# TERMO DE APROVAÇÃO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA INTERNA E  
CIÊNCIAS DA SAÚDE - 40001016012P1

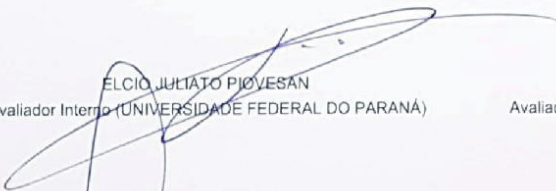
## TERMO DE APROVAÇÃO


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **LUCIANE FILLA** intitulada: **ATROFIA DE FIBRAS MUSCULARES TIPO I: ASPECTOS CLÍNICOS E HISTOLÓGICOS EM DOENÇAS NEUROMUSCULARES**, sob orientação da Profa. Dra. ROSANA HERMINIA SCOLA, que após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.


A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.


CURITIBA, 19 de Julho de 2019.

  
ROSANA HERMINIA SCOLA  
Presidente da Banca Examinadora

  
ELCIO JULIATO PIOVESAN  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

  
CARLOS ALEXANDRE TWARDOWSCHY  
Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ)

  
RENATO PUPPI MUNHOZ  
Avaliador Externo (UNIVERSITY OF TORONTO - CANADA)

  
CARLOS EDUARDO SOARES SILVADO  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico a minha família, aos professores, que muito me ensinaram da arte da Neurologia, e aos pacientes.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus que permitiu que este momento fosse vivido.

Agradeço aos meus pais, meus irmãos e minha cunhada pelo amor, pela paciência e pelo auxílio.

Também agradeço aos amigos que estiveram ao meu lado nessa jornada.

Agradeço a todos os professores que muito me ensinaram sobre a arte da Neurologia.

Agradeço a minha orientadora, professora doutora Rosana H. Scola, pelos ensinamentos que possibilitaram que eu realizasse este trabalho, assim como agradeço ao doutor Lineu César Werneck e toda a equipe do Serviço de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Federal do Paraná (UFPR): doutora Renata Dal-Prá Ducci, doutora Claudia Suemi Kamoi Kay e doutor Paulo José Lorenzoni.

Agradeço à equipe do laboratório do Serviço de Doenças Neuromusculares do HC-UFPR: Nívea, Eunice e Raquel.

Agradeço à professora Solena Ziemer Kusma, pelo auxílio na análise estatística.

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, tornaram este trabalho possível.

## RESUMO

**Introdução:** o músculo esquelético humano é formado por fibras musculares tipo 1, 2A e 2B, as proporções e tamanho dos tipos de fibras são semelhantes e formam um mosaico. Quando as fibras musculares tipo 1 forem, pelo menos, 12% menores que as fibras musculares tipo 2 há presença de Atrofia de Fibras Musculares Tipo 1 (AFMT1). A AFMT1 é considerada um sinal patológico, relacionado principalmente a doenças musculares, mas não é um achado exclusivo dessas doenças. Há poucos dados sobre a frequência e as características dessa condição, principalmente em se tratando de pacientes adultos. O objetivo deste estudo é avaliar características clínicas e histológicas em crianças e adultos com AFMT1 como diagnóstico histopatológico. **Métodos:** este é um estudo retrospectivo que incluiu 49 pacientes com diagnóstico histopatológico de AFMT1. Os pacientes foram divididos em 2 grupos: grupo A, composto por 21 pacientes com 14 anos ou mais, e grupo B, composto por 28 pacientes menores de 14 anos. Em ambos os grupos, aspectos clínicos e histológicos foram avaliados, bem como foram realizadas avaliações morfológicas das biópsias musculares (afirmação do tamanho das fibras musculares, fator de atrofia e hipertrofia). A análise dos dados foi realizada pelo programa *Computacional Statistical Package for the Social Sciences*. **Resultados:** em ambos os grupos uma heterogenicidade de doenças foi observada, sendo as doenças neuromusculares os diagnósticos mais observados. A Distrofia Miotônica Tipo 1 foi o diagnóstico mais observado no grupo adulto, grupo A, enquanto no grupo infantil, grupo B, o diagnóstico mais frequente foi Miopatia Congênita. A fraqueza muscular foi o sintoma mais comum em ambos os grupos. Não houve diferença estatística ao comparar quantitativamente a Atrofia das fibras tipo 1 entre os grupos A e B. **Conclusões:** O diagnóstico histopatológico de AFMT1 é um achado pouco frequente, mas é um dado importante e útil no diagnóstico etiológico em adultos e crianças.

**Palavras-chave:** Atrofia das fibras musculares do tipo 1. Biópsia muscular. Histoquímica. Tamanho da fibra. Tipo de fibra muscular.

## ABSTRACT

**Introduction:** The human skeletal muscle is a mosaic of type 1, 2A, and 2B muscle fibers, with similar ratios and sizes. Type 1 muscle fiber atrophy (T1MFA) occurs when type 1 muscle fibers are at least 12% smaller than type 2 muscle fibers. T1MFA is considered a pathological entity associated with several muscle diseases, although it does not occur exclusively in these disorders. Limited data are available regarding the prevalence and characteristics of this condition, particularly in adults. This study investigated the clinical and histopathological features of T1MFA in children and adults with a histopathological diagnosis of this condition. **Methods:** This retrospective study included 49 patients with histopathological diagnosis of T1MFA. Patients were categorized into group A (21 patients aged  $\geq 14$  years) and group B (28 patients aged  $< 14$  years). Clinical and histopathological characteristics, as well as morphometric features based on muscle biopsy (measurement of muscle fiber size, atrophy, or hypertrophy) were evaluated in both groups. Data analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences software. **Results:** Both groups showed heterogeneity of diseases; however, most patients were diagnosed with neuromuscular conditions. Type 1 myotonic dystrophy and congenital myopathy were the most common diagnoses in adults (group A) and in infants (group B), respectively. Muscle weakness was the most common symptom in both groups. No statistically significant intergroup difference was observed in quantitative parameters of T1MFA. **Conclusions:** Histopathological diagnosis of T1MFA is an uncommon but important and useful finding in establishing etiological diagnosis in adults and children.

**Keywords:** Type 1 muscle fiber atrophy. Muscle biopsy. Histochemistry. Fiber size. Fiber muscle type.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 - Aferição do tamanho das fibras musculares .....	25
Gráfico 01 - Medidas das fibras musculares grupo A .....	30
Gráfico 02 - Medidas das fibras musculares grupo B .....	32
Tabela 01 - Miopatias congênicas e principais genes relacionados .....	18
Tabela 02 - Painel de métodos histoquímicos para análise da biópsia muscular .....	20
Tabela 03 - Limites superiores para o valor de atrofia e hipertrofia em adultos.....	26
Tabela 04 - Fatores de atrofia e hipertrofia grupo A .....	28
Tabela 05 - Diagnóstico, sinais e sintomas grupo A .....	30
Tabela 06 - Fatores de atrofia e hipertrofia grupo B .....	31
Tabela 07 - Diagnóstico, sinais e sintomas grupo B .....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Difosfato de adenosina
AFMT1	Atrofia de fibras musculares tipo 1
AFMT2	Atrofia de fibras musculares tipo 2
ATP	Trifosfato de adenosina
ATPase	Adenosinetrifosfatase
DMT1	Distrofia Miotônica Tipo 1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
MHC	Miosina específica isoforme de cadeia pesada
MHCI	Miosina específica isoforme de cadeia pesada tipo 1
MHCII	Miosina específica isoforme de cadeia pesada tipo 2
RNA	Ácido ribonucleico
UFPR	Universidade Federal do Paraná

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu\text{m}$	Micrômetros
%	Porcentagem

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1	O MÚSCULO ESQUELÉTICO .....	13
1.2	ATROFIA DE FIBRAS TIPO 1 .....	15
1.3	MIOPATIAS CONGÊNITAS .....	17
1.4	DISTROFIA MIOTÔNICA TIPO 1 .....	19
1.5	BIÓPSIA MUSCULAR .....	19
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	24
3.1	ETAPA I .....	24
3.2	ETAPA II .....	24
3.3	ETAPA III .....	25
3.4	ETAPA IV .....	26
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	28
4.1	GRUPO A .....	28
4.2	GRUPO B .....	30
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	34
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	38
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	39
	<b>APÊNDICES</b> .....	42
	APÊNDICE A - FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS DOS PRONTUÁRIOS .....	42
	APÊNDICE B – HISTOGRAMA .....	43
	APÊNDICE C – FATOR DE ATROFIA .....	44
	APÊNDICE D - TABELA DE DADOS GRUPO A .....	45
	APÊNDICE E- TABELA DE DADOS GRUPO B .....	46
	APÊNDICE F- ARTIGO .....	48

## 1 INTRODUÇÃO

O músculo esquelético humano corresponde a cerca de 40% da massa corporal e tem importante função motora. É formado por fibras musculares tipos 1, tipo 2 A, tipo 2 B e tipo 2 C. As proporções de fibras dos tipos 1, 2A e 2B são parecidas, com pequenas diferenças de acordo com a função principal do músculo, e formam um mosaico. A fibra muscular tipo 2C não está presente (ou em pequena proporção) no músculo maduro, porém ocorre no feto e em condições patológicas. Essa distribuição das fibras musculares é plástica, pois elas têm a capacidade de se remodelar para adaptar o músculo aos diferentes usos e estados metabólicos. (DUBOWITZ; OLDFORDS; SEWRY, 2013; SANCHEZ *et al.*, 2013).

O diâmetro das fibras musculares varia de 10 a 80 micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), sendo que as fibras tipo 1 e tipo 2 têm tamanho e distribuição semelhantes. E quando as fibras musculares tipo 1 forem ao menos 12% menores que as fibras musculares tipo 2, considera-se que há Atrofia de Fibras Musculares Tipo 1 (AFMT1), sendo um sinal patológico principalmente relacionado a doenças musculares. Já a Atrofia de Fibras Musculares Tipo 2 (AFMT2) é considerada um dado patológico inespecífico, uma vez que pode ser encontrada em uma variedade de doenças, incluindo doenças do Sistema Nervoso Central. (DUBOWITZ; OLDFORDS; SEWRY, 2013; IMOTO ; NONAKA, 2001).

Dessa forma, a AFMT1, como diagnóstico histopatológico, é um dado importante que pode auxiliar na elucidação da fisiopatologia da doença bem como no diagnóstico etiológico. Há poucos dados sobre a frequência e as características dessa condição, relacionada, principalmente, a humanos adultos.

## 1.1 O MÚSCULO ESQUELÉTICO

O músculo esquelético é derivado, embriologicamente, da mesoderme, e sua diferenciação e desenvolvimento são controlados por um grupo de fatores de transcrição chamados Fatores Miogênicos Reguladores. Uma vez ativados, esses fatores se ligam a regiões específicas do DNA, estimulando a transcrição de genes. Esse mecanismo expressa o fenótipo da fibra muscular, pois controla a expressão das proteínas miofibrilares, regulando a diversidade, a plasticidade e a especialização do músculo esquelético. Assim, os fatores de transcrição transformam as células mesodérmicas em mioblastos, e estes se transformam em miócitos, células mononucleadas, que a seguir se unem caracterizando a fibra muscular multinucleada. A diferenciação dos tipos de fibras musculares, isto é, fibras tipo 1 e tipo 2, inicia-se gradativamente a partir da 20ª semana de vida fetal e se torna visivelmente diferenciada após a 28ª semana. (DUBOWITZ; OLDFORDS; SEWRY, 2013).

O músculo esquelético é formado por fibras musculares que são células cilíndricas longas e multinucleadas que contêm miofibrilas, as proteínas miofibrilares miosina e actina. Os numerosos núcleos se localizam na periferia da fibra, próximo ao sarcolema (membrana da fibra muscular), que é envolvida pelo endomísio, tecido conjuntivo. (DUBOWITZ; OLDFORDS; SEWRY, 2013).

A molécula de miosina é composta por seis polipeptídios: duas cadeias pesadas e 4, leves. As cadeias pesadas contêm uma região chamada de Cabeça da Miosina, a qual interage com a actina e permite a contração muscular. Essa região da cabeça também contém um sítio de ligação do Trifosfato de Adenosina (ATP) e serve como enzima (Adenosinetrifosfatase [ATPase]) para a hidrólise do ATP em Difosfato de Adenosina (ADP) e Fosfato Inorgânico, que fornece a energia necessária para a contração muscular. As cadeias pesadas de miosina são diferentes em cada tipo de fibra muscular e são chamadas de Miosina Específica Isoforme de Cadeia Pesada (MHC) o que determina o perfil metabólico e o fenótipo da fibra. (SCOTT; STEVENS; BINDER-MACLEOD, 2001).

Inicialmente, os músculos eram classificados como sendo rápidos ou lentos, com base nas velocidades de seu encurtamento. Isso também correspondia a uma diferença morfológica, sendo os músculos rápidos, brancos em algumas espécies, e os músculos lentos, vermelhos. A coloração avermelhada é resultado de elevadas quantidades de mioglobina, proteína transportadora de oxigênio, e de alto conteúdo capilar. Assim, o maior volume de mioglobina e de vasos capilares contribui para a maior capacidade oxidativa dos músculos vermelhos em comparação com os brancos. Com o advento da análise histoquímica, observa-se que há uma

correlação entre as atividades da ATPase da miosina e a velocidade de encurtamento, podendo-se, então, diferenciar os tipos de fibras musculares na biópsia muscular. Sendo assim, as tais fibras foram classificadas em tipo 1, lentas, e tipo 2, rápidas, sendo que estas últimas ainda são subdivididas em A, B e C, de acordo com seu metabolismo predominante. (SCOTT; STEVENS; BINDER-MACLEOD, 2001).

As fibras tipo 1, Miosina Específica Isoforme de Cadeia Pesada Tipo 1 (MHCI), de contração lenta, têm metabolismo predominantemente aeróbico, apresentando, assim, maior vascularização, mitocôndrias e enzimas oxidativas, bem como maior resistência à fadiga. Já as fibras tipo 2, Miosina Específica Isoforme de Cadeia Pesada Tipo 2 (MHCII), de contração rápida, têm metabolismo predominantemente glicolítico associado ao metabolismo oxidativo em maior e menor graus, e apresentam menor resistência à fadiga.

As fibras tipo 2, conforme já apontado, são subdivididas em:

- fibra tipo 2A: metabolismo glicolítico predominante, mas com maior capacidade oxidativa do que as fibras tipo 2B;

- fibra tipo 2B: metabolismo glicolítico predominante, com menor capacidade oxidativa;

- fibra tipo 2C: metabolismo glicolítico predominante, com maior capacidade oxidativa do que as fibras tipo 2A e tipo 2B. Este tipo não está presente (ou em pequena proporção) no músculo maduro, porém ocorre no feto e em condições patológicas. (DUBOWITZ; OLDFORDS; SEWRY, 2013; TALBOT; MAVES, 2016).

As proporções e o tamanho das fibras dos tipos 1, 2A e 2B são parecidos, formando um mosaico. Com um ano de idade, o diâmetro médio da fibra muscular é de 15  $\mu\text{m}$  e cresce, anualmente, de 2 a 4  $\mu\text{m}$ , até esta estar madura, com a idade média de 14 anos. (DUBOWITZ; OLDFORDS; SEWRY, 2013).

O músculo esquelético é um órgão dinâmico, que apresenta plasticidade, isto é, as fibras musculares têm capacidade de alterar suas propriedades fisiológicas e bioquímicas de acordo com os estímulos a que são submetidas. Assim, a distribuição e o tamanho das fibras, o mosaico, podem ser alterados, de acordo com o estímulo, patológico ou não. São vários os estímulos que atuam sobre o músculo, desde idade, hormônios e atividade física. (CICILIOT *et al.*, 2013; JOHNS; STEPHENS; FEARON, 2013; TALBOT; MAVES, 2016).

A atrofia e a hipertrofia são respostas comuns do músculo esquelético. A atrofia está relacionada ao estado catabólico das proteínas estruturais, principalmente as miofibrilas, que excede o anabolismo. E na hipertrofia ocorre o inverso. Várias condições patológicas, hereditárias e adquiridas como doenças neuromusculares, Câncer, Diabetes, Insuficiência Cardíaca, Caquexia, Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), entre outras, levam à atrofia

muscular. (CICILIOT *et al.*, 2013; JOHNS; STEPHENS; FEARON, 2013; TALBOT; MAVES, 2016).

Os tipos de fibras musculares são diferentemente sensíveis aos estímulos atrofícos patofisiológicos. Por exemplo, as fibras tipo 1 são mais suscetíveis a inatividade, microgravidade e atrofia induzida por desnervação, enquanto que as fibras tipo 2 são mais vulneráveis à Caquexia, Diabetes, Insuficiência Cardíaca Crônica e Neoplasias. Os mecanismos patofisiológicos para essa seletividade das fibras ainda não são muito bem elucidados, mas estudos mostram a influência dos fatores de regulação de microautofagia, fator beta de transformação do crescimento, fator nuclear, entre outros. (CICILIOT *et al.*, 2013; TALBOT; MAVES, 2016; WING, 2013).

Os tipos de fibras do músculo esquelético apresentam proporções variáveis. O músculo sóleo, por exemplo, é composto, predominantemente, por fibras tipo 1, enquanto que o músculo tríceps braquial, por fibras tipo 2. Essas proporções também são plásticas, pois as fibras musculares têm a capacidade de remodelar seus fenótipos para ajudar os músculos a se adaptarem aos diferentes usos. Dessa forma, condições patológicas podem alterar tanto a proporção do tipo de fibras quanto seu tamanho. (TALBOT; MAVES, 2016).

A diversidade na fisiologia da contração e a atividade metabólica dos diferentes tipos de fibras, juntamente com a plasticidade destes, não apenas fornecem uma ampla gama de funções, mas também proporcionam suscetibilidade diferente a certas doenças musculares. Análises bioinformáticas identificaram numerosos microRNAs, preferencialmente expressos em músculos lentos ou rápidos, que fornecem mecanismos reguladores para conferir essa suscetibilidade diferente aos tipos de fibras. Dessa forma, há patologias que apresentam AFMT1 e outras, AFMT2. A Atrofia de Fibras Musculares Tipo 2 é considerada um dado inespecífico, uma vez que é encontrada em uma variedade de doenças sistêmicas e neurológicas, incluindo doenças do Sistema Nervoso Central. Já a AFTM1 é considerada um sinal patognomônico de doença, principalmente relacionado a doenças primárias do músculo. (CICILIOT *et al.*, 2013; DUBOWITZ; OLDFORDS; SEWRY, 2013; TALBOT; MAVES, 2016).

## 1.2 ATROFIA DE FIBRAS TIPO 1

A Atrofia Seletiva de Fibras Tipo 1 é definida quando a média do tamanho das fibras musculares tipo 1 forem, ao menos, 12% menores que as fibras musculares tipo 2, o que segundo Dubowitz, Oldfords e Sewry (2013) é um sinal patognomônico de doença,

relacionado, principalmente, a doenças primárias do músculo. Estudos mostram que AFMT1 está mais presente nas doenças primárias do músculo, geneticamente determinadas, sendo Miopatia Congênita e Distrofia Miotônica Tipo 1 as principais delas. (TALBOT; MAVES, 2016).

Há várias doenças musculares hereditárias e adquiridas que afetam especificamente um tipo de fibra, e os motivos pelos quais acontece em algumas doenças musculares e em outras não, é incerto. Dessa forma, o acometimento específico de um tipo de fibra é um dado importante, que pode auxiliar na compreensão de algumas patologias. Talbot e Maves (2016) descreveram o acometimento específico dos tipos de fibras musculares em algumas doenças, destacando-se as doenças neuromusculares. Nessa revisão, a AFMT1 é observada na Desproporção Congênita de Fibras, Miosinopatias, Distrofia Miotônica Tipo 1 e inatividade muscular, enquanto a AFMT2 é observada na Doença de Pompe e Sarcopenia.

Imoto e Nonaka (2001) descreveram a importância da AFMT1 em um grupo infantil (menores de 15 anos) e os seguintes diagnósticos etiológicos foram observados na presença de AFMT1: Miopatia Congênita, Distrofia Muscular de Duchenne e de Becker, Polimiosite, Síndrome do Homem Rígido, Osteogênese Imperfeita, Síndrome de Engelman e Distonia. O diagnóstico mais frequente foi de Miopatia Congênita, destacando-se a Desproporção Congênita de Fibras. Em alguns casos, além da AFMT1, também foram encontradas deficiência de fibras tipo 2 e predominância de fibras tipo 1 relacionadas aos diferentes diagnósticos.

No estudo de Imoto e Nonaka (2001), observou-se AFMT1 em 6,7% das biópsias musculares avaliadas, mostrando que não é um achado muito comum, ainda mais sendo o único achado histopatológico. Além disso, observou-se que essa descoberta está relacionada a várias doenças, principalmente as doenças neuromusculares. Tais doenças compõem um grupo heterogêneo de doenças que acometem a unidade motora, composta por neurônio motor, raiz nervosa, nervo periférico, junção neuromuscular e músculo. Essas doenças apresentam quadro clínico variado e podem apresentar-se fenotipicamente semelhantes, sendo a fraqueza muscular o principal sintoma delas. (REED, 2002).

O diagnóstico histopatológico de AFMT1 na biópsia muscular é um dado importante, que pode auxiliar na elucidação da fisiopatologia da doença bem como no diagnóstico etiológico, em se tratando, principalmente, de doenças primárias do músculo como miopatias congênitas e algumas formas de distrofias musculares.

### 1.3 MIOPATIAS CONGÊNITAS

As miopatias congênitas são um grupo heterogêneo de doenças primárias e de alterações estruturais da fibra muscular, de etiologia genética. Os principais sintomas são hipotonia e fraqueza muscular, geralmente ao nascimento ou nos primeiros anos de vida, podendo evoluir gradualmente. A presença de alterações histopatológicas particulares na biópsia muscular distingue essas condições de outras doenças neuromusculares, bem como determina a classificação dos subtipos das miopatias congênitas. A epidemiologia das miopatias congênitas é desconhecida, mas tem uma incidência estimada de 1:25000 indivíduos. (CASSANDRINI *et al.*, 2017).

Nos últimos anos foram feitas muitas descobertas genéticas em relação às miopatias congênitas. Há, pelo menos, 32 mutações genéticas descritas. E estas podem se apresentar com uma ampla variedade de fenótipos clínicos e histopatológicos, bem como mutações diferentes podem apresentar as mesmas características histopatológicas. (GONORAZKY; BÖNNEMANN; DOWLING, 2018). Dessa forma, a classificação das miopatias congênitas está em revisão constante à medida que mais genes são identificados, mas a classificação ainda utilizada é a que se baseia nas alterações histopatológicas. São classificadas em 5 tipos:

- Miopatia com acúmulos proteicos (bastões nemalínicos);
- Miopatia com *cores*;
- Miopatia com núcleo central: miopatia miotubular e miopatia centronuclear autossômica;
- Desproporção Congênita de Fibras; e
- Miopatia com acúmulo de miosina. (CASSANDRINI *et al.*, 2017; NORTH *et al.*, 2014).

A Tabela 01 mostra as principais miopatias congênitas e seus principais genes relacionados.

Tabela 01 - Miopatias congênitas e principais genes relacionados

Genes													
	ACTA1	NEB	MTM1	MYH7	DNM2	RYR1	TPM2	TPM3	TNNT1	CFL2	SEPNI	BIN1	TIN
<b>Miopia Nemalínica</b>	+	+				+	+	+	+	+			
<b>Miopia Core</b>				+		+					+		
<b>Miopia Centronuclear</b>			+		+	+						+	+
<b>Miopia Miotubular</b>			+										
<b>Desproporção Congênita de Fibras</b>	+			+		+	+	+			+		
<b>Miopia com Acúmulo de Miosina</b>				+									

Fonte: Adaptado de Cassandrini *et al.*, 2017, p. 113.

Os achados histopatológicos na biópsia muscular são determinantes nos subtipos das miopatias congênitas. A AFMT1, como único achado histológico, é característica da Desproporção Congênita de Fibras, mas pode estar presente nos outros subtipos também. Imoto e Nonaka (2001) observaram, em sua amostra, que AFMT1 estava presente em 45% dos pacientes com Miopia Nemalínica, em 59% dos pacientes com Miopia Miotubular, em 95 a 100% dos pacientes com Miopia Central *Core*, e em 100% dos pacientes com Desproporção Congênita de Fibras. Em sua maioria, a AFMT1 não era um dado histopatológico isolado e estava associada ao predomínio de fibras musculares tipo 1 e à deficiência de fibras tipo 2B.

Brooke (1973) relatou 12 casos de crianças com fraqueza generalizada e a biópsia muscular apresentava Atrofia de Fibras Tipo 1 (ao menos, 12% menores que a do tipo 2) caracterizando a miopia chamada Desproporção Congênita de Fibras, uma das primeiras descrições de um grupo de pacientes com a doença. O fenótipo se mostra heterogêneo, e se caracteriza, principalmente, por quadro de fraqueza e hipotonia ao nascer. A descoberta de mutações genéticas relacionadas à Desproporção Congênita de Fibras tem auxiliado na

compreensão fisiopatológica da doença. (CLARKE, 2011; DUBOWITZ; OLDFORDS; SEWRY, 2013; KISSIEDU; PRAYSON, 2016).

#### 1.4 DISTROFIA MIOTÔNICA TIPO 1

A Distrofia Miotônica Tipo 1 (DMT1), que foi primeiramente descrita por Steinert em 1909, é uma doença sistêmica geneticamente determinada pela expansão do trinucleotídeo CTG, no locus 19 q13.2-13.3, autossômica dominante. A DMT1 é a distrofia muscular mais frequente no adulto, com incidência entre 1:3000 a 1:8000 indivíduos na população mundial. É uma doença multissistêmica e heterogênea, caracterizada por fraqueza distal, atrofia e miotonia, assim como por sintomas nos sistemas cardíaco, cerebral, gastrointestinal, endócrino e respiratório, que podem surgir em qualquer idade. Essa doença apresenta o fenômeno da antecipação, isto é, início mais precoce e maior gravidade em gerações sucessivas. A AFMT1 é um achado histológico precoce na DMT1 e é acompanhada de hipertrofia das fibras tipo 2. Em pacientes com doença mais grave ou de longa duração, essa disparidade pode ser menos acentuada, e o aumento da centralização dos núcleos é uma característica da DMT1. (ASHIZAWA *et al.*, 2018; DUBOWITZ; OLDFORDS; SEWRY, 2013; TIMCHENKO, 2013). Brooke e Engel (1969a) afirmam que há uma forte associação entre Distrofia Miotônica Tipo 1 e Atrofia Seletiva de Fibras Tipo 1, sendo um achado em mais de 80% dos pacientes com essa doença.

#### 1.5 BIÓPSIA MUSCULAR

A biópsia muscular com estudo histoquímico é uma ferramenta importante para estabelecer o diagnóstico definitivo na maioria dos pacientes com suspeita de doença neuromuscular, particularmente nas miopatias, fornecendo informações que não podem ser obtidas por meio de técnicas histológicas convencionais. A biópsia deve ser feita em músculo apropriado, ou seja, músculos que estejam moderadamente afetados pela patologia, aumentando a sensibilidade do exame para melhor elucidação diagnóstica. (PANT *et al.*, 2015; WERNECK, 1981).

Segundo Dubowitz, Oldfords e Sewry (2013) o estudo histoquímico de rotina do músculo esquelético deve ser composto por colorações e reações conforme Tabela 02,

observando os principais achados de cada técnica que, em conjunto, podem chegar ao diagnóstico.

Tabela 02 - Pannel de métodos histoquímicos para análise da biópsia muscular

Coloração	Principais usos
<b>Hematoxilina e eosina</b>	estrutura geral: tamanho e contornos das fibras, posição dos núcleos, fibrose, inflamação, vasos, nervos
<b>Tricrômio de Gomori</b>	mitocôndrias, presença de agregados proteicos, vacúolos
<b>Verhoeff-van Gieson</b>	tecido conjuntivo, mielina e elastina
<b>Oil Red</b>	lipídio intracelular, lipídio do tecido adiposo
<b>Sudan Black</b>	lipídio intracelular, lipídio do tecido adiposo
<b>Ácido periódico de Schiff</b>	fibras com excesso e falta de glicogênio
<b>Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido desidrogenase - tetrazolina redutase</b>	distribuição mitocondrial, anormalidade mitocondrial, ruptura miofibrilar, cores
<b>Desidrogenase Succinica</b>	anormalidade mitocondrial, cores
<b>Citocromo C Oxidase</b>	anormalidade mitocondrial, cores, redução de atividade
<b>Adenosina Trifosfatase (ATPase) Miofibrilar ou miosina isoforme</b>	distribuição e envolvimento dos tipos de fibras
<b>Técnicas opcionais de acordo com o fenótipo</b>	
<b>Miofosforilose</b>	ausente na glicogenose tipo V
<b>Fosfofrutoquinase</b>	ausente na glicogenose tipo VII
<b>Adenilato Deaminase</b>	ausente/deficiente na mialgia por esforço, agregados tubulares
<b>Fosfatase ácida</b>	elevada em distúrbios lisossomais e miopatias vacuolares
<b>Fosfatase alcalina</b>	elevada em vasos sanguíneos, perimísio e miopatias inflamatórias
<b>Acetilcolinaesterase</b>	junção neuromuscular, junção miotendínea, fibras desenhervadas
<b>Esterase inespecífica</b>	junção neuromuscular, junção miotendínea, áreas fagocíticas, pequenas fibras desenhervadas anguladas
<b>Menadione- <math>\alpha</math> glicerofosfato desidrogenase</b>	corpos reduzidos, inclusões granulares
<b>Vermelho congo</b>	presença de amiloide

Fonte: Adaptado de Dubowitz, Oldfords e Sewry, 2013, p. 18.

A enzima Adenosina Trifosfato (ATPase) Miofibrilar nos vários pHs é a principal técnica utilizada para visualizar a diferenciação dos tipos de fibras musculares. Isso porque essa enzima apresenta alterações histoquímicas variáveis, dependendo do grau de inibição provocados pelos diferentes pHs. Considerando que a velocidade de contração muscular está diretamente relacionada à atividade dessa enzima, a coloração está relacionada ao metabolismo

aeróbico. Assim, as fibras tipo I em pH alcalino (9.4) aparecem com reação fraca, e no pH ácido (4.3 e 4.6) têm reação forte. (BROOKE; ENGEL, 1969; BROOKE; KAISER, 1970; DUBOWITZ; OLDFORDS; SEWRY, 2013).

As fibras musculares apresentam formato poligonal, e seu tamanho e distribuição são importantes na análise da biópsia. Em geral, é possível ter uma ideia da variabilidade e da mudança do tamanho das fibras, por meio de simples inspeção da biópsia muscular na microscopia ótica, mas nem sempre é um dado claro. Assim, a medida do tamanho da fibra é útil. (DUBOWITZ; OLDFORDS; SEWRY, 2013). Há vários métodos de aferição do tamanho da fibra muscular, da área ou do diâmetro. A escolha do melhor método dependerá do tipo e do tamanho dos elementos estudados bem como dos recursos disponíveis, podendo ser efetuada por métodos digitais ou manuais.

O método planimétrico foi considerado o método mais preciso na aferição da medida da área da fibra muscular, comparado aos métodos grade, pontos e média de dois diâmetros ortogonais, mas também foi considerado o método mais demorado. (EDSTRÖ; TORLEGARD, 1969). Em um estudo com coelhos, Kost e Kost (1982) compararam a medida da fibra utilizando o menor diâmetro e o maior diâmetro ortogonal de fibras musculares com a área da secção transversa, obtido através da multiplicação dos diâmetros ortogonais, e concluíram serem muito equivalentes os resultados obtidos com os dois métodos, mas a medida do menor diâmetro tende a subestimar em 16 a 21% o diâmetro da fibra. Já Venema e Overweg (1974) estudaram 10 parâmetros de medida do tamanho nas secções transversas da fibra e concluíram que todos eles apresentam imperfeições, principalmente pela obliquidade da secção de corte na fibra muscular.

Houve várias tentativas de automatizar e informatizar essa aferição, com base no diâmetro da fibra ou na área da fibra muscular na secção transversal, mas isso é demorado em tem algum envolvimento manual. Sandstedt (1982) comparou a medida da área de fibras musculares utilizando três métodos (grade, digitalização e desenho-digitalizado) e conclui que as medidas feitas com métodos manuais são tão acuradas quanto as feitas por métodos digitais, mas consomem mais tempo.

O método para aferir o tamanho da fibra muscular sugerido por Dubowitz, Oldfords e Sewry (2013) é o método proposto por Brooke e Engel (1969b), que se baseia na medida do menor diâmetro da fibra, seguido pela construção de um histograma de distribuição das fibras conforme seu tipo, tamanho e idade. Para essa aferição recomenda-se medir pelo menos 100 fibras de cada tipo. Em músculo adulto normal, o diâmetro das fibras varia entre 40 e 80  $\mu\text{m}$ , em homens, e 30 e 70  $\mu\text{m}$ , em mulheres. (DUBOWITZ; OLDFORDS; SEWRY, 2013).

Num esforço de quantificar o tamanho das fibras, Brooke e Engel (1969b) descreveram os fatores de atrofia e hipertrofia, que são calculados a partir do histograma para cada tipo de fibra. Esses cálculos, embora um pouco trabalhosos, são úteis para detectar a presença de atrofia ou hipertrofia, que podem não ser aparentes na inspeção de rotina, e para demonstrar a presença de atrofia ou hipertrofia seletivas de um tipo de fibra. Porém, os valores de referência para os fatores de atrofia e hipertrofia são descritos apenas para pacientes adultos, uma vez que em crianças os tamanhos das fibras são relativamente menores.

Embora ferramentas como microscopia eletrônica, *western blotting* e genética molecular estejam disponíveis nos principais centros, na maioria dos casos o diagnóstico patológico das doenças musculares ainda se baseia na análise histológica (colorações de rotina, histoquímica enzimática e imuno-histoquímica) da biópsia muscular. (PANT *et al.*, 2015).

## **2 OBJETIVOS**

- Analisar aspectos clínicos e histológicos dos pacientes, crianças e adultos, com AFMT1 como diagnóstico histopatológico.
- Observar os diagnósticos etiológicos na presença de AFMT1 como diagnóstico histopatológico.
- Avaliar a frequência de AFMT1 como diagnóstico histopatológico em um serviço de doenças neuromusculares.

### 3 METODOLOGIA

Este é um estudo retrospectivo das biópsias musculares e de prontuários de pacientes cujo diagnóstico anatomopatológico foi AFMT1 na biópsia muscular, acessados no Banco de Dados de Biópsias Musculares do Serviço de Doenças Neuromusculares, Serviço de Neurologia, do Hospital de Clínicas – UFPR.

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas - UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012, CAAE: 30485014.8.0000.0096.

O estudo foi desenvolvido em quatro etapas.

#### 3.1 ETAPA I

Seleção dos pacientes utilizando o Banco de Dados de Biópsias Musculares do Serviço de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas – UFPR, no período de janeiro de 1990 a março de 2016. Foram incluídos todos os pacientes que tinham como diagnóstico histopatológico a Atrofia de Fibras Tipo 1 no laudo da biópsia muscular.

#### 3.2 ETAPA II

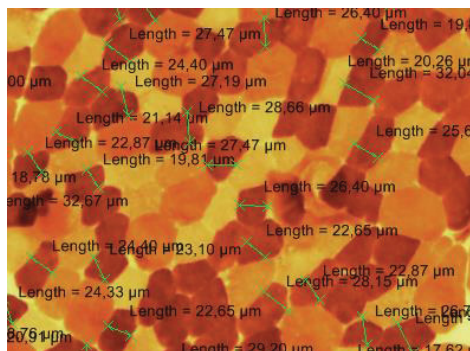
Feita a análise dos prontuários dos pacientes selecionados na fase I, os dados foram revisados por meio da aplicação de formulário conforme Apêndice A. Também foram analisados os laudos das biópsias musculares emitidos pelo Serviço de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas. Os laudos foram emitidos com base na avaliação por microscopia óptica, conforme painel de métodos histoquímicos proposto por Dubowitz, Oldfords e Sewry (2013), Tabela 02. Quanto ao tamanho das fibras foi feita a aferição, de forma manual, do menor diâmetro da fibra muscular, utilizando microscopia óptica com aumento de 100 vezes. Os laudos eram descritivos, não havendo dados com os valores das medidas das fibras, apenas a descrição de presença de AFMT1. Os prontuários dos pacientes foram obtidos no Serviço de Arquivo Médico do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

### 3.3 ETAPA III

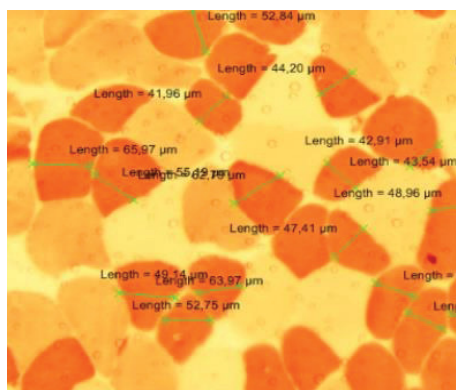
Nesta fase, foi realizada nova aferição do tamanho das fibras musculares das biópsias musculares dos pacientes selecionados. Para diferenciação das fibras musculares tipo 1 e tipo 2 na biópsia muscular foram utilizadas as colorações histoquímicas ATPases nos pHs 4.3, 4.6 e 9.4, selecionando aquela com melhor qualidade da imagem. Foram excluídos aqueles pacientes que não apresentavam material de biópsia muscular com qualidade para diferenciação dos tipos de fibras musculares.

A aferição do tamanho de fibras foi realizada manualmente com a medição do menor diâmetro, seguindo metodologia descrita por Dubowitz, Oldfords e Sewry (2013). Foram utilizados microscopia óptica (microscópio Nikon eclipse 80i) com aumento de 100 vezes e o programa NIS *Elements*, da Nikon, que transmite a imagem obtida na microscopia óptica para a tela do computador. A aferição foi realizada na imagem mostrada na figura 01. Para se obter a média dos tamanhos das fibras, foram aferidas 200 fibras musculares em cada biópsia, sendo 100, do tipo 1, e 100, do tipo 2.

Figura 01- Aferição do tamanho das fibras musculares



A



B

Fonte: A autora, 2019.

Figura 01- A- mostra a aferição do diâmetro das fibras tipo 1, escuras, na coloração histoquímica ATPase em pH 4,6, aumento 100x, de um paciente do grupo infantil; B - mostra a aferição do diâmetro das fibras tipo 1, escuras,

na coloração histoquímica ATPase em pH 4,6, aumento 100x, de um paciente do grupo adulto. Length= comprimento.

Com as medidas das fibras foi, então, realizado um histograma (Apêndice B) e o cálculo da média do diâmetro para fibras tipo 1 e tipo 2 para cada paciente, assim como o cálculo da diferença de tamanho entre fibras tipo 1 e 2 em porcentagem (%). Foi também calculado, para cada biópsia, o fator de atrofia e hipertrofia para fibras tipo 1 e 2, conforme método descrito por Dubowitz, Oldfords e Sewry (2013) (Apêndice C). Os dados também estão descritos nos Apêndices D e E. Nessa etapa, foram excluídos os pacientes que não confirmaram diagnóstico histopatológico de AFMT1.

O valor de referência para os fatores de atrofia e hipertrofia é utilizado para humanos com idade igual ou superior a 14 anos, de acordo com o músculo estudado. Valores de referência apresentados na Tabela 03. (DUBOWITZ; OLDFORDS; SEWRY , 2013).

Tabela 03- Limites superiores para o valor de atrofia e hipertrofia em adultos

<i>Homem</i>	Fator de atrofia	Fator de hipertrofia	Fator de atrofia	Fator de hipertrofia
<i>Bíceps braquial</i>	150	300	150	500
<i>Vasto lateral</i>	150	150	150	400
<i>Mulher</i>				
<i>Bíceps braquial</i>	100	200	150	150
<i>Vasto lateral</i>	100	400	200	150

Fonte: Adaptado de Dubowitz, Oldfords e Sewry, 2013, p. 63.

### 3.4 ETAPA IV

Nesta etapa foi realizada a análise dos dados obtidos nas fases anteriores. Para tanto os pacientes foram divididos em 2 grupos, grupo A, com pacientes com idade igual ou superior a 14 anos, e grupo B, de pacientes com idade inferior a 14 anos, considerando que aos 14 anos a fibra muscular está madura. (DUBOWITZ; OLDFORDS; SEWRY , 2013).

Os dados coletados foram armazenados em planilha do Microsoft Excel. A análise dos dados foi realizada pelo Programa *Computacional Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 22.0. Os resultados foram expressos por médias, medianas, valores mínimos e máximos, e desvio padrão para as variáveis quantitativas, e por frequências e

percentuais para as variáveis qualitativas. A análise inferencial foi realizada pelos Testes estatísticos de T de Student e Qui Quadrado. Para avaliação da Normalidade das variáveis quantitativas foi realizado o Teste de Kolmogorov-Smirnov. Valores de  $p$  menores que 0,05 foram considerados significativos.

## 4 RESULTADOS

No período de janeiro de 1990 a março de 2016 o setor de doenças neuromusculares do Serviço de Neurologia do Hospital de Clínicas realizou 2246 biópsias musculares. Destas, 98 apresentaram Atrofia de Fibras Tipo 1 como diagnóstico histopatológico. Foram excluídos 36 pacientes porque a qualidade do seu material de biópsia para diferenciação dos tipos de fibra muscular não era adequada, bem como por falta de dados clínicos. Dos pacientes que restaram incluídos, após nova aferição do tamanho das fibras, 20,96% não confirmaram a Atrofia Seletiva de Fibras Tipo 1 e também foram excluídos. Assim, foram incluídos no estudo 49 pacientes (4,36% das biópsias avaliadas no período), sendo a idade média dos pacientes de  $16,95 \pm 16,92$  anos, 56% do sexo masculino.

### 4.1 GRUPO A

O grupo A, foi composto por 21 pacientes com idade igual ou superior a 14 anos. A idade média destes foi de  $33,80 \pm 12,04$  anos, 62%, do sexo masculino, sendo que em 81% dos casos, o músculo avaliado foi o bíceps braquial. O tempo médio entre o início dos sintomas e a realização da biópsia muscular foi de  $5,5 \pm 5,2$  anos. A média do fator de atrofia de fibras tipo 1 foi de  $748,04 \pm 632,86$ , e de  $50,00 \pm 335,11$ , para fibras tipo 2. O fator de hipertrofia para fibras tipo 1 foi zero em todos os pacientes, e o fator de hipertrofia para fibras tipo 2 foi de  $38,38 \pm 74,90$ , conforme mostra Tabela 04. Considerando os valores de referência para o fator de atrofia, todos os pacientes confirmaram Atrofia de Fibras Tipo 1.

Tabela 04 - Fatores de atrofia e hipertrofia grupo A

Paciente	idade (anos)	FA1	FH1	FA2	FH2
1	38	279	0	60	15,15
2	44	190	0	60	0
3	53	1170	0	80	0
4	42	370	0	30	20
5	50	1850	0	10	60
6	17	510	0	30	0

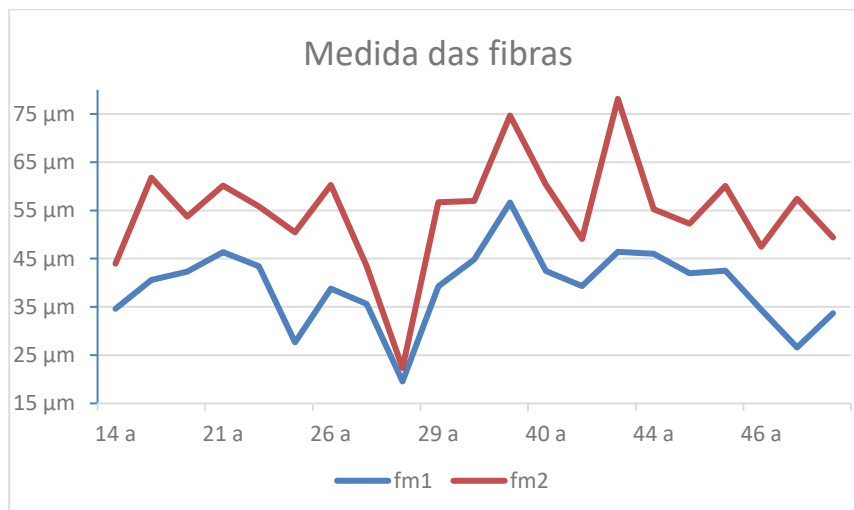
7	26	200	0	0	0
8	14	880	0	310	0
9	39	2160	0	1410	0
10	42	1740	0	750	290
11	40	380	0	30	40
12	46	580	0	50	219
13	28	950	0	400	0
14	21	120	0	10	30
15	44	190	0	20	30
16	29	120	0	30	0
17	46	560	0	90	0
18	15	700	0	30	10
19	25	1780	0	80	20
20	22	330	0	10	22
21	29	650	0	60	50

Fonte: A autora, 2019.

Tabela 04 - Fatores de atrofia e hipertrofia grupo A: FA1- fator de atrofia fibras tipo 1, FH1- fator de hipertrofia fibras tipo 1, FA2- fator de atrofia fibras tipo 2, FH2- fator de hipertrofia fibras tipo 2.

Com relação à diferença de tamanho entre as fibras tipo 1 e tipo 2, as fibras tipo 1 apresentaram-se menores que as fibras tipo 2, em média  $27,44 \pm 10,04\%$ , com mínima de 13,44%, e máxima de 53,68%, confirmando o diagnóstico histopatológico de Atrofia Seletiva de Fibras Tipo 1. O Gráfico 01 mostra a média dos tamanhos das fibras tipo 1 e tipo 2 em cada paciente. A relação entre os diagnósticos etiológicos e os sintomas está apresentada na Tabela 05. Nesse grupo, o diagnóstico mais observado foi Distrofia Miotônica Tipo 1, em 33,33% dos pacientes, e nenhum paciente apresentou o diagnóstico de Miopatia Congênita. A fraqueza foi o sintoma mais observado, presente em 71,42% dos pacientes. Em 14,1% dos casos, além da AFMT1, foi observada a presença de núcleos centrais. Nesses casos, todos os pacientes tiveram diagnóstico de Distrofia Muscular Miotônica Tipo 1.

Gráfico 01 - Medidas das fibras musculares grupo A



Fonte: A autora, 2019.

Gráfico 01- Medidas das fibras grupo A. fm1- fibras musculares tipo 1, fm2- fibras musculares tipo 2, a-anos/idade.

Tabela 05 - Diagnóstico, sinais e sintomas grupo A

		Fraqueza N	Hiporreflexia N	Oftalmoparesia N	Fadiga N	Mialgia N	Ataxia N	Miotonia N	Déficit cognitivo N	Ptose N
<b>SNC</b>	Encefalopatia crônica N=1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	Ataxia cerebelar recessiva N=1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	Distrofia miotônica tipo 1 N=7	7	1	0	0	0	0	1	1	2
<b>DNM</b>	Dermatopolimiosite N=2	1	0	0	1	0	0	0	0	0
	Miastenia gravis N=1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	Distrofia muscular de cinturas N=2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hipotireoidismo N=2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	Diagnóstico não definido N=5	3	0	0	2	3	0	0	0	0

Fonte: A autora, 2019.

Tabela 05 - Diagnóstico, sinais e sintomas grupo A: N- número de pacientes, SNC- doenças do Sistema Nervoso Central, DNM- doenças neuromusculares.

## 4.2 GRUPO B

O grupo B foi composto por 28 pacientes com idade inferior a 14 anos. A idade média dos pacientes foi de  $4,30 \pm 3,86$  anos, 57,14% do sexo masculino, sendo que

em 82,15% dos casos, o músculo avaliado foi o vasto lateral. O tempo médio entre o início dos sintomas e a biópsia muscular foi de  $3,2 \pm 3,1$  anos. A média do fator de atrofia de fibras tipo 1 foi de  $2386,78 \pm 793,73$ , e de  $1560,35 \pm 979,90$  para fibras tipo 2. E o fator de hipertrofia para fibras tipo 1 e tipo 2 foi zero em todos os pacientes, conforme mostra Tabela 06. As fibras musculares na faixa etária avaliada nesse grupo são menores e não há valores de referência descritos para o fator de atrofia e hipertrofia.

Tabela 06 - Fatores de atrofia e hipertrofia grupo B

Paciente	Idade (anos)	FA1	FH1	FA2	FH2
1	2	2950	0	2590	0
2	10	2270	0	80	0
3	0,41	3170	0	2440	0
4	3	1600	0	1220	0
5	2	2320	0	1100	0
6	0,25	3450	0	2810	0
7	1	3410	0	3140	0
8	9	850	0	330	0
9	4	2740	0	1570	0
10	7	2330	0	1650	0
11	2	2900	0	2530	0
12	4	1830	0	1100	0
13	9	2220	0	1040	0
14	9	3110	0	2700	0
15	8	1230	0	410	0
16	3	1550	0	590	0
17	1	3080	0	2410	0
18	3	2820	0	580	0
19	1	2170	0	1490	0
20	12	760	0	150	0
21	2	2440	0	1680	0
22	13	820	0	340	0
23	1	2940	0	2010	0
24	2	3020	0	2190	0

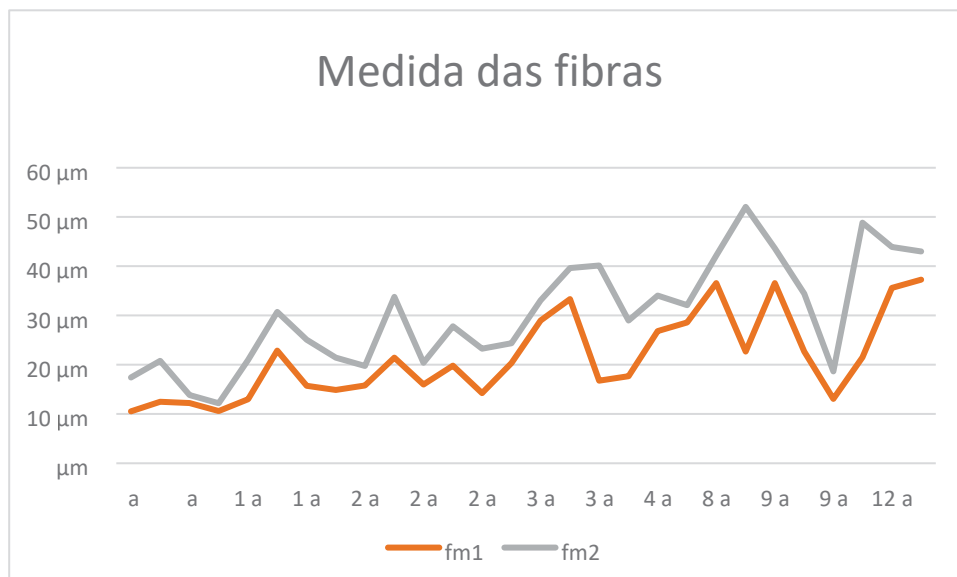
25	0,41	3210	0	3050	0
26	1,5	3000	0	2320	0
27	2	2430	0	2080	0
28	8	2210	0	90	0

Fonte: A autora, 2019.

Tabela 06 - Fatores de atrofia e hipertrofia grupo A: FA1- fator de atrofia fibras tipo 1, FH1- fator de hipertrofia fibras tipo 1, FA2- fator de atrofia fibras tipo 2, FH2- fator de hipertrofia fibras tipo 2.

Com relação à diferença do tamanho entre as fibras tipo 1 e tipo 2, as fibras tipo 1 apresentaram-se menores que as fibras tipo 2, em média de  $29,48 \pm 13,20\%$ , com mínima de 12,04% e máxima de 58,16%, confirmando o diagnóstico histopatológico de Atrofia Seletiva de Fibras Tipo 1. O Gráfico 02 mostra a média do tamanho das fibras tipo 1 e tipo 2 em cada paciente. Os diagnósticos etiológicos estão relacionados aos sintomas na Tabela 07. Nesse grupo, em 25% dos pacientes o diagnóstico mais observado foi Miopatia Congênita (Miopatia Centronuclear e Desproporção Congênita de Fibras), e 10,71% dos pacientes apresentaram diagnóstico de Distrofia Miotônica Tipo 1. A fraqueza foi o sintoma mais observado, presente em 60,71% dos pacientes. Em 1 paciente, além da AFMT1, foi observada a presença de núcleos centrais, nesse caso, o paciente tinha diagnóstico de Miopatia Centronuclear.

Gráfico 02 - Medidas das fibras musculares grupo B



Fonte: A autora, 2019.

Gráfico 02 - Medidas das fibras grupo. fm1- fibras musculares tipo 1, fm2- fibras musculares tipo 2, a-anos/idade.

Tabela 07 - Diagnóstico, sinais e sintomas grupo B

		Fraqueza N	Hiporreflexia N	Hiperreflexia N	Déficit cognitivo N	Ptose N	Hipotonia N
<b>SNC</b>	Epilepsia N=1	0	0	0	1	0	0
	Síndrome de Kabuki N=1	1	0	0	0	0	0
	Neurodegeneração com acúmulo cerebral de ferro N=1	1	0	0	0	0	0
	Leucodistrofia N= 2	1	0	1	1	0	1
	Dermatopolimiosite N= 1	1	0	0	0	0	0
	Distrofia muscular de cinturas N=1	1	0	0	0	0	0
<b>DNM</b>	Atrofia muscular espinhal N=1	1	0	0	0	0	1
	Distrofia miotônica N=3	3	0	0	0	0	0
	Miopatia centronuclear N=2	2	2	0	0	0	1
	Desproporção congenita de fibras N=5	2	0	1	0	0	4
	Síndrome do bebê hipotônico N=10	4	0	0	1	2	10

Fonte: A autora, 2019.

Tabela 07- Diagnóstico, sinais e sintomas grupo B: N- número de pacientes, SNC- doenças do Sistema Nervoso Central, DNM- Doenças Neuromusculares.

Quando comparados os tamanhos entre as fibras tipo 1 e 2 dos grupos A e B, não foi percebida diferença estatística ( $p=0,55$ ).

## 5 DISCUSSÃO

Em 20,96% dos pacientes, após a nova aferição do tamanho das fibras, conforme metodologia descrita, não foi confirmado o diagnóstico histopatológico de AFMT1. Não foi possível fazer uma análise comparativa entre a metodologia da aferição do tamanho das fibras, utilizada quando o laudo da biópsia foi emitido, e a metodologia utilizada nesse trabalho, uma vez que nos laudos das biópsias não constavam os valores das aferições dos tamanhos das fibras musculares e nem a diferença de tamanhos entre os tipos de fibras. A principal diferença entre essas metodologias é a presença de uma imagem digitalizada utilizando o programa NIS *Elements*, sendo a aferição das fibras feita na tela do computador. Segundo Sandstedt (1982), que comparou as medidas das áreas de fibras musculares utilizando três métodos (grade, digitalização e desenho-digitalizado), as medidas feitas com métodos manuais são tão acuradas quanto as feitas por métodos digitais, mas consomem mais tempo.

O fator de atrofia é uma medida que pode exibir a extensão da atrofia muscular mais claramente do que a observação qualitativa do diâmetro médio da fibra, sendo uma boa expressão da atrofia muscular, porém utilizado somente para adultos, uma vez que em crianças as fibras são muito pequenas. (DUBOWITZ; OLDFORDS; SEWRY, 2013). Em nosso estudo, o fator de atrofia reconfirmou a presença da AFMT1 no grupo adulto, e no grupo infantil também foi calculado, mas sem valores de referência para realizar a mesma afirmação. Não há estudos do conhecimento dos autores que mostrem o fator de atrofia muscular em um grupo de pacientes com AFMT1.

No presente estudo, 4,36% das biópsias musculares avaliadas tiveram diagnóstico histopatológico de AFMT1, incluindo adultos e crianças. Em crianças, dados semelhantes já foram publicados por Imoto e Nonaka (2001) (6,73%). Não há dados publicados sobre a presença de AFMT1 em um grupo de adultos. Em nosso estudo, vários diagnósticos foram observados na presença de AFMT1, incluindo doenças musculares, distúrbios metabólicos, patologias do Sistema Nervoso Central e Periférico. Isso sugere que a AFMT1 não é um achado exclusivo de doenças neuromusculares. Os achados de predominância de fibras do tipo 1 e de AFMT1 têm sido relatados como sendo comuns nas doenças primárias do músculo. Não há, no entanto, dados descrevendo a frequência com que essas anormalidades ocorrem. (FARDEAU, TOME, 1994). No estudo de Imoto e Nonaka (2001) os distúrbios

neuromusculares foram mais prevalentes na presença de AFMT1, e essa mesma característica foi observada em nosso estudo.

Em ambos os grupos, de crianças e adultos, a fraqueza foi o sintoma mais comum relacionado à AFMT1, mas outros sinais e sintomas também foram observados, como fadiga, oftalmoparesia, hipotonia, comprometimento cognitivo entre outros. A fraqueza é um sintoma que pode ser observado tanto em doenças neuromusculares como em doenças do Sistema Nervoso Central. Imoto e Nonaka (2001) relatam a importância da AFMT1 associada a doenças neuromusculares em crianças. Não há dados semelhantes descritos em doenças do Sistema Nervoso Central.

A Miopatia Congênita foi o principal diagnóstico relacionado à AFMT1 em crianças, relatado de forma semelhante por Imoto e Nonaka (2001). Entretanto, esse diagnóstico não foi encontrado nos adultos. Nestes, o principal diagnóstico relacionado à AFMT1 foi a distrofia miotônica do tipo 1, observado em apenas 10% das crianças. Talbot e Maves (2016), em sua revisão, descrevem a presença de AFMT1 na Distrofia Miotônica do Tipo 1 e na Desproporção Congênita de Fibras.

Em alguns pacientes, além do AFMT1, foi observada a presença de núcleos centrais nas biópsias musculares. Esse achado foi relacionado ao diagnóstico de Distrofia Miotônica Tipo 1, em adultos, e à miopatia centronuclear, em crianças. A presença de numerosos núcleos internos e de vários *clusters* nucleares na biópsia muscular é achado comum na biópsia muscular da Distrofia Miotônica do Tipo 1, mas geralmente é um achado tardio, enquanto a Atrofia de Fibras Tipo 1 é um achado precoce. (DUBOWITZ; OLDFORDS; SEWRY, 2013). Romero (2010) demonstrou que miopatia centronuclear é uma miopatia congênita clássica definida pela presença de um número anormalmente alto de fibras musculares com núcleos organizados em fileiras na parte central da fibra e pode estar associado à predominância do tipo 1 e a AFMT1.

O achado histológico mais descrito na biópsia muscular relacionada à Miopatia por Hipotireoidismo é a atrofia das fibras do tipo 2, como observado por Monforte *et al.* (1990) e McKernan *et al.* (1975). Em nosso estudo, dois casos de hipotireoidismo com atrofia de fibras do tipo 1 foram observados, mas não há relatos na literatura, do nosso conhecimento, de AFMT1 em hipotireoidismo.

Variação anormal no tamanho das fibras musculares é observada na biópsia do músculo nas distrofias musculares de cinturas, sendo que a hipertrofia de fibras é mais comum e há uma tendência das fibras do tipo 1 terem diâmetro menor que as do tipo 2 (DUBOWITZ; OLDFORDS; SEWRY, 2013). Em nosso estudo, dois pacientes com

Distrofia Muscular de Cinturas foram observados, apresentando apenas a AFMT1 na biópsia muscular.

No presente estudo, duas crianças com Leucodistrofia apresentaram AFMT1. Embora essa característica tenha sido previamente relatada em pacientes com Leucodistrofia Metacromática, submetidos à biópsia muscular, nenhuma explicação clara para esse achado foi descrita. (WERNECK; PEREIRA; BRUCK, 1980).

Estudos descreveram presença de atrofia em ambos os tipos de fibras musculares, tipo 1 e 2, em pacientes com Atrofia Muscular Espinhal, associadas a agrupamentos dos tipos de fibras e hipertrofia de fibras tipo 1 (ARNOLD; KASSAR ; KISSEL, 2015; DUBOWITZ; OLDFORDS; SEWRY, 2013). Em nossa amostra, foi encontrada uma criança com Atrofia Muscular Espinhal associada à AFMT1.

A Síndrome do Bebê Hipotônico pode ser causada por uma variedade de doenças, incluindo as doenças neuromusculares, e devido à dificuldade em definir a etiologia, a biópsia muscular ainda é uma importante ferramenta diagnóstica. Bing *et al.* (2013) avaliaram 25 pacientes com Síndrome do Bebê Hipotônico, apresentando uma heterogeneidade nos achados da biópsia muscular os quais auxiliaram no diagnóstico etiológico. Vários diagnósticos relacionados a essa síndrome foram encontrados, entre eles, Distrofia Muscular Congênita, Atrofia Muscular Espinhal e Miopatia Congênita, sendo quatro pacientes com Desproporção Congênita de Fibras. Dez pacientes com Síndrome do Bebê Hipotônico sem diagnóstico etiológico foram observados no presente estudo.

Na Dermatomiosite, além das características inflamatórias, as anormalidades no tamanho das fibras são frequentes, principalmente na região perifascicular, e a presença de fibras hipertrofiadas é rara. (DUBOWITZ; OLDFORDS; SEWRY, 2013). Em nosso estudo, três casos de Dermatomiosite foram associados à AFMT1, porém nenhum sinal inflamatório foi observado nas biópsias musculares.

Fraqueza muscular e atrofia têm sido descritas em pacientes com Ataxia Espinocerebelar, mas poucos estudos mostram alterações na biópsia muscular. Svenstrup *et al.* (2017) descreveram três casos de Ataxia Espinocerebelar 28 e em 2 pacientes havia AFMT1. Em nosso estudo, um caso de Ataxia Espinocerebelar associado à AFMT1 foi identificado.

Poucas anormalidades são observadas nas biópsias musculares de Miastenia *Gravis*, exceto na junção neuromuscular. Quando há alterações na biópsia muscular de pacientes com Miastenia *Gravis* são focais e geralmente inespecíficas, que incluem

atrofia das fibras do tipo 2 e, às vezes, atrofia das fibras do tipo 1, que podem ser acompanhadas pela presença de pequenas fibras de anguladas. (DUBOWITZ; OLDFORDS; SEWRY, 2013). Em nosso estudo, apresentamos um caso de *Miastenia Gravis* com diagnóstico histopatológico de AFMT1 sem outras alterações na biópsia muscular.

A Síndrome de Kabuki e a Neurodegeneração com Acúmulo Cerebral de Ferro são doenças hereditárias com sintomas predominantes do Sistema Nervoso Central. Nessas doenças não há dados sobre a presença de AFMT1. O mesmo ocorre na Epilepsia, que é uma patologia heterogênea que pode ocorrer de forma concomitante a outros transtornos. (BERG; TARQUINIO; KOH, 2017; CHEON; KO, 2015; GOTHWAL; NAYAN, 2016).

Como o AFMT1 não é um diagnóstico histológico comum, as limitações deste estudo foram o número restrito da amostra, a variedade de diagnósticos etiológicos e a falta de relação com o perfil genético. A relação entre o perfil genético e a análise histológica da biópsia muscular não foi o objetivo do nosso estudo, mas consideramos que estudos de sequenciamento de próxima geração seriam importantes para entender a ocorrência da AFMT1 em doenças neuromusculares. Além disso, há poucos artigos publicados sobre AFMT1, dificultando a comparação entre o nosso estudo e outros.

Há uma variedade de condições fisiopatológicas que afetam preferencialmente os tipos específicos de fibras musculares esqueléticas. A compreensão dos efeitos específicos em cada tipo de fibra, nesses distúrbios musculares, podem fornecer informações importantes sobre a fisiopatologia das doenças. Assim, a presença de AFMT1 como diagnóstico histopatológico é útil no diagnóstico de adultos e crianças. Este é o primeiro estudo que mostra relação entre um grupo adulto e um infantil com o diagnóstico em pacientes com AFMT1. Da mesma forma, é a primeira descrição de valores de fator de atrofia em um grupo exclusivo de pacientes com Atrofia Seletiva de Fibras Tipo 1.

## 6 CONCLUSÕES

- AFMT1 é um dado importante e útil no diagnóstico etiológico em adultos e crianças e está presente em uma heterogenicidade de doenças, sendo mais observada em doenças neromusculares, assim como a fraqueza é o principal sintoma relacionado a essa condição.

- No grupo infantil, grupo B, a Miopatia Congênita é o principal diagnóstico na presença de AFMT1, seguido por Distrofia Miotônica Tipo 1. Enquanto no grupo adulto, grupo A, a Distrofia Miotônica Tipo 1 foi o principal diagnóstico, o mais observado, na presença de AFMT1.

- A presença de AFMT1 como diagnóstico histopatológico é um achado pouco frequente.

## REFERÊNCIAS

ARNOLD, W. D.; KASSAR, D.; KISSEL, J. T. Spinal muscular atrophy: diagnosis and management in a new therapeutic era. **Muscle & Nerve**, v. 51, n. 2, p. 157-167, 2015.

ASHIZAWA, T. *et al.* Consensus-based care recommendations for adults with myotonic dystrophy type 1. **Neurology Clinical Practice**, v. 8, n. 6, p. 507–520, 2018.

BERG, A. T.; TARQUINIO, D.; KOH, S. Early life epilepsies are a comorbidity of developmental brain disorders. **Seminars in Pediatric Neurology**, v. 24, n. 4, p. 251–263, 2017.

BROOKE, M. H.; ENGEL, W. K. The histographic analysis of human muscle biopsies with regard to fiber types. 3. Myotonias, myasthenia gravis, and hypokalemic periodic paralysis. **Neurology**, v. 19, n. 5, p. 469-77, 1969a.

\_\_\_\_\_. The histographic analysis of human muscle biopsies with regard to fiber types: I. Adult male and female. **Neurology**, v. 19, n. 3, p. 221-221, 1969b.

\_\_\_\_\_.; KAISER, K. K. Muscle fiber types: how many and what kind? **Archives of neurology**, v. 23, n. 4, p. 369-79, 1970.

CASSANDRINI, D. *et al.* Congenital myopathies: clinical phenotypes and new diagnostic tools. **Italian Journal of Pediatrics**, v. 43, n. 1, p. 101-120, 2017.

CHEON, C. K.; KO, J. M. Kabuki syndrome: clinical and molecular characteristics. **Korean Journal of Pediatrics**, v. 58, n. 9, p. 317-324, 2015.

CICILIOT, S. *et al.* Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, n. 10, p. 2191-2199, 2013.

CLARKE, N. F. Congenital fiber-type disproportion. **Seminars in Pediatric Neurology**, v. 18, n. 4, p. 264-271, 2011.

DUBOWITZ, V.; OLDFORDS, A.; SEWRY, C. **Muscle biopsy: a practical approach**. 4th ed., Saunders, 592 p., 2013.

EDSTRÖM, L.; TORLEGARD, K. Area estimation of transversely sectioned muscle fibres. **Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und mikroskopische Technik**, v. 69, n. 3, p. 166-78, jun. 1969.

FARDEAU, M.; TOME, F. **Congenital Myopathies**. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, editors. *Myology*. McGrawHill: New York, 1994.

GONORAZKY, H. D.; BÖNNEMANN, C. G.; DOWLING, J. J. **The genetics of congenital myopathies**. Elsevier, 2018, p. 549-564.

GOTHWAL, S.; NAYAN, S. Hallervorden-Spatz Syndrome with seizures. **Basic and Clinical Neuroscience Journal**, v. 7, n. 2, 2016.

IMOTO, C.; NONAKA, I., I. The significance of type 1 fiber atrophy (hypotrophy) in childhood neuromuscular disorders. **Brain & Development**, v. 23, p. 298-307, 2001.

JOHNS, N.; STEPHENS, N. A.; FEARON, K. C. H. Muscle wasting in cancer. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, n. 10, p. 2215-2229, 2013.

KISSIEDU, J.; PRAYSON, R. A. Congenital fiber type disproportion. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 26, p. 136-137, 2016.

KOST, A. L.; KOST, G. J. A comparison of fiber types and measurement techniques in the medial gastrocnemius and soleus muscles of the rabbit. **Microscopica acta**, v. 86, n. 1, p. 25–36, 1982.

MCKERAN, R. O. *et al.* Muscle fibre type changes in hypothyroid myopathy. **Journal of Clinical Pathology**, v. 28, p. 659-663, 1975.

MONFORTE, R. *et al.* Hypothyroid myopathy. A clinical and histologic prospective study of 19 patients. **Medicina Clínica**, v. 95, n. 4, p. 126-9, 1990.

NORTH, K. N. *et al.* Approach to the diagnosis of congenital myopathies. **Neuromuscular Disorders**, v. 24, n. 2, p. 97-116, 2014.

PANT, I. *et al.* Muscle histopathology in today's era of molecular genetics: role and limitations. **Annals of Indian Academy of Neurology**, v. 18, n 4, p. 398-402, 2015.

REED, U. Doenças neuromusculares. **Jornal de Pediatria**, v. 78, p. 89–103, 2002.

ROMERO, N. B. Centronuclear myopathies: a widening concept. **Neuromuscular Disorders**, v. 20, n. 4, p. 223–228, 2010.

SANCHEZ, A. M. J. *et al.* eIF3f: a central regulator of the antagonism atrophy/hypertrophy in skeletal muscle. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, n. 10, p. 2158-2162, 2013.

SCOTT, W. ; STEVENS, J.; BINDER–MACLEOD, S. A. Human skeletal muscle fiber type classifications. **Physical Therapy**, v. 81, n 11, p. 1810-1816, 2001.

TALBOT, J.; MAVES, L. Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. **Wiley Interdisciplinary Reviews: developmental biology**, v. 5, n. 4, p. 518-534, 2016.

TIMCHENKO, L. Molecular mechanisms of muscle atrophy in myotonic dystrophies. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, n. 10, p. 2280-2287, 2013.

VENEMA, H. W.; OVERWEG, J. Analysis of the size and shape of cross-sections of muscle fibres. **Medical & Biological Engineering**, v. 12, n. 5, p. 681-92, 1974.

WERNECK, L. O valor da biópsia muscular em neurologia: análise de 290 exames a fresco e pela histoquímica. **Revista Brasileira de Clínica e Terapêutica**, v. 10, p. 2-24, 1981.

\_\_\_\_\_.; PEREIRA, J. L.; BRUCK, I. Metachromatic leukodystrophy: report of 2 cases with histochemistry of nerves and muscles. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 38, n. 3, p. 237-48, 1980.

WING, S. S. Deubiquitinases in skeletal muscle atrophy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, n. 10, p. 2130-2135, 2013.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A - FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS DOS PRONTUÁRIOS

#### FICHA DE COLETA DE DADOS

Pesquisador:..... Data:.....  
 Nome:..... Registro:.....  
 Gênero  Masculino  Feminino Idade:..... Biópsia:.....  
**Diagnóstico final:**.....

#### DADOS INICIAIS

Idade de início dos sintomas:.....  
 Idade de diagnóstico:..... Tempo de duração da doença:.....  
 Idade na última consulta:..... Última consulta em:.....

#### SINTOMAS E SINAIS

Fraqueza Membros superiores proximal  Fraqueza Membros superiores distal  Fraqueza Membros inferiores proximal  Fraqueza Membros inferiores distal  Fraqueza facial  Fraqueza cervical  Hipotonia geral  Hipotonia cervical  Atrofia muscular  Lordose  Cifose  Escoliose  Escápula alada  Deformidades em pés  Artrogripose  Deformidades articulares  Alteração de marcha  Ptose palpebral  Oftalmoparesia  Fasciculação  Dor muscular  Fadiga  Intolerância a exercícios  Mioglobinúria  Alteração cardíaca  Hepatomegalia  Esplenomegalia  Hérnia umbilical  Alteração respiratória  Sucção alterada  Disfagia  Choro fraco  Disfonia  Arreflexia  Hiporreflexia  Hiperreflexia  Reflexos profundos normais  Fenômeno miotônico clínico  Outro: .....  Outras malformações:.....

#### HISTÓRIA FAMILIAR, GESTAÇÃO E DESENVOLVIMENTO

Positiva:  NÃO  SIM, quem:.....  
 Movimentos fetais durante a gestação normais:  SIM  NÃO  
 Parto a termo:  SIM  NÃO, qual a idade gestacional:.....  
 Apgar:...../..... Alteração no nascimento:.....  
 Hipotonia ao nascimento:  SIM  NÃO  
 Choro fraco ao nascimento:  SIM  NÃO  
 Sucção débil:  SIM  NÃO  
 Atraso no desenvolvimento:  SIM  NÃO  
 Déficit cognitivo:  SIM  NÃO

#### EXAMES COMPLEMENTARES

##### Creatinofosfoquinase

##### Eletroneuromiografia

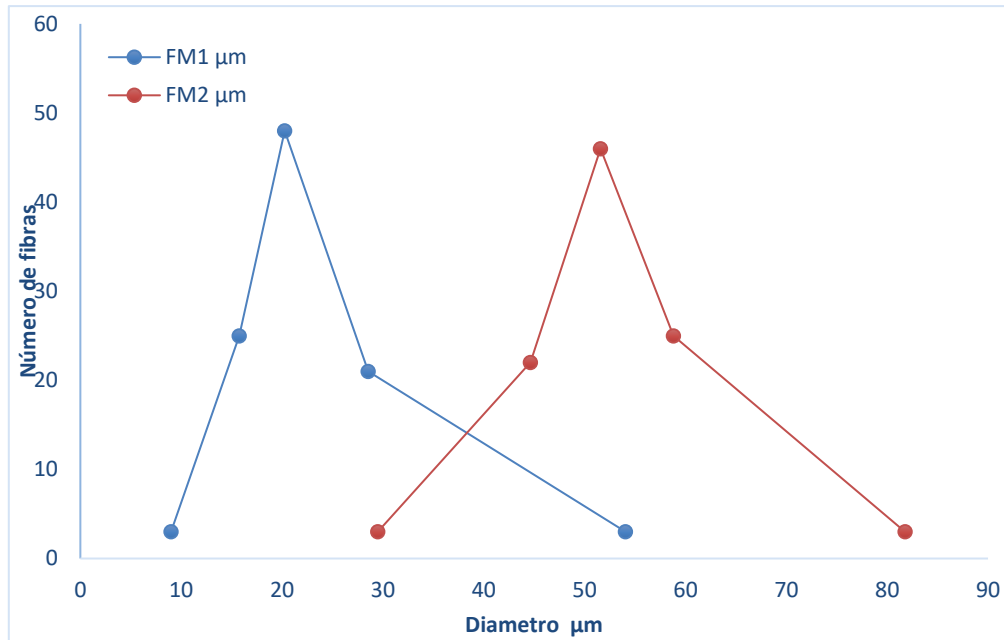
Realizado  Não realizado  
 Data: ...../...../.....  
 normal  padrão neuropático  padrão miopático  padrão misto  limítrofe miopático  
 Condução nervosa motora:  normal  alterada Qual alteração:.....  
 Condução nervosa sensitiva:  normal  alterada Qual alteração:.....  
 Descarga miotônica:  SIM  NÃO

##### Biópsia:

Realizado  Não realizado  
 Data: ...../...../.....  
 Resultado: .....

#### OUTROS DIAGNÓSTICOS:

Sim  Não  
 Quais:.....

**APÊNDICE B – HISTOGRAMA**

Apêndice B: Histograma do paciente número 28 do grupo B. FM1- fibras musculares tipo 1, FM2- fibras musculares tipo 2. Foi feito um histograma para cada paciente.

## APÊNDICE C – FATOR DE ATROFIA

$$FA = \frac{(1 \times NF \text{ 30 e } 40 \mu\text{m}) + (2 \times NF \text{ 20 e } 30 \mu\text{m}) + (3 \times NF \text{ 10 e } 20 \mu\text{m}) + (4 \times NF \text{ menores que } 10 \mu\text{m})}{\text{Número total de fibras}} \times 1000$$

Apêndice C- Fórmula para o cálculo do fator de atrofia. FA= fator de atrofia, NF= número de fibras entre.

Adaptado de Dubowitz, Oldfords e Sewry (2013). O fator de hipertrofia é derivado similarmente para expressar a proporção de fibras maiores do que 80  $\mu\text{m}$ , em homens, e maiores que 70  $\mu\text{m}$ , em mulheres.

**APÊNDICE D - TABELA DE DADOS GRUPO A**

Paciente	Sexo	Idade	Diagnóstico	FA1	FA2	AFMT1	FH1	FH2	Musculo
1	M	38	dermatopolimiosite	279	60	21,22%	0	15,15	vasto lateral
2	M	44	distrofia miotônica	190	60	16,66%	0	0	bíceps braquial
3	M	53	hipotireoidismo	1170	80	31,90%	0	0	bíceps braquial
4	F	42	hipotireoidismo	370	30	24,22%	0	20	bíceps braquial
5	F	50	distrofia miotônica	1850	10	53,68%	0	60	bíceps braquial
6	M	17	indeterminado	510	30	25,63%	0	0	vasto lateral
7	M	26	dermatopolimiosite	200	0	40,84%	0	0	bíceps braquial
8	M	14	encefalopatia crônica	880	310	19,74%	0	0	vasto lateral
9	M	39	distrofia de cinturas	2160	1410	23,97%	0	0	bíceps braquial
10	M	42	distrofia miotônica	1740	750	26,56%	0	290	bíceps braquial
11	M	40	distrofia de cinturas	380	30	29,27%	0	40	bíceps braquial
12	F	46	distrofia miotônica	580	50	29,26%	0	219	bíceps braquial
13	F	28	miastenia gravis	950	400	17,92%	0	0	bíceps braquial
14	M	21	indeterminado	120	10	23,02%	0	30	bíceps braquial
15	F	44	indeterminado	190	20	26,49%	0	30	vasto lateral
16	F	29	distrofia miotônica	120	30	13,44%			bíceps braquial
17	M	46	indeterminado	560	90	30,01%	0	0	bíceps braquial
18	M	15	distrofia miotônica	700	30	34,31%	0	10	bíceps braquial
19	F	25	distrofia miotônica	1780	80	45,18%	0	20	bíceps braquial
20	M	22	ataxia cerebelar recessiva	330	10	22,21%	0	22	bíceps braquial

Apêndice D- tabela de dados grupo A: M= masculino, F=feminino, FA1= fator de atrofia das fibras tipo 1, FA2= fator de atrofia das fibras tipo 2, AFMT1 = Atrofia de Fibras Tipo 1 em porcentagem, FH1= fator de hipertrofia das fibras tipo 1, FH2= fator de atrofia das fibras tipo 2.

## APÊNDICE E- TABELA DE DADOS GRUPO B

GRUPO B									
Paciente	sexo	idade	diagnóstico	FA1	FA2	AFMT1	FH1	FH2	Musculo
1	M	2	leucodistrofia metacromatica	2950	2590	20%	0	0	gastrocnêmico
2	F	10	miopatia congênita/ DCF	2270	80	55,93%	0	0	bíceps braquial
3	F	0,41	síndrome do bebê hipotônico	3170	2440	39,98%	0	0	vasto lateral
4	F	3	síndrome do bebê hipotônico	1600	1220	12,36%	0	0	vasto lateral
5	M	2	epilepsia	2320	1100	36,49%	0	0	vasto lateral
6	F	0,25	miopatia congênita - DCF	3450	2810	39,56%	0	0	vasto lateral
7	F	1	síndrome do bebê hipotônico	3410	3140	12,27%	0	0	vasto lateral
8	M	9	síndrome do bebê hipotônico/ Hipotonia congênita	850	330	29,90%	0	0	vasto lateral
9	F	4	distrofia de cinturas	2740	1570	39,12%	0	0	vasto lateral
10	M	7	síndrome de Hallervorden spatz	2330	1650	24,10%	0	0	vasto lateral
11	M	2	síndrome do bebê hipotônico	2900	2530	21,44%	0	0	vasto lateral
12	M	4	leucodistrofia	1830	1100	21,10%	0	0	vasto lateral
13	M	9	miopatia centronuclear	2220	1040	34,19%	0	0	vasto lateral
14	M	9	miopatia congênita - DCF	3110	2700	30,08%	0	0	bíceps braquial
15	M	8	síndrome do bebê hipotônico/ Hipotonia congênita	1230	410	20,37%	0	0	vasto lateral
16	M	3	distrofia miotônica	1550	590	16,01%	0	0	bíceps braquial
17	M	1	Amiotrofia espinhal	3080	2410	38,01%	0	0	vasto lateral
18	F	3	distrofia miotônica	2820	580	58,16%	0	0	vasto lateral
19	F	1	síndrome do bebê hipotônico	2170	1490	25,55%	0	0	vasto lateral
20	M	12	dermatomiosite	760	150	20,08%	0	0	vasto lateral
21	F	2	síndrome do bebê hipotônico	2440	1680	28,20%	0	0	vasto lateral
22	F	13	miopatia centronuclear	820	340	13,36%	0	0	vasto lateral
23	M	1	miopatia congênita - DCF	2940	2010	37,20%	0	0	vasto lateral
24	F	2	síndrome de Kabuki	3020	2190	38,80%	0	0	vasto lateral
25	F	0,41	síndrome do bebê hipotônico	3210	3050	12,04%	0	0	vasto lateral
26	M	1,5	síndrome do bebê hipotônico	3000	2320	30,56%	0	0	vasto lateral
27	M	2	distrofia miotônica	2430	2080	16,00%	0	0	vasto lateral
28	M	8	miopatia congenita - DCF	2210	90	54,58%	0	0	bíceps braquial

Apêndice E- tabela de dados grupo B: M= masculino, F=feminino, DCF= Desproporção Congênita de Fibras, FA1= fator de atrofia das fibras tipo 1, FA2= fator de atrofia das fibras tipo 2, AFMT1 = Atrofia de Fibras Tipo 1 em porcentagem, FH1= fator de hipertrofia das fibras tipo 1, FH2= fator de atrofia das fibras tipo 2.

**APÊNDICE F- ARTIGO****Type 1 fiber atrophy: Clinical and histological features of children and adults undergoing muscle biopsy**

Authors: Luciane Filla, MD; Rosana Herminia Scola, MD, PhD; Renata Dal-Prá Ducci, MD, PhD; Claudia Suemi Kamoi Kay, MD; Paulo José Lorenzoni, MD, PhD; Lineu Cesar Werneck, MD, PhD

Neuromuscular Service, Neurology Division, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

**Abstract word count:** 129

**Manuscript word count:** 2,018

**Corresponding author:** Luciane Filla - Neuromuscular Service, Neurology Division, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

Rua General Carneiro, 181 – 4º andar, 80060-900 – Curitiba, PR, Brazil

Fax and phone number: (55) 4133601807

E-mail: [lufilla@yahoo.com.br](mailto:lufilla@yahoo.com.br)

**Running title:** Type 1 muscle fiber atrophy

**Abstract**

**Background.** Type 1 muscle fiber atrophy (T1MFA) is considered a pathological sign of muscular diseases but is not an exclusive finding of neuromuscular disorders. This study aimed to evaluate the clinical and histological features of children and adults with T1MFA as the main histopathological diagnosis. **Methods.** This retrospective study included patients with T1MFA. Patients were divided into the adult and pediatric groups. Clinical and histological aspects were evaluated. **Results.** Myotonic dystrophy type 1 was the most commonly observed diagnosis in adults, while congenital myopathy was the most frequent diagnosis in children. Muscle weakness was the most common symptom in both groups. **Conclusions.** The histopathological diagnosis of T1MFA provides important data that aid in the definitive diagnosis in adults and children.

**Keywords:** Slow-twitch muscle fibers, type 1 muscle fiber atrophy, muscle biopsy, histochemistry, fiber size, fiber type

## Introduction

Human skeletal muscle consists of type 1, 2A, 2B and 2C fibers. These fibers have different biochemical properties. The distribution and size of type 1, 2A, and 2B fibers are similar and form a mosaic, with few differences according to their main function. Type 2C fibers are present in the fetal phase but not in mature tissue.<sup>1</sup> Fiber distribution is plastic, in which the muscle fibers have the capacity for remodeling to adapt the muscle to different uses and metabolic states.<sup>2</sup>

Muscle fiber diameters vary between 10 and 80 micrometers. At 1 year of age, the mean fiber diameter is 15  $\mu\text{m}$ , growing 2–4  $\mu\text{m}$  annually until reaching the mature phase at 14 years of age.<sup>1</sup>

Selective type 1 muscle fiber atrophy (TIMFA) is identified when the mean size of type 1 muscle fibers is at least 12% smaller than that of type 2 muscle fibers. This is usually considered a pathological sign related to hereditary muscular diseases such as congenital myopathies and muscular dystrophy, but it is not an exclusive finding of neuromuscular disorders.<sup>1,3</sup> There are few data on the frequency and characteristics of this condition, especially in adults.

It is important to analyze the distribution and size of different types of muscle fibers in biopsies to make a definitive diagnosis and understand the pathophysiology of various neuromuscular diseases. The main objective of this study is to characterize pediatric and adult patients presenting with TIMFA as the main histopathological diagnosis.

## Methods

We analyzed muscle biopsies performed at the Neuromuscular Disorder Center at the Hospital de Clínicas of the Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR), Curitiba-Brazil. This study was approved by the Human Research Ethics Committee of HC-UFPR, in accordance with the attributions defined in Brazilian Resolution CNS 466/2012.

**Sample:** We selected all patients with a histopathological diagnosis of TIMFA between January 1990 and March 2016. The patients were classified into two groups by age: group A, 14 years or older; and group B, younger than 14 years.

**Clinical evaluation:** Relevant data were collected from the neurology service database including age at biopsy and at symptom onset, sex, disease characteristics, and definitive diagnosis.

**Muscle biopsy analysis:** Muscle biopsies were performed by open surgery. The muscle biopsy samples were frozen in liquid nitrogen. Freshly frozen cryostat sections were stained according to standard procedure (hematoxylin-eosin; Gomori trichrome modified by Engel and Cunningham; periodic acid-Schiff; oil red O; and cresyl violet) and histochemical reactions were performed (adenosine triphosphatase activity at pH 9.4, 4.6, and 4.3; nicotinamide adenine tetrazolium reductase, reduced form, succinate dehydrogenase, nonspecific esterase, acid phosphatases, and alkaline phosphatases).<sup>4</sup>

**Measurement of fiber size:** In all samples, a new measurement of fiber size was performed to confirm the histopathological diagnosis of T1MFA. The samples were arranged in transverse sections. To determine the groups of muscle fibers, sections were stained for myofibrillar adenosine triphosphatase activity (ATPase) after preincubation at pH 4.3, 4.6, and 9.4. In the sections, all fibers were classified as type 1 or 2 and measurements of fiber diameter and the smallest fiber diameter using fully automated morphometric techniques (computer-aided microscopy, Nikon Eclipse 80i). Two hundred muscle fibers were measured per biopsy and histograms were constructed of each biopsy according to the methodology proposed by Brooke and Engel in 1969.<sup>5</sup>

**Statistical analysis:** The collected data were stored in a Microsoft Excel worksheet. The data analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 22.0. The results are expressed as mean, median, minimum, and maximum values and standard deviation for quantitative variables and as frequencies and percentages for qualitative variables. An inferential analysis was performed by Student's t-test and the chi-square statistical tests. The Kolmogorov-Smirnov test was performed to evaluate the normality of the quantitative variables. Values of  $p < 0.05$  were considered significant.

## **Results**

Of the 2246 muscle biopsies performed, 98 presented an initial histopathological diagnosis of T1MFA. Of these, we excluded 49 biopsies because of poor quality of the muscle sample, suboptimal ATPase staining, or a lack of confirmed T1MFA diagnosis according to the criteria used (13 patients). Thus, we included 49 patients: 21 in group A and 28 in group B.

**Group A:** The mean age was  $33.8 \pm 12.04$  years; 61.9% of the patients were male. The brachial biceps muscle was the site of the biopsy in 81% of cases. The mean time from symptom onset to muscle biopsy was  $5.5 \pm 5.2$  years. In the histological analysis, type 1 fibers were 13.44–53.68% smaller than type 2 fibers with a mean of

27.44 ± 10.04%. The size of the fibers varied according to Figure 1. In 66.67% of the patients, a neuromuscular disorder was identified and myotonic dystrophy type 1 was the most common diagnosis (33.33%). The symptoms are correlated to diagnosis in Table 1. The most commonly observed symptom was weakness (71.42%). In this group, no patient was diagnosed with congenital myopathy. In 14.1% of cases, besides TIMFA, central nuclei were also found. In these cases, all patients had a diagnosis of myotonic dystrophy type 1. In this group, 23.80% of patients were undiagnosed.

**Group B:** The mean age was 4.4 ± 3.86 years; 57.14% were male. The vastus lateralis muscle was the site of the biopsy in 82.15% of patients. The mean time from symptom onset to muscle biopsy was 3.2 ± 3.1 years. In the histological analysis, type 1 fibers were 12.04–58.16% smaller than type 2 fibers with a mean of 29.48 ± 13.20%. Fiber size varied as shown in Figure 1. In 46.43% of patients, a neuromuscular disorder was identified; the most common diagnosis was congenital myopathy (39.28%) due to centronuclear myopathy and congenital fiber type disproportion. The symptoms are correlated to diagnosis in Table 2. The most commonly observed symptom was weakness (60.71%). In this group, 10% of patients had a diagnosis of myotonic dystrophy type 1. In one patient, besides TIMFA, the presence of central nuclei was associated with the diagnosis of centronuclear myopathy. In this group, 35.71% of patients had floppy infant syndrome without an etiological diagnosis.

No statistical difference ( $p = 0.55$ ) was found in fiber type 1 and 2 sizes between groups A and B.

## Discussion

In this study, 4.36% of muscle biopsies performed at the single center service had a histopathological diagnosis of TIMFA, including adults and children. In children, similar data (6.73%) were already published by Imoto and Nonaka in 2001.<sup>3</sup> In adults, there are no data published to best of our knowledge. In our study, a variety of diagnoses were observed alongside TIMFA, including muscle diseases, metabolic disorders, and central and peripheral nervous system pathologies. This finding suggests that TIMFA is not an exclusive finding of neuromuscular disease. The finding of TIMFA is reportedly common in myogenic disorders; this same feature was observed in our study.<sup>3,6</sup> However, no detailed reports have described how often these abnormalities occur.

In both groups, weakness was the most common symptom related to TIMFA, but other features occurred, such as fatigue, ophthalmoparesis, hypotonia, and cognitive impairment (Tables 1 and 2). Weakness is a symptom that can occur in both central nervous system disorders and neuromuscular disorders. In 2001, Imoto and Nonaka reported the significance of type 1 fiber atrophy in childhood neuromuscular disorders.<sup>3</sup>

Congenital myopathy is the main diagnosis related to TIMFA in children, similar to what was reported by Imoto and Nonaka 2001.<sup>3</sup> However, this main diagnosis has not been identified in adults. TIMFA was seen in several congenital myopathies and was the pathological criterion for determining congenital fiber type disproportion.<sup>1</sup> In 2010, Romero demonstrated that centronuclear myopathy is a group of classic congenital myopathies defined by the presence of an abnormally high number of muscle fibers with nuclei organized in rows in the central part of the fiber and may be associated with type 1 predominance and TIMFA.<sup>7</sup>

In adults, the main diagnosis related to TIMFA is myotonic dystrophy type 1, which occurs in only 10% of children. The presence of numerous internal nuclei and various nuclear clusters on a muscle biopsy are common findings of myotonic dystrophy type 1 but this is usually a late finding, whereas type 1 fiber atrophy is an early finding.<sup>1</sup> In 2016, Talbot and Maves described in their review the presence of TIMFA in myotonic dystrophy type 1 and congenital fiber type disproportion.<sup>2</sup>

In our study, two cases of myopathy due to hypothyroidism with type 1 fiber atrophy were observed. The histological finding most commonly described in this disease is type 2 fiber atrophy as observed by Monforte *et al.* in 1990 and McKernan *et al.* in 1975.<sup>8,9</sup>

We found two patients with limb-girdle muscular dystrophy presenting with only TIMFA on the muscle biopsy. Abnormal variations in fiber size are observed on limb-girdle muscular dystrophy muscle biopsies. Hypertrophied fibers are common, and type 1 fibers tend to be smaller in diameter than type 2 fibers.<sup>1</sup>

In our study, two children had leukodystrophy that was associated with TIMFA. Although this feature was previously reported in patients with metachromatic leukodystrophy who underwent muscle biopsy, no clear explanation for this finding has been described.<sup>10</sup>

In our sample, one child had spinal muscular atrophy associated with TIMFA. Some studies described type 1 and 2 fiber atrophy on muscle biopsies of a patient with

spinal muscular atrophy, and the fibers are typically round rather than angular in shape.<sup>1,11</sup>

Floppy infant syndrome can be caused by a variety of neuromuscular diseases; due to difficulty defining the etiology, muscle biopsy remains an important diagnostic tool. In 2013, Bing *et al.* evaluated 25 patients with floppy infant syndrome using muscular biopsy and observed several diagnoses, including congenital muscular dystrophy and congenital myopathy.<sup>12</sup> Ten patients with floppy infant syndrome without etiological diagnoses were observed in the present study.

In dermatomyositis, besides inflammatory features, abnormal fiber sizes are common, mainly in the perifascicular area, and hypertrophied fibers are rare.<sup>1</sup> In our study, there were three cases of dermatomyositis associated with TIMFA, but no inflammatory signs were found on the muscle biopsies.

Muscle weakness and atrophy have been described in patients with spinocerebellar ataxia (SCA), but limited data show alterations in muscle biopsy, Svenstrup *et al.*, 2016 described three cases of SCA28 and in 2 patients the muscle biopsies showed TIMFA.<sup>13</sup> In our study, one case of SCA was identified associated with TIMFA in muscle biopsy.

Few abnormalities are seen in muscle biopsies in cases of myasthenia gravis, except at the neuromuscular junction. When alterations are seen on muscle biopsies of myasthenia gravis patients, they are focal and usually non-specific, including type 2 fiber atrophy and sometimes type 1 fiber atrophy, possibly accompanied by the presence of small dark angulated fibers.<sup>1</sup> In our study, we showed one case of myasthenia gravis with a histopathological diagnosis of TIMFA without other alterations.

Kabuki syndrome and neurodegeneration with brain iron accumulation are inherited diseases with predominant central nervous system symptoms. However, there are no data for these diseases regarding the presence of TIMFA on muscle biopsies. Similar findings occur for epilepsy, a heterogenous pathology that can occur concomitant to other disorders.<sup>14-16</sup>

Since TIMFA is not a common histological diagnosis, limitations of this study include its small number of samples, variety of etiological diagnoses, and lack of correlation with a genetic profile. Regarding the correlation between genetic profile and histological analysis of muscle biopsy in these patients, this was not the objective of our study, but we speculate that next-generation sequencing studies would be an important clue for understanding the occurrence of TIMFA in neuromuscular diseases. In

addition, the international literature has published few articles in this field, making comparisons between our and other studies difficult.

There are a variety of pathophysiologic conditions that preferentially affect specific skeletal muscle fiber types and understanding the fiber-type specific effects of these muscle disorders may provide important insights into muscle disease pathologies. Thus, the presence of T1MFA as histopathological diagnosis is helpful for diagnosing adults and children. In addition, our study shows the correlation between age at onset and etiological diagnosis in patients with T1MFA as the main histopathological diagnosis.

## **Abbreviations**

T1MFA, type 1 muscle fiber atrophy

HC-UFPR, Hospital de Clínicas of the Universidade Federal do Paraná

ATPase, adenosine triphosphatase activity

SCA, spinocerebellar ataxia

## **Acknowledgments:**

**Ethical Publication Statement:** We confirm that we have read the journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines.

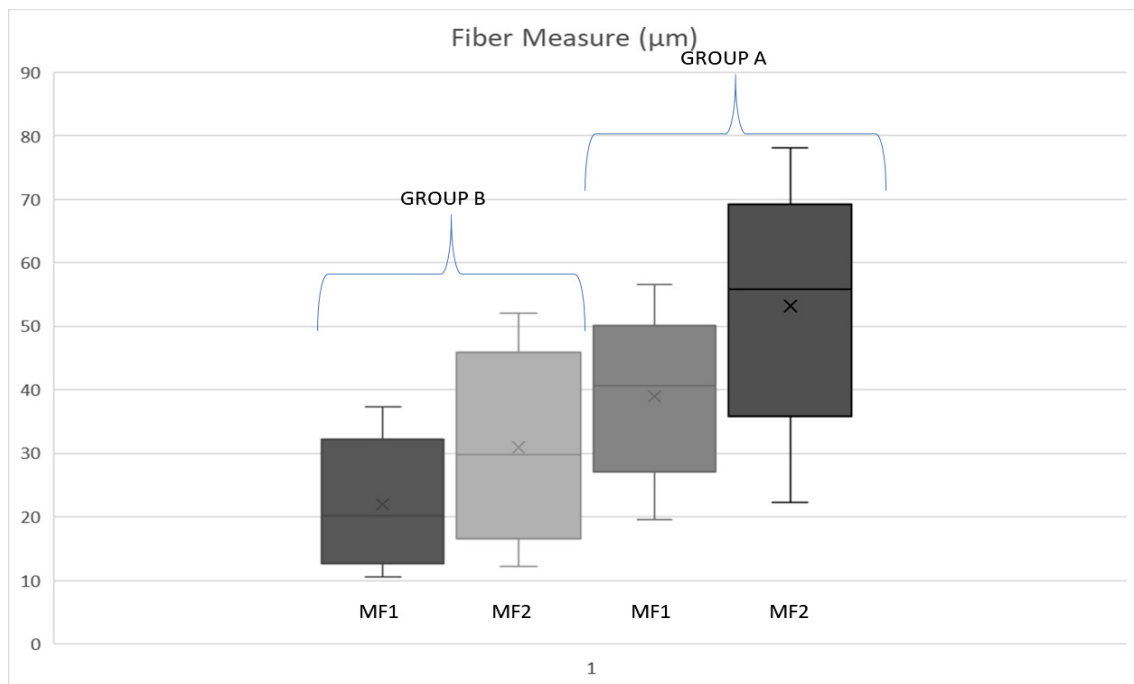
**Disclosure of Conflicts of Interest:** None of the authors declare any conflicts of interest. This study received no sponsorship or funding.

## References

1. Dubowitz V, Sewry CA, Oldfors A. Muscle biopsy: a practical approach. Philadelphia: Saunders-Elsevier; 2013.
2. Talbot J, Maves L. Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2016;5:518–34.
3. Imoto C, Nonaka I. The significance of type 1 fiber atrophy (hypotrophy) in childhood neuromuscular disorders. *Brain Dev.* 2001;23:298–307.
4. Werneck L. O valor da biópsia muscular em neurologia: análise de 290 exames a fresco e pela histoquímica. *Rev Bras ClinTerap.* 1981;10:2–24.
5. Brooke MH, Engel WK. The histographic analysis of human muscle biopsies with regard to fiber types: I. Adult male and female. *Neurology.* 1969;19:221–33.
6. Fardeau M, Tome F. Congenital myopathies. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, editors. *Myology.* New York: McGrawHill; 1994.
7. Romero NB. Centronuclear myopathies: a widening concept. *Neuromuscul Disord.* 2010;20:223–8.
8. Monforte R, Fernández-Solà J, Casademont J, Vernet M, Grau JM, Urbano-Márquez A. Hypothyroid myopathy. A clinical and histologic prospective study of 19 patients. *Med Clin (Barc).* 1990;95:126–9.
9. McKernan RO, Slavov G, Andrews TM, Ward P, Mair WGP. Muscle fibre type changes in hypothyroid myopathy. *J Clin Path.* 1975;28:659–63.
10. Werneck LC, Pereira JL, Bruck I. Metachromatic leukodystrophy: report of 2 cases with histochemistry of nerves and muscles. *Arq Neuropsiquiatr.* 1980;38:237–48.
11. Arnold WD, Kassar D, Kissel JT. Spinal muscular atrophy: diagnosis and management in a new therapeutic era. *Muscle Nerve.* 2015;51:157–67.
12. Bing Q, Hu J, Li N, Shen H, Zhao Z. Clinical and skeletal muscle biopsy characteristics of 25 patients with floppy infant syndrome. *Clin Neuropathol.* 2013;32:471–9.
13. Svenstrup K, Nielsen TT, Aidt F, Rostgaard N, Duno M, Wibrand F, *et al.* SCA28: Novel mutation in the AFG3L2 proteolytic domain causes a mild cerebellar syndrome with selective type-1 muscle fiber atrophy. *Cerebellum.*

- 2017;16:62–7.
14. Berg AT, Tarquinio D, Koh S. Early life epilepsies are a comorbidity of developmental brain disorders. *Semin Pediatr Neurol*. 2017;24:251–63.
  15. Cheon CK, Ko JM. Kabuki syndrome: clinical and molecular characteristics. *Korean J Pediatr*. 2015;58:317–24.
  16. Gothwal S, Nayan S. Hallervorden–Spatz syndrome with seizures. *Basic Clin Neurosci J*. 2016;7:165–6.

**Fig. 1** Mean diameter of muscular fibers type 1 and type 2 in micrometers ( $\mu\text{m}$ ) in group A and B



Mean diameter (average, maximum value, minimum value) of the muscular fibers type 1 (MF1) and type 2 (MF2) in micrometers ( $\mu\text{m}$ ) in group A and B.

Table 1. Correlation of diagnoses with signs and symptoms in group A.

	Weakness	Hyporeflexia	Ophthalmoparesis	Fatigue	Myalgia	Ataxia	Myotonia	Cognitive impairment	Ptosis
<b>CNS</b>									
Chronic encephalopathy N=1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Recessive cerebellar ataxia N=1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<b>NMD</b>									
Myotonic dystrophy N=7	7	1	0	0	0	0	1	1	2
Dermatomyositis N=2	1	0	0	1	0	0	0	0	0
Myasthenia gravis N=1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Limb-girdle muscular dystrophy N=2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Hypothyroidism N=2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Undiagnosed N=5	3	0	0	2	3	0	0	0	0

Table 1 correlates the diagnoses of patients with TIMFA with signs and symptoms expressed in N for each diagnosis in group A. N = number of patients, CNS= central nervous system disorders, NMD= neuromuscular disorders.

Table 2. Correlation of diagnoses with signs and symptoms in group B.

		Weakness	Hyporeflexia	Hyperreflexia	Cognitive impairment	Ptosis	Hypotonia
<b>CNS</b>	Epilepsy N=1	0	0	0	1	0	0
	Kabuki syndrome N=1	1	0	0	0	0	0
	NBIA N=1	1	0	0	0	0	0
	Leukodystrophy N= 2	0	0	0	1	0	1
<b>NMD</b>	Dermatomyositis N- 1	1	0	0	0	0	0
	Limb-girdle muscular dystrophy N=1	1	0	0	0	0	0
	Spinal muscular atrophy N=1	1	0	0	0	0	1
	myotonic dystrophy N=3	3	0	0	0	0	0
	Centronuclear myopathy N=2	2	2	0	0	0	1
	Congenital fiber type disproportion N=5	2	0	1	0	0	4
	Floppy baby N=10	4	0	0	0	2	10

Table 2 correlates the diagnoses of patients with TIMFA with signs and symptoms expressed in N for each diagnosis in group B. N = number of patients, CNS= central nervous system disorders, NMD= neuromuscular disorders.