

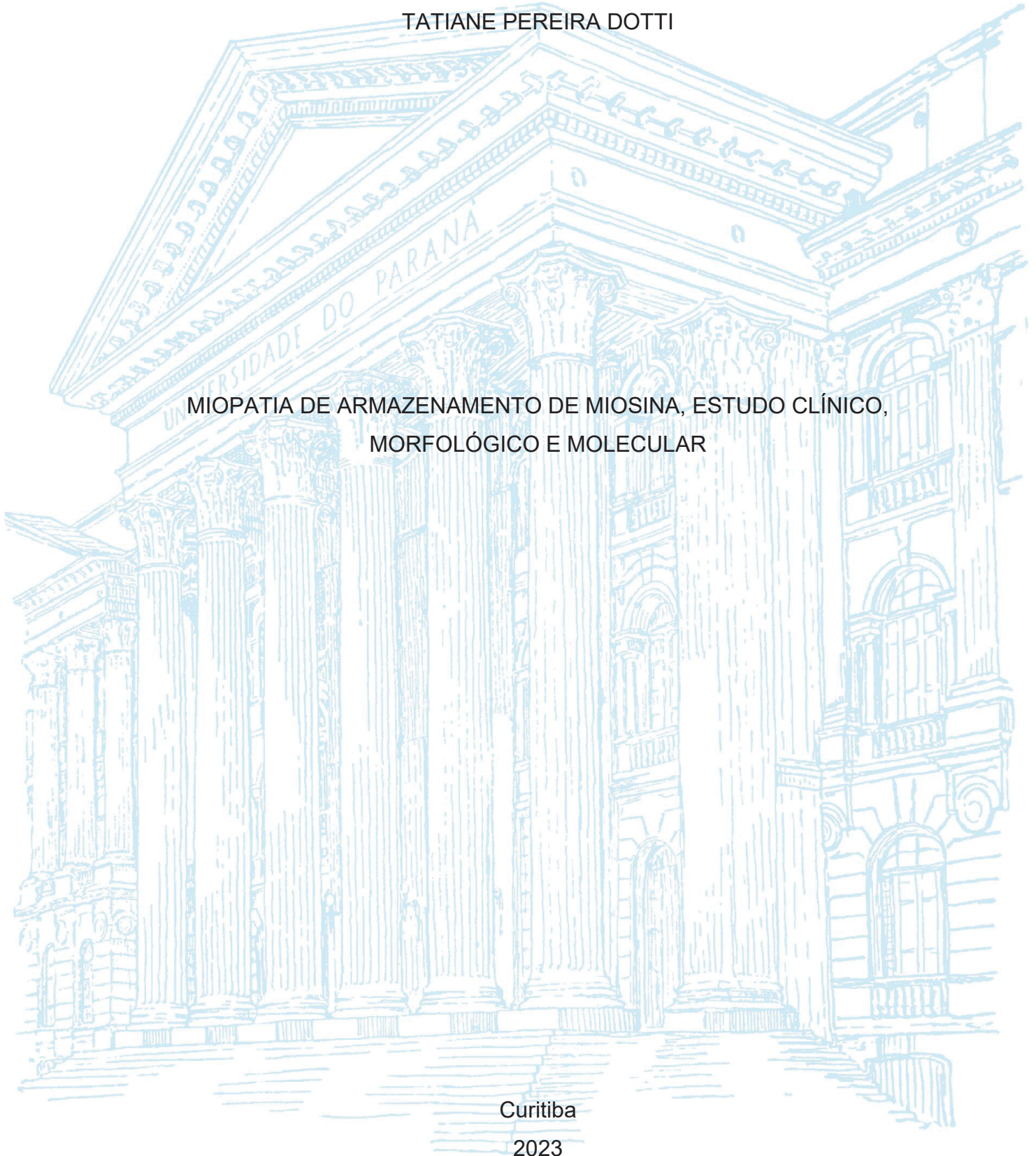
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TATIANE PEREIRA DOTTI

MIOPATIA DE ARMAZENAMENTO DE MIOSINA, ESTUDO CLÍNICO,
MORFOLÓGICO E MOLECULAR

Curitiba

2023



TATIANE PEREIRA DOTTI

MIOPATIA DE ARMAZENAMENTO DE MIOSINA, ESTUDO CLÍNICO,
MORFOLÓGICO E MOLECULAR

Projeto submetido como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Medicina Interna e Ciências da Saúde, no Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna, Setor de Ciências da Saúde., da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^aDr^a. Rosana Herminia Scola

Curitiba

2023

D725 Dotti, Tatiane Pereira

Miopatia de armazenamento de miosina, estudo clínico, morfológico e molecular [recurso eletrônico] / Tatiane Pereira Dotti. – Curitiba, 2023.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.
Orientadora: Rosana Herminia Scola

1. Doenças musculares. 2. Miopatias congênitas estruturais. 3. Distrofia muscular de Emery-Dreifuss. I. Scola, Rosana Herminia. II. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

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

ATA Nº020

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRA EM MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

No dia onze de abril de dois mil e vinte e três às 09:00 horas, na sala <https://bit.ly/3YArJZG>, MICROSOFT TEAMS, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação da mestranda **TATIANE PEREIRA DOTTI**, intitulada: "**MIOPATIA DE ARMAZENAMENTO DE MIOSINA, ESTUDO CLÍNICO, MORFOLÓGICO E MOLECULAR.**", sob orientação da Profa. Dra. ROSANA HERMINIA SCOLA. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: ROSANA HERMINIA SCOLA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), ELCIO JULIATO PIOVESAN (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), CLAUDIA FERREIRA DA ROSA SOBREIRA (FACULDADE DE MEDICINA USP - FM/USP). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestra está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, ROSANA HERMINIA SCOLA, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

Curitiba, 11 de Abril de 2023.

Assinatura Eletrônica

17/04/2023 18:31:56.0

ROSANA HERMINIA SCOLA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

11/04/2023 11:35:22.0

ELCIO JULIATO PIOVESAN

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

18/04/2023 15:36:51.0

CLAUDIA FERREIRA DA ROSA SOBREIRA

Avaliador Externo (FACULDADE DE MEDICINA USP - FM/USP)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **TATIANE PEREIRA DOTTI** intitulada: "**MIOPATIA DE ARMAZENAMENTO DE MIOSINA, ESTUDO CLÍNICO, MORFOLÓGICO E MOLECULAR.**", sob orientação da Profa. Dra. ROSANA HERMINIA SCOLA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra 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, 11 de Abril de 2023.

Assinatura Eletrônica

17/04/2023 18:31:56.0

ROSANA HERMINIA SCOLA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

11/04/2023 11:35:22.0

ELCIO JULIATO PIOVESAN

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

18/04/2023 15:36:51.0

CLAUDIA FERREIRA DA ROSA SOBREIRA

Avaliador Externo (FACULDADE DE MEDICINA USP - FM/USP)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir e nos dar condições de construir e evoluir todos os dias.

À Professora Dra. Rosana Herminia Scola, a responsável por este projeto, por ter me incentivado e me inspirado, pela oportunidade, pelos ensinamentos e pelo seu tempo dedicado com zelo para me orientar.

À minha família que sempre me apoiou e contribuiu com amor em todas as minhas decisões. Aos colegas e professores que colaboraram com os seus conhecimentos e ferramentas para auxiliar no projeto. Em especial meus agradecimentos às técnicas do laboratório do Serviço de Doenças Neuromusculares NyviaHrysay e Raquel Arndt.

Aos médicos e professores do Serviço de Doenças Neuromusculares: Lineu Cesar Werneck, Claudia Kamoi Kay, Paulo Lorenzoni, Paula Rodrigues, Otto Fustes e Renata Dal Pra-Ducci, ao cardiologista prof. Dr Raphael Henrique Déa Cirino pela realização dos eletrocardiogramas e ecocardiogramas, a Dra. Daniella Porfírio Nunes pelo auxílio nos exames de espirometria, e a radiologista Bruna Sarolli pelo auxílio nos exames de imagem musculoesquelética.

Agradeço ao Serviço da Unidade de Neurologia e ao Complexo do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná CHC-UFPR. Agradeço aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Aos pacientes pela generosidade em participar voluntariamente da pesquisa, acreditando na evolução da ciência. À todos que, mesmo não tendo sido citados, participaram indiretamente desta pesquisa, sendo corresponsáveis pelo seu desenvolvimento, cada um com o seu valor. Agradeço ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que foi essencial para o desenvolvimento do trabalho. Enfim, concluo esta etapa repleta de gratidão por todo conhecimento adquirido e com a certeza de que sempre vale apenas sonhar, acreditar, lutar e buscar os nossos sonhos.

“A realidade é criada pela nossa mente, nós podemos mudar a nossa realidade mudando a nossa mente”

RESUMO

Miopatia congênita é um grupo de distúrbios musculares hereditários que geralmente se apresentam com fraqueza muscular, início na infância, e são caracterizados por alterações histopatológicas na fibra muscular. Este grupo de doenças inclui a miopatia de armazenamento de miosina, um subtipo raro de miopatia caracterizada pela presença de corpos hialinos subsarcolemas nas fibras musculares. O objetivo deste estudo foi avaliar as características clínicas, histopatológicas e moleculares de pacientes diagnosticados com miopatia de armazenamento de miosina. Revisamos retrospectivamente as biópsias de pacientes provenientes do Banco de Dados de Biópsias Musculares do Serviço de Doenças Neuromusculares do Complexo Hospital de Clínicas/UFPR atendidos no período entre 2001 e 2021. Foram identificados 2 pacientes da mesma família que apresentavam achados histopatológicos compatíveis com essa miopatia. A partir destes, foi incluído 5 integrantes da mesma família, totalizando 7 pacientes. Todos os pacientes foram submetidos à avaliação clínica, 6 pacientes realizaram a dosagem de CPK, 3 pacientes realizaram a eletroneuromiografia, 6 pacientes realizaram a avaliação cardíaca, um paciente realizou o exame de imagem por ressonância magnética, 6 pacientes realizaram a avaliação respiratória e todos os pacientes realizaram o estudo genético. O início dos sintomas ocorreu predominantemente na primeira infância. Os achados clínicos mais frequentes foram: escápula alada, escoliose, hiperlordose, fraqueza predominante em cintura escapular e pseudo-hipertrofia de panturrilhas. Alguns achados raros importantes como baqueteamento digital, unhas em vidro de relógio foram observados. A dosagem de CPK foi elevada na maioria dos pacientes. A eletroneuromiografia mostrou padrão miopático. Três pacientes apresentaram anormalidades cardíacas relevantes. A espirometria demonstrou redução da CVF em todos os pacientes do nosso estudo. O estudo das imagens revelou liposs substituição e edema dos ventres musculares da cintura escapular, coxas e glúteos. O estudo anatomopatológico revelou a presença de corpos hialinos semelhantes às descrições em literatura. O diagnóstico molecular revelou a mutação (p.Arg1845Trp) em heterozigose no gene *MYH7*. Os pacientes têm variação na apresentação das manifestações clínicas, sendo que, alterações típicas como escápula alada, hiperlordose, e pseudo-hipertrofia podem ser encontradas na maioria dos pacientes. Alterações atípicas encontradas foram a presença de baqueteamento digital e unhas em vidro de relógio. Até o momento 9 casos em literatura relatam a mesma mutação em pacientes diagnosticados com miopatia de armazenamento de miosina, assim, este estudo confirma que a mutação (p.Arg1845Trp) é comum e associada a este fenótipo. Este estudo contribui para a descrição clínica, morfológica e molecular dessa doença rara.

Palavras-chave: miopatias congênitas; miopatia de armazenamento de miosina; biópsia muscular; corpos hialinos; *MYH7*.

ABSTRACT

Congenital myopathy is a group of inherited muscle disorders that usually present with muscle weakness, onset in infancy, and are characterized by histopathologic changes in the muscle fiber. This group of disorders includes myosin storage myopathy, a rare subtype of myopathy characterized by the presence of subsarcolemmal hyaline bodies in muscle fibers. The aim of this study was to evaluate the clinical, histopathological, and molecular characteristics of patients diagnosed with myosin storage myopathy. We retrospectively reviewed patient biopsies from the Muscle Biopsy Database at Serviço de Doenças Neuromusculares do Complexo Hospital de Clínicas/UFPR seen between 2001 and 2021. We identified 2 patients from the same family who presented histopathological findings compatible with this myopathy. From these, 5 members of the same family were included, totaling 7 patients. All patients underwent clinical evaluation, 6 patients underwent CPK dosage, 3 patients underwent electroneuromyography, 6 patients underwent cardiac evaluation, one patient underwent magnetic resonance imaging, 6 patients underwent respiratory evaluation, and all patients underwent a genetic study. The onset of symptoms occurred predominantly in early childhood. The most frequent clinical findings were: winged scapula, scoliosis, hyperlordosis, predominant weakness in the shoulder girdle and pseudohypertrophy of the calves. Some important rare findings like digital clubbing, watch-glass nails were observed. CPK dosage was elevated in most of the patients. Electroneuromyography showed myopathic pattern. Three patients had relevant cardiac abnormalities. Spirometry demonstrated reduced FVC in all patients in our study. Imaging study revealed liposubstitution and edema of the muscle ventres of the scapular waist, thighs and buttocks. The pathological study revealed the presence of hyaline bodies similar to descriptions in the literature. Molecular diagnosis revealed a mutation (p.Arg1845Trp) in heterozygosity in the *MYH7* gene. The patients have variation in the presentation of clinical manifestations, with typical changes such as winged scapula, hyperlordosis, and pseudohypertrophy being found in most patients. Atypical changes found were the presence of digital clubbing and watch-glass nails. To date 9 cases in literature report the same mutation in patients diagnosed with myosin storage myopathy, thus this study confirms that the mutation (p.Arg1845Trp) is common and associated with this phenotype. This study contributes to the clinical, morphological and molecular description of this rare disease.

Keywords: congenital myopathies; myosin storage myopathy; muscle biopsy; hyaline bodies; *MYH7*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Características anatomopatológicas das fibras musculares na miopatia de armazenamento de miosina	18
FIGURA 2 – Representação esquemática da estrutura da proteína miosina e mutações associadas a miopatia de armazenamento de miosina	19
FIGURA 3 - Fluxograma dos métodos de estudo.....	34
FIGURA 4 - Primers (em amarelo) desenhados para o fragmento correspondente ao éxon 37 (representado em vermelho) do gene <i>MYH7</i> para amplificação por meio da pcr, gerando um produto de 486 pb	37
FIGURA 5 - Perfil eletroforético das amostras. Bandas de DNA em agarose.....	39
FIGURA 6–Imagem da paciente 1 e achados clínicos importantes	42
FIGURA 7 - Imagem por ressonância magnética da cintura escapular.....	44
FIGURA 8 - Imagem por ressonância magnética das coxas.....	45
FIGURA 9 - Imagem por ressonância magnética da cintura pélvica	46
FIGURA 10 - Características das colorações na biópsia muscular do caso 1	47
FIGURA 11 - Características das reações na biópsia muscular do caso 1	48
FIGURA 12 - Eletroferograma da paciente 1. Na seta, em y indica a mutação em heterozigose no sítio c.5533C>T	49
FIGURA 13 - Heredograma familiar	50
FIGURA 14 - Imagem do paciente 2 e achados clínicos importantes	52
FIGURA 15 - Características das colorações na biópsia muscular do caso 2	57
FIGURA 16 - Características das reações na biópsia muscular do caso 2	58

FIGURA 17 - Eletroferograma do paciente 2. Na seta, em y indica a mutação em heterozigose no sítio c.5533C>T	59
FIGURA 18 - Imagem do paciente 3 e achados clínicos importantes	60
FIGURA 19 - Eletroferograma do paciente 3. Na seta, em y indica a mutação em heterozigose no sítio c.5533C>T	60
FIGURA 20 - Imagem do paciente 4 e achados clínicos importantes	62
FIGURA 21 - Eletroferograma do paciente 4. Na seta, em y indica a mutação em heterozigose no sítio c.5533C>T	63
FIGURA 22 - Imagem do paciente 5 e achados clínicos importantes	64
FIGURA 23 - Imagem do paciente 6 e achados clínicos importantes	66
FIGURA 24 - Imagem do paciente 7 e achados clínicos importantes	68
FIGURA 25 – Eletroferograma do paciente 7. Na seta, em y indica a mutação em heterozigose no sítio c.5533C>T	69

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Características clínicas e laboratoriais dos casos de miopatia de armazenamento de miosina com mutação heterozigótica no gene <i>MYH7</i> (p.Arg1845Trp).....	25
TABELA 1A - Características clínicas e laboratoriais dos casos de miopatia de armazenamento de miosina com mutação heterozigótica no gene <i>MYH7</i> (p.Arg1845Trp).....	25
TABELA 1B - Características clínicas e laboratoriais dos casos de miopatia de armazenamento de miosina com mutação heterozigótica no gene <i>MYH7</i> (p.Arg1845Trp).....	257
TABELA 2 - Características das estruturas em corpos hialinos por microscopia óptica dos casos 1 e 2.....	54
TABELA 3 - Alterações anatomopatológicas específicas das colorações na biópsia muscular dos casos 1 e 2.....	55
TABELA 4 - Alterações anatomopatológicas específicas das reações na biópsia muscular dos casos 1 e 2.....	56
TABELA 5 - Dados demográficos, sintomas iniciais e evolução clínica dos pacientes com miopatia de armazenamento de miosina do presente estudo	71
TABELA 6 - Achados clínicos importantes dos pacientes com miopatia de armazenamento de miosina do presente estudo.....	72
TABELA 7 - Força motora de acordo com a classificação modificada do medical research council dos pacientes estudados.....	73
TABELA 8 - Resultados dos exames realizados nos pacientes com miopatia de armazenamento de miosina do presente estudo.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS

ATPase	Adenosinatrifosfatase
BLAST	Do inglês, <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CAAE	Certificado de apresentação de Apreciação Ética
CHC	Complexo Hospital de Clínicas
COX	Citocromo c-oxidase
CPK	Creatina Fosfoquinase
CVF	Capacidade Vital Forçada
DNA	Do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	Do inglês, <i>deoxynucleotidetriphosphates</i>
ECG	Eletrocardiograma
EDTA	Do inglês, <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
ENMG	Eletroneuromiografia
ETT	Ecocardiograma transtorácico
FA	Fosfatase ácida
FAL	Fosfatase alcalina
GRCh37	Do inglês, <i>Genome Reference Consortium Human Build 37</i>
HE	Hematoxilina e eosina
MMII	Membros inferiores

MMSS	Membros superiores
MRC	Do inglês, <i>Medical Research Council</i>
NADH-TR	Nicotinamida adenina dinucleotídeo – tetrazolium redutase
NCBI	Do inglês, <i>National Center for Biotechnology Information</i>
OMIM	Do inglês, <i>Online Mendelian Inheritance in Men</i>
PAS	Ácido periódico Schiff
PB	Pares de bases
PCR	Do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
OIL RED O	Óleo vermelho O
RPM	Rotação por minuto
SDH	Desidrogenase succínica
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TBE	Tris Borato Edta
TG	Tricrômico de Gomori
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UV	Radiação ultravioleta
VEF	Volume Expiratório Forçado

LISTA DE SÍMBOLOS

g	Gramas
mL	Mililitro
mM	Milimolar
μ L	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 JUSTIFICATIVA	28
5 MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	28
5.2 DELINEAMENTO DA PESQUISA.....	29
5.3 LOCAL DO ESTUDO E PERÍODO	29
5.4 CASUÍSTICA.....	29
5.4.1 Critérios de inclusão	29
5.4.2 Critérios de exclusão	29
5.5 PACIENTES	29
5.5.1 Estudo clínico	30
5.5.2 Exame Laboratorial	30
5.5.3 Eletroneuromiografia	30
5.5.4 Eletrocardiograma e Ecocardiograma Transtorácico	31
5.5.5 Espirometria	31

5.5.6 Estudo por imagem com ressonância magnética	31
5.5.7 Biópsia Muscular	32
5.5.8 Estudo genético.....	32
5.5.8.1 Extração de DNA.....	33
5.5.8.2 Quantificação do DNA em espectrofotômetro	36
5.5.8.3 Seleção dos primers.....	36
5.5.8.4 Amplificação de DNA por PCR.....	37
5.5.8.5 Quantificação do DNA em gel de agarose	38
5.5.8.6 Sequenciamento de Sanger	39
6 RESULTADOS.....	41
6.1 CASO 1	41
6.1.1 Dados demográficos e achados clínicos	41
6.1.2 Exame laboratorial	42
6.1.3 Eletroneuromiografia	42
6.1.4 Avaliação cardíaca	43
6.1.5 Espirometria	43
6.1.6 Exame de imagem	43
6.1.7 Biópsia Muscular	46
6.1.8 Estudo genético.....	49
6.1.9 Heredograma	49

6.2 CASO 2	51
6.2.1 Dados demográficos e achados clínicos	51
6.2.2 Exame laboratorial	52
6.2.3 Eletroneuromiografia	53
6.2.4 Avaliação cardíaca	53
6.2.5 Espirometria	53
6.2.6 Biópsia muscular	53
6.2.7 Estudo genético	58
6.3 CASO 3	59
6.3.1 Dados demográficos e achados clínicos	59
6.3.2 Estudo genético	60
6.4 CASO 4	61
6.4.1 Dados demográficos e achados clínicos	61
6.4.2 Exame laboratorial	62
6.4.3 Avaliação cardíaca	63
6.4.4 Espirometria	63
6.4.5 Estudo genético	63
6.5 CASO 5	64
6.5.1 Dados demográficos e achados clínicos	64
6.5.2 Exame laboratorial	65

6.5.3 Eletroneuromiografia	65
6.5.4 Avaliação cardíaca	65
6.5.5 Espirometria	65
6.5.6 Estudo genético	65
6.6 CASO 6	65
6.6.1 Dados demográficos e achados clínicos	65
6.6.2 Exame laboratorial	67
6.6.3 Avaliação cardíaca	67
6.6.4 Espirometria	67
6.6.5 Estudo genético	67
6.7 CASO 7	67
6.7.1 Dados demográficos e achados clínicos	67
6.7.2 Exame laboratorial	68
6.7.3 Avaliação cardíaca	68
6.7.4 Espirometria	69
6.7.5 Estudo genético	69
6.8 RESULTADOS GERAIS	69
7 DISCUSSÕES	75
8 CONCLUSÕES	82
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

APÊNDICE 1 – PARÂMETROS AVALIADOS EM PACIENTES COM MIOPATIA DE ARMAZENAMENTO DE MIOSINA.....	87
APÊNDICE 2 - FORÇA MOTORA DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO MODIFICADA DO MEDICAL RESEARCH COUNCIL	89
ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO PARA USO DE IMAGENS (FOTOS E VÍDEOS).....	91

1 INTRODUÇÃO

As miopatias congênitas referem-se a um grupo de doenças musculares hereditárias de aspectos clínicos, histológicos e moleculares variáveis que apresentam fraqueza muscular com início na infância, caracterizadas geralmente por um curso clínico lentamente progressivo (CASSANDRINI, *et al.*, 2017). O diagnóstico das miopatias congênitas é realizado a partir de uma análise criteriosa dos achados clínicos, e, achados na biópsia muscular que constitui um dos pilares fundamentais para o diagnóstico. Ademais, os exames de enzimas musculares, eletroneuromiografia, imagem muscular e estudo genético auxiliam no diagnóstico diferencial (BISCIGLIA; MALFATTI, 2020).

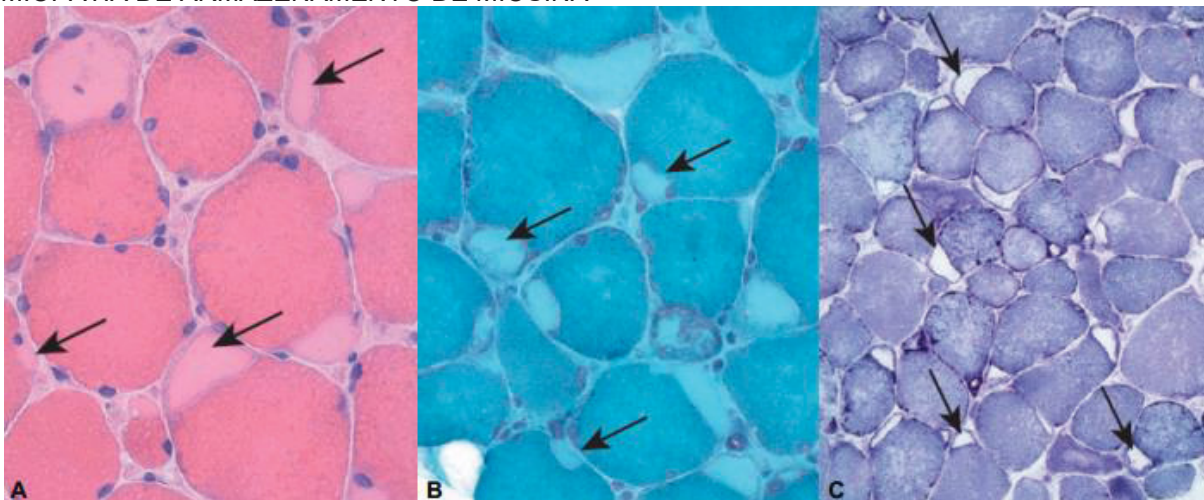
Nas miopatias congênitas vários genes já foram associados a diferentes expressões fenotípicas, bem como, histopatológicas, indicando a elevada heterogeneidade destes distúrbios musculares. Em outras palavras, múltiplas mutações genéticas podem causar as mesmas alterações histológicas, e algumas mutações genéticas podem causar mais de uma alteração patológica (CASSANDRINI, *et al.*, 2017). Assim, as anormalidades histopatológicas permitem uma classificação preliminar e os avanços na área da genética vêm contribuindo para a reorganização dessas classificações (D'AMICO; BERTINI, 2008).

Historicamente, os subtipos das miopatias congênitas foram classificadas conforme as alterações estruturais encontradas no exame de biópsia muscular e divididas seguinte forma: miopatia com presença de *cores* (subtipos: *central core* e *multiminicore*); miopatia centronuclear (subtipos: miopatia miotubular e centronuclear autossômica); miopatia de desproporção congênita de tipo de fibra; miopatia nemalínica (subtipos: *core rod*, *cap*, corpos zebróides) e miopatia de armazenamento de miosina (CASSANDRINI, *et al.*, 2017). Uma meta-análise recente demonstrou que a prevalência estimada das miopatias congênitas na população geral é de 1,5 casos por 100.000 indivíduos (HUANG; BI; YANG, 2021). Neste estudo iremos abordar os aspectos clínicos, histológicos e genéticos em pacientes de uma família com miopatia de armazenamento de miosina em duas gerações.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A miopatia de armazenamento de miosina ou miopatia de corpo hialino é uma miopatia rara caracterizada pela presença de corpos hialinos subsarcolemas nas fibras musculares do tipo 1, com cerca de 75 casos descritos em literatura (VISWANATHAN *et al.*, 2017). Essa doença foi descrita pela primeira vez em 1971, sendo denominada inicialmente como “miopatia familiar com provável lise de miofibrilas em fibras do tipo I” (CANCILLA, *et al.*, 1971). Na sequência, Sahgal e Sahgal (1977) relataram um caso de miopatia caracterizada por fraqueza escápulo-peroneal e presença de estruturas subsarcolemas reativas a adenosina trifosfatase (ATPase) ácida nas fibras musculares afetadas. Posteriormente, Engel e Banker (1986) detalharam as características dessas estruturas, sendo pálidas à reação de hematoxilina-eosina (HE) e ao tricrômico de Gomori (TG), reativas a ATPase ácida e não reativas para as enzimas oxidativas e sugeriram a denominação de corpos hialinos devido à aparência vítrea dessas inclusões na coloração tricrômica. Dubowitz, Oldfords e Sewry (2013) documentaram essas estruturas conforme exemplificado na FIGURA 1. Dessa forma, a partir destes achados, o termo miopatia de corpos hialinos foi introduzido de forma preferencial até meados do ano de 2003 (CEUTERIK; MARTIN; MARTENS, 1993; BAROHN; BRUMBACK; MENDELL, 1994; MASUZUGAWA, *et al.*, 1997; BOHLEGA *et al.*, 2003).

FIGURA 1 - CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS DAS FIBRAS MUSCULARES NA MIOPATIA DE ARMAZENAMENTO DE MIOSINA

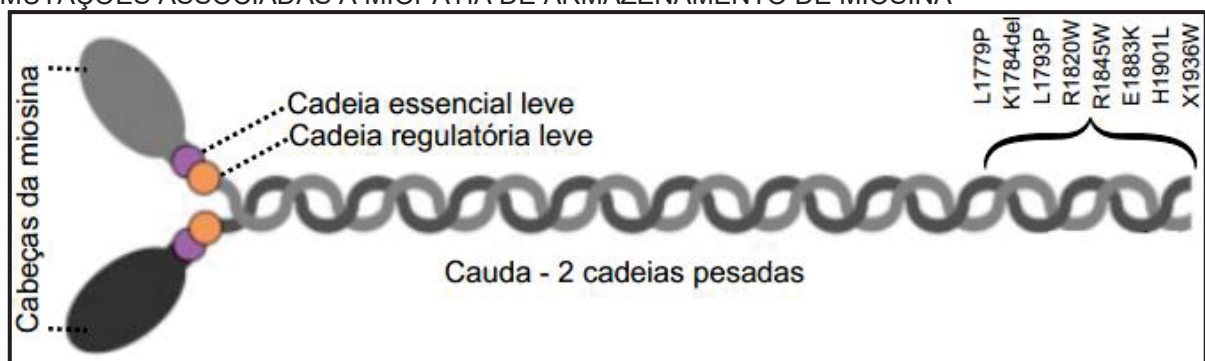


LEGENDA: Em A: Coloração em HE, material hialino subsarcolemal; Em B: Coloração em TG, material hialino subsarcolemal; Em C: Reação em NADH-TR (nicotinamida desidrogenase tetrazolium redutase) corpos hialinos não reativos.

FONTE: Dubowitz; Oldfords; Sewry (2013).

Consequente, Tajsharghi *et al.* (2003) realizou o primeiro estudo genético em em duas famílias e identificou a mutação missense (p.Arg1845Trp) no gene *MYH7*, que fornece as informações necessárias para codificar a cadeia pesada beta (β)-miosina e propuseram um novo termo para essa doença: “miopatia de armazenamento de miosina”. Essa proteína constitui os filamentos grossos do sarcômero e é encontrada no músculo cardíaco e nas fibras musculares esqueléticas do tipo 1. Desta forma, essa foi a primeira miopatia do músculo esquelético descrita como sendo causada por uma mutação no gene *MYH7* (VISWANATHAN, *et al.*, 2017). Desde então, análises genotípicas identificaram 8 mutações responsáveis pela causa dessa miopatia, conforme representado na FIGURA 2 (LAING, *et al.*, 2005; SHINGDE, *et al.*, 2006; PEGORARO *et al.*, 2007; KINPHUTH *et al.*, 2010).

FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DA PROTEÍNA MIOSINA E MUTAÇÕES ASSOCIADAS A MIOPATIA DE ARMAZENAMENTO DE MIOSINA



FONTE: Adaptado de VISWANATHAN *et al.* (2017)

A apresentação clínica é ampla e heterogênea. Foram descritos 33 casos com início na infância (SAHGAL; SAHGAL, 1977; CEUTERIK; MARTIN; MARTENS, 1993; BAROHN; BRUMBACK; MENDELL, 1994; MASUZUGAWA, *et al.*, 1997; BOHLEGA *et al.*, 2003; TAJSHARGHI *et al.*, 2003; ONENGUT, *et al.*, 2004; LAING *et al.*, 2005; RAFAY; HALLIDAY; BRIL, 2005; SHINGDE, *et al.*, 2006; PEGORARO *et al.*, 2007; URO-COSTE *et al.*, 2009; STALPERS, *et al.*, 2011; BANFÁI, *et al.*, 2017; MAMELONA, *et al.*, 2019), e 22 casos em que os pacientes permaneceram assintomáticos até a fase adulta (MASUZUGAWA, *et al.*, 1997; BOHLEGA *et al.*, 2003; ONENGUT, *et al.*, 2004; TAJSHARGHI *et al.*, 2003; PEGORARO *et al.*, 2007; URO-COSTE *et al.*, 2009; KINPHUTH *et al.*, 2010; BANFÁI, *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2018). Quanto a evolução da doença, a miopatia de armazenamento de miosina foi lenta e progressiva na maioria dos casos (CANCILLA, *et al.*, 1971; MASUZUGAWA,

et al., 1997; TAJSHARGHI *et al.*, 2003; BOHLEGA *et al.*, 2003; LAING *et al.*, 2005; SHINGDE, *et al.*, 2006; PEGORARO *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2018).

No que tange a distribuição e localização da fraqueza muscular, observa-se predominância nos músculos proximais, simétricos, com o envolvimento da cintura pélvica e escapular (SAHGAL; SAHGAL, 1977; BAROHN; BRUMBACK; MENDELL, 1994; MASUZUGAWA, *et al.*, 1997; TAJSHARGHI *et al.*, 2003; RAFAY; HALLIDAY; BRIL, 2005) embora acometimento distal e menos acentuado também tenha sido relatado (TAJSHARGHI *et al.*, 2003; SHINGDE, *et al.*, 2006; PEGORARO *et al.*, 2007). Outro achado importante é a marcha anserina, observada em 16 casos relatados em literatura (SAHGAL; SAHGAL, 1977; BAROHN; BRUMBACK; MENDELL, 1994; MASUZUGAWA, *et al.*, 1997; TAJSHARGHI *et al.*, 2003; ONENGUT, *et al.*, 2004; LAING *et al.*, 2005; TAJSHARGHI *et al.*, 2007; STALPERS, *et al.*, 2011; BANFÁI, *et al.*, 2017). Além disso, as características clínicas mais frequentes descritas em literatura são: escápula alada (n=15) hiperlordose (n=9) hipertrofia de panturrilhas (n=10) e pés caídos (n=11) (SAHGAL; SAHGAL, 1977; MASUZUGAWA, *et al.*, 1997; TAJSHARGHI *et al.*, 2003; RAFAY; HALLIDAY; BRIL, 2005; SHINGDE, *et al.*, 2006; PEGORARO *et al.*, 2007; TAJSHARGHI *et al.*, 2007; KINPHUTH *et al.*, 2010; STALPERS, *et al.*, 2011; BANFÁI, *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2018). Os achados menos frequentes, porém também importantes, incluem: palato ogival (n=4) e escoliose (n=8) (BOHLEGA *et al.*, 2003; TAJSHARGHI *et al.*, 2007).

A dosagem dos níveis de creatina fosfoquinase (CPK) foram feitas em 40 pacientes. Destes, 11 casos mostraram níveis normais com valores de até 188 U/L (SAHGAL; SAHGAL, 1977; MASUZUGAWA, *et al.*, 1997; PEGORARO *et al.*, 2007; BANFÁI, *et al.*, 2017); 12 casos mostraram um aumento sérico entre 1 e 2 vezes o limite da normalidade com valores de até 529 U/L; 5 casos mostraram um aumento sérico entre 3 e 4 vezes o limite da normalidade com valores de até 812 U/L; 4 casos mostraram um aumento sérico entre 5 e 6 vezes o limite da normalidade com valores de até 1000 U/L; (TAJSHARGHI *et al.*, 2003; ONENGUT, *et al.*, 2004; RAFAY; HALLIDAY; BRIL, 2005; LAING *et al.*, 2005; SHINGDE, *et al.*, 2006; TAJSHARGHI *et al.*, 2007; KINPHUTH *et al.*, 2010; STALPERS, *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2018); Um caso apresentou dosagem elevada de 18 vezes o limite da normalidade (3000 U/L). Além disso, 4 publicações mencionaram dosagem elevada, e 3 publicações mencionaram

dosagem ligeiramente elevada, porém, sem detalhar o nível sérico específico (SAHGAL; SAHGAL, 1977; BAROHN; BRUMBACK; MENDELL, 1994; MASUZUGAWA, *et al.*, 1997).

A eletromiografia de agulha mostrou padrão miopático em 11 casos (SAHGAL; SAHGAL, 1977; BAROHN; BRUMBACK; MENDELL, 1994; BOHLEGA *et al.*, 2003; MASUZUGAWA, *et al.*, 1997; TAJSHARGHI *et al.*, 2003; ONENGUT, *et al.*, 2004; TAJSHARGHI *et al.*, 2007; KINPHUTH *et al.*, 2010; STALPERS, *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2018); Apenas 3 casos mostraram que o exame estava normal (SAHGAL; SAHGAL, 1977; MASUZUGAWA, *et al.*, 1997; STALPERS, *et al.*, 2011). Os estudos de condução nervosa foram normais em 5 pacientes investigados (SAHGAL; SAHGAL, 1977; BAROHN; BRUMBACK; MENDELL, 1994; MASUZUGAWA, *et al.*, 1997; LAING *et al.*, 2005).

A avaliação cardíaca apresentou dados heterogêneos. No estudo de Bohlega *et al.* (2003) 3 pacientes apresentaram os exames de ecocardiograma transtorácico (ETT) normais. O estudo de Tajsharghi *et al.* (2003) relatou dois pacientes em que exames de eletrocardiograma (ECG) e ETT não apresentaram evidências de cardiomiopatia, embora um dos pacientes apresentava átrio esquerdo ligeiramente aumentado e fibrilação atrial. O estudo de Onengut *et al.* (2004) apresentou um caso em que a avaliação cardíaca estava normal, e um segundo caso em que o ETT mostrou disfunção sistólica global com fração de ejeção de 30% e hipocinesia ventricular esquerda. Laing *et al.* (2005), relatou dois pacientes sendo que, um deles, apresentou a avaliação cardíaca normal, exceto, por uma leve hipertrofia do septo observada no ETT. O segundo paciente apresentou ECG e Holter de 24 horas com bloqueio de ramo esquerdo e o ETT revelou discreta cardiomegalia. O estudo de Tajsharghi *et al.* (2007) revelou anormalidades cardíacas em uma família, em que 3 irmãos desenvolveram fraqueza muscular respiratória e cardiomiopatia hipertrófica. O ECG mostrou bloqueio de ramo direito, desvio do eixo à direita e taquicardia sinusal e o ETT revelou cardiomiopatia hipertrófica não obstrutiva com pressão ventricular direita elevada e padrão ventricular direito e esquerdo restritivo em um dos pacientes. A investigação cardíaca nos outros dois irmãos revelou cardiomiopatia hipertrófica biventricular, além disso, um deles foi diagnosticado com insuficiência cardíaca. O estudo de Pegoraro *et al.* (2007) mostrou bloqueio

completo do ramo esquerdo no ECG de um dos pacientes. Uro-coste *et al.* (2009) relatou o caso de uma paciente de 52 anos diagnosticada com cardiomiopatia hipertrófica com leve diminuição da função sistólica ventricular esquerda (FEVE 52%). O eletrocardiograma mostrou hipertrofia ventricular esquerda com um índice de Sokolow-Lyon de 38 mm. A filha desta paciente também apresentou anormalidades cardíacas: dilatação do ventrículo esquerdo, fração de ejeção de 30% e miocárdio severamente espessado em duas camadas, numerosas trabeculações proeminentes e recessos intertrabeculares profundos. Kinphuth *et al.* (2010) não identificou anormalidades cardíacas. Stalpers *et al.* (2011) relatou um paciente em que o ECG não apresentou alterações, e ETT demonstrou contratilidade discretamente reduzida do ventrículo esquerdo. Por fim, Mamelona *et al.* (2019) também relata o envolvimento cardíaco com bradicardia de 58 bpm (batimentos por minuto) em um paciente.

Os estudos de função respiratória foram heterogêneos. O estudo de Shingde *et al.* (2006) relatou fraqueza muscular respiratória em um dos pacientes, sendo que o teste de função respiratória apresentou pressão inspiratória máxima (113% do previsto) e pressão expiratória máxima reduzida (58% do previsto). Pegoraro *et al.* (2007) realizou o teste de espirometria e tanto a capacidade vital forçada (CVF) quanto o volume expiratório forçado (VEF) foram normais. Kinphuth *et al.* (2010) relatou que as investigações pulmonares não mostraram alterações, e, não especificou os métodos de investigação. Stalpers *et al.* (2011) relatou que os testes de função respiratória mostraram CVF e VEF de 70% e 82% dos valores normais. Mamelona *et al.* (2019) realizou o teste de espirometria e identificou função pulmonar muito fraca com CVF de 27% e VEF de 29% dos valores normais.

Poucos estudos realizaram o exame de imagem por ressonância magnética de músculo. No estudo de Li *et al.* (2018), o exame de ressonância magnética dos músculos da coxa mostrou alteração gordurosa nos músculos bíceps femoral, adutor longo e magno, sartório, semimembranoso e semitendíneo. O músculo grácil apresentou alterações discretas, e, em contrapartida, os músculos vasto intermediário, vasto lateral e medial foram poupados. Os músculos da perna que foram predominantemente afetados incluíram os músculos gastrocnêmio medial, fibular e tibial anterior. O estudo de Kinphuth *et al.* (2010) relatou atrofia gordurosa

do músculo gastrocnêmio como principal achado. Ademais, todos os pacientes investigados no estudo de Pegoraro *et al.* (2007) revelaram anormalidades no exame de imagem muscular por ressonância magnética. O padrão de acometimento envolveu os membros inferiores: bíceps femoral, semimembranoso e preservação do semitendíneo, gastrocnêmio, tibial anterior, alterações pequenas no quadríceps e iliopsoas. Nos membros superiores o deltóide foi o músculo mais acometido.

Os pacientes com miopatia de armazenamento de miosina exibem heterogeneidade nos aspectos genéticos. Análises genotípicas identificaram oito mutações que causam essa miopatia conforme dito anteriormente: R1845W, H1901L, L1793P, E1883K, L1779P, X1936W, K1784del e R1820W (VISWANATHAN, *et al.*, 2017). Quanto aos padrões de herança existem formas autossômicas dominantes R1845W, H1901L, L1793P, L1779P, X1936W e K1784del (TAJSHARGHI *et al.*, 2003; BOHLEGA *et al.*, 2003; MASUZUGAWA, *et al.*, 1997; SHINGDE, *et al.*, 2006), como também formas autossômicas recessivas (TAJSHARGHI *et al.*, 2007; YUCEYAR, *et al.*, 2015).

O gene *MYH7*, localizado está no braço longo do cromossomo 14, na região 1, banda 1, sub-banda 2 (14q11.2), composto por 40 éxons, fornece as informações necessárias para codificar uma proteína chamada cadeia pesada beta (β)-miosina. Essa proteína constitui os filamentos grossos do sarcômero e é encontrada no músculo cardíaco e nas fibras musculares esqueléticas do tipo 1 (TAJSHARGHI, *et al.*, 2003).

A miosina muscular tipo II é uma proteína hexamérica composta por 2 subunidades de cadeia pesada ou cauda, enroladas em forma de hélice, sendo separadas em meromiosina leve e pesada, e 4 cadeias leves de miosina. A região da cabeça da miosina realiza a função de interagir com a actina e promover o movimento muscular, assim como proporcionar forma na arquitetura das células. A região da cauda ou subunidade da cadeia pesada beta (β)-miosina, realiza a interação com outras proteínas, incluindo a interação com a cauda de outras proteínas miosinas do tipo II, assim, essa proteína gera a força necessária para a contração muscular (TAJSHARGHI, 2008).

Mutações no gene *MYH7* estão relacionadas também a outros fenótipos: miopatia distal de Laing (OMIM 160500), forma miopática da síndrome escápulo-peroneal (OMIM 181430) cardiomiopatia hipertrófica 1 (OMIM 192600); cardiomiopatia dilatada 1S (OMIM 613426) e não-compactação ventricular 5 (OMIM 613426). As doenças relacionadas ao gene *MYH7* vêm crescendo significativamente como um importante grupo, no qual, as características clínicas, histopatológicas e moleculares são variáveis. É importante destacar que éxons codificadores das regiões mais proximais da proteína são a causa da cardiomiopatia hipertrófica, em contrapartida, os éxons codificadores das porções distais (cauda) têm sido associadas a várias miopatias esqueléticas que podem acometer ou não a função cardíaca, incluindo a miopatia distal de Laing e miopatia de armazenamento de miosina (VISWANATHAN, *et al.*, 2017).

Os dados clínico-laboratoriais mais importantes de 19 casos descritos em literatura em que foi identificada a mutação (p.Arg1845Trp) no gene *MYH7* estão resumidos na TABELA 1.

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS CASOS DE MIOPATIA DE ARMAZENAMENTO DE MIOSINA COM MUTAÇÃO HETEROZIGÓTICA NO GENE MYH7 (p.Arg1845Trp)

Referência	Caso	GN	ID	Início dos sintomas	Sintomas iniciais	Curso da doença	Clínica	CPK	ENMG	TOTAL
Tajsharghi <i>et al.</i> ,2003	1*	M	71	Infância	Distúrbio de marcha	Lento e progressivo	FCE, EA, HP, Fraqueza proximal (+++), distal (++)	331 U/L (normal <210)	Padrão miopático	1
	2*	F	40	Adulto	Dificuldade elevar os braços	Lento e progressivo	EA, fraqueza flexores do pescoço e quadril	NR	NR	2
	3	F	33	Infância	Quedas frequentes	Lento e progressivo	ACE, FCE, EA, HP	722 U/L (normal <210)	Padrão miopático	3
Laing <i>et al.</i> ,2005	1	M	21	Infância	Dismorfismo da face e tronco	AI	PO, CF, EA, HP	618 U/L (normal <170)	Normal	4
	2	F	57	Infância	Dificuldade em exercícios	Lento e progressivo	EA, LO, fraqueza proximal e marcha anserina	284 U/L (normal <170)	Padrão miopático	5
Shingde <i>et al.</i> ,2006	1#	M	49	Infância	Dificuldade para correr rápido	Lento e progressivo	ACE, EA, fadiga, mialgia nas panturrilhas	940 U/L (normal <175)	Padrão miopático	6
	2#	M	46	Infância	Se identificou como "não atlético"	Lento e progressivo	EA, fraqueza proximal MMSS e MMII	1139 U/L (normal <175)	NR	7

LEGENDAS: * pacientes da mesma família-pai e filha; # pacientes da mesma família-irmãos; GN: Gênero; M: masculino; F: feminino; ID: idade; MMSS: membros superiores; MMII: membros inferiores; (+++) grave; (++) moderada; CPK: creatina fosfoquinase; U/L: unidades por litro; ENMG: eletroneuromiografia; AI: ausência de informação; NR: não realizado; FCE: fraqueza da cintura escapular; EA: escápula alada; HP: hipertrofia de panturrilhas; PO: palato ogival; CF: cifose; LO: hiperlordose; ACE: atrofia da cintura escapular; PC: pé caído; MA: marcha anserina.
 FONTE: O autor (2023).

TABELA 1A - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS CASOS DE MIOPATIA DE ARMAZENAMENTO DE MIOSINA COM MUTAÇÃO HETEROZIGÓTICA NO GENE MYH7 (p.Arg1845Trp)

Referência	Caso	GN	ID	Início dos sintomas	Sintomas iniciais	Curso da doença	Clínica	CPK	ENMG	TOTAL
	1*	F	35	Infância	Fraqueza nos MMSS	Lento e progressivo	EA, MA, PC, HP, fraqueza MMSS	1000 U/L (normal <190)	NR	8
	2*	M	66	Adulto	Dificuldade para subir degraus	Estável até 33 anos	HP, PC, fraqueza proximal MMSS e MMII	205 U/L (normal <190)	NR	9
	3*	F	72	Adulto	Hipotrofia distal	Estável até 68 anos	EA, pé cavo, incapacidade assobiar	266 U/L (normal <190)	NR	10
	4*	F	70	Adulto	Assintomática	Estável até 58 anos	EA, pé cavo	140 U/L (normal <190)	NR	11
	5*	M	63	Adulto	Hipertrofia de panturrilhas	Estável até 40 anos	EA, pé cavo, HP	812 U/L (normal <190)	NR	12
Pegoraro <i>et al.</i> , 2007	6*	F	51	Adulto	Hipotrofia distal	Estável até 49 anos	Mialgia, pé cavo	450 U/L (normal <190)	NR	13
	7*	F	12	Infância	Fraqueza	Lento e progressivo	EA, pé cavo	70 U/L (normal <190)	NR	14
	8*	F	42	Adulto	Assintomática	Lento e progressivo	EA, pé cavo, mialgia de esforço	270 U/L (normal <190)	NR	15
	9*	F	38	Infância	Hipertrofia de panturrilhas	Lento e progressivo	EA, pé cavo, HP	292 U/L (normal <190)	NR	16
	10*	F	39	Assintomática	Hipertrofia de panturrilhas	AI	EA, pé cavo, câimbras, HP	365 U/L (normal <190)	NR	17
	11*	F	67	Adulto	Assintomática	Estável até 57 anos	Incapacidade de assobiar	130 U/L (normal <190)	NR	18

LEGENDAS: GN: Gênero. ID: Idade; * pacientes da mesma família; M: masculino; F: feminino; MMSS: membros superiores; MMII: membros inferiores; CPK: creatina fosfoquinase; U/L: unidades por litro; ENMG: eletro-neuromiografia; AI: ausência de informação; NR: não realizado; FCE: fraqueza da cintura escapular; EA: escápula alada; HP: hipertrofia de panturrilhas; PO: palato ogival; CF: cifose; LO: hiperlordose; PC: pé caldo; MA: marcha anserina. FONTE: O autor (2023).

TABELA 1B - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS CASOS DE MIOPATIA DE ARMAZENAMENTO DE MIOSINA COM MUTAÇÃO HETEROZIGÓTICA NO GENE MYH7 (p.Arg1845Trp)

Referência	Caso	GN	ID	Início dos sintomas	Sintomas iniciais	Curso da doença	Clínica	CPK	ENMG	TOTAL
Kiphuth <i>et al.</i> , 2010	1	M	34	Adulto	Redução geral de força muscular	Estável até 34 anos	FCE, EA	911 U/L (normal <170).	Padrão miopático	19
Li <i>et al.</i> , 2018	1	M	46	Adulto	Fraqueza nos MMII	Lento e progressivo	Palato arqueado, marcha anserina, HP.	529 U/L	Padrão miopático	20

LEGENDAS: GN: Gênero. ID: Idade; M: masculino; MMII: membros inferiores; CPK: creatina fosfoquinase; U/L: unidades por litro; ENMG: eletroneuromiografia; FCE: fraqueza da cintura escapular; EA: escápula alada; HP: hipertrofia de panturrilhas.
 FONTE: O autor (2023).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste estudo é conhecer as características clínicas, morfológicas, e moleculares em pacientes diagnosticados com miopatia de armazenamento de miosina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever os dados clínicos dos afetados;
- Caracterizar os aspectos morfológicos da biópsia muscular;
- Identificar a mutação genética e o padrão de herança nos envolvidos.

4 JUSTIFICATIVA

A miopatia de armazenamento de miosina é uma doença rara e os estudos na literatura são escassos. Entretanto, com os avanços na área genética, várias mutações foram associadas a essa doença, conforme revisão da literatura descrita anteriormente. Tal fato demonstra a variabilidade genética e proporciona uma compreensão melhor e mais abrangente da doença, possibilitando diferenciar as suas formas clínicas e orientar de forma precoce os pacientes e os seus familiares. O diagnóstico molecular é de suma importância, assim como os achados clínicos e histopatológicos, para a obtenção de uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos, oferecendo aos pacientes um conhecimento mais amplo, direcionamento de estratégias terapêuticas e monitoramento apropriado.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR) conforme parecer de número 4.520.927, e registrado sob o CAAE 41039020.0.0000.0096. Após explicação detalhada, os participantes da pesquisa assinaram de forma voluntária o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

5.2 DELINEAMENTO DA PESQUISA

Estudo descritivo de amostra por conveniência não probabilística.

5.3 LOCAL DO ESTUDO E PERÍODO

O estudo clínico, eletroneuromiografia, espirometria, imagem por ressonância magnética e estudo anatomopatológico foi conduzido nas dependências do Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR). O exame laboratorial e os exames de avaliação cardiológicas foram realizados em serviço externo. O estudo genético foi realizado pelo laboratório de biologia molecular Unigenne e Centro de Estudos do Genoma Humano -Universidade de São Paulo. Todos no período entre 2020 e 2022.

5.4 CASUÍSTICA

Não houve delimitação da população a ser estudada. A intenção foi englobar a maior quantidade possível de pacientes desta família que consentiram voluntariamente em participar da pesquisa.

5.4.1 Critérios de inclusão

Foram incluídas as biópsias musculares já existentes no banco de dados do Serviço de Doenças Neuromusculares do Complexo Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR), em que o registro anatomopatológico apresentava estruturas de corpos hialinos no período entre 2001 e 2021.

5.4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos todos os pacientes que não apresentaram o consentimento em participar do estudo genético.

5.5 PACIENTES

Inicialmente foram selecionados 2 pacientes através do laudo de biópsia muscular com diagnóstico de miopatia de armazenamento de miosina disponível no banco de dados do Serviço de Doenças Neuromusculares do Complexo Hospital de

Clínicas, Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR). Posteriormente foram incluídos 5 pacientes da mesma família com a apresentação clínica compatível com a doença, totalizando 7 pacientes. Os mesmos foram convocados para atendimento no seu respectivo centro de origem. O comparecimento foi de livre e espontânea vontade ao local designado, orientados sobre o atendimento voltado para pesquisa, sendo que, o não comparecimento, de forma alguma influenciaria no manejo clínico já pré-estabelecido. Todos os pacientes assinaram o TCLE. Após a assinatura do termo todos os pacientes foram submetidos à avaliação clínica, 6 pacientes realizaram a dosagem de CPK, 3 pacientes realizaram o exame de eletroneuromiografia, 6 pacientes realizaram exames de ecocardiograma transtorácico, eletrocardiograma e espirometria, um paciente realizou o exame de imagem por ressonância magnética e 7 pacientes foram submetidos a coleta de sangue periférico para estudo genético.

5.5.1 Estudo clínico

A avaliação clínica de todos os pacientes foi realizado a partir de um protocolo de atendimento e coleta de dados conforme (APÊNDICE 1). Este protocolo inclui os dados demográficos, curso clínico, histórico familiar e exame físico geral. No exame neurológico foram avaliadas a força muscular selecionados pela escala modificada de *Medical Research Council* (MRC) (MENDELL; FLORENCE, 1990) (APÊNDICE 2). Nesta avaliação foram fotografados os achados físicos relevantes após a assinatura do TCLE para foto e vídeo (ANEXO I).

5.5.2 Exame Laboratorial

A dosagem sérica da CPK foi realizada em laboratório externo pelo método de Cinética Enzimática (Teste UV). O nível de CPK foi considerado normal quando o resultado variou entre 39,0 a 308,0 U/L para homens e entre 26,0 a 192,0 U/L para mulheres (MORANDI, *et al.*, 2006).

5.5.3 Eletroneuromiografia

O exame de eletroneuromiografia foi realizado conforme as técnicas da rotina estabelecidas no Serviço de Eletroneuromiografia do Complexo Hospital de

Clínicas/UFPR, segundo as descrições de literatura (DUMITRU, *et al.*, 2002; WERNECK; LIMA, 1988).

5.5.4 Eletrocardiograma e Ecocardiograma Transtorácico

Os exames de eletrocardiograma (ECG) foram realizados com o aparelho Page Writer TC10 (Philips). Os exames de ecocardiograma transtorácico (ETT) foram realizados com o aparelho Vivid IQ (GE Healthcare). Todos os ECGs e ETTs foram executados pelo mesmo profissional. Parâmetros de rotina foram avaliados em ambos os exames e, adicionalmente, foi avaliado o *strain* longitudinal global do ventrículo esquerdo por meio da técnica de *speckle tracking* bidimensional. As medidas ecocardiográficas foram realizadas seguindo as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia e da Associação Europeia de Imagem Cardiovascular (LANG, *et al.*, 2015).

5.5.5 Espirometria

Para a avaliação pulmonar foi utilizado o espirômetro da marca Micromedical modelo microplus. Foi realizada a mensuração da capacidade vital forçada (CVF). O cálculo do previsto e do limite inferior (LI) para cada paciente foi realizado conforme os valores de referência para a população brasileira, conforme idade, sexo e estatura (PEREIRA; SATO; RODRIGUES, 2007). Para a avaliação da gravidade do distúrbio restritivo foram considerados os valores de porcentagem do previsto da CVF: leve 60%-LI (limite inferior), moderado 51-59%, e grave $\leq 50\%$ (PEREIRA, 2002). Todos os testes foram executados pelo mesmo profissional.

5.5.6 Estudo por imagem com ressonância magnética

O estudo por imagens das estruturas musculares foi feito com ressonância magnética do corpo inteiro. O protocolo padrão para avaliação do sistema músculo esquelético inclui sequências FSE, ponderadas em T1 e T2, e sequências com supressão de gordura do tipo STIR ou T2 FSE (HARTMANN; RODRIGUES, 2014). O Setor de Ressonância Magnética do serviço de Radiologia do Complexo Hospital de Clínicas aplica um protocolo com as ponderações tradicionais: T1 e STIR (*short time inversion recovery*) nos planos axial e coronal, utilizando o aparelho SIGNA™ Explorer 1.5 Tesla da GE HealthCare.

5.5.7 Biópsia Muscular

Foram revisados os laudos anatomopatológicos dos pacientes atendidos no Serviço de Doenças Neuromusculares, utilizando o Banco de Dados de Biópsias Musculares do Serviço de Doenças Neuromusculares do Complexo Hospital de Clínicas – UFPR. O total de biópsias do banco de dados é de 5760, e destes, foram avaliados retrospectivamente os laudos de 2480 biópsias do período de 2001 a 2021, e, dentre eles, foram identificados dois pacientes que apresentaram na conclusão do laudo a presença de corpos hialinos nas fibras musculares de tipo 1, sugestivos de acúmulo de miosina.

Na rotina laboratorial, os fragmentos musculares provenientes de biópsia do músculo bíceps braquial, foram montados em suporte especial com adraganth 7%, recoberta com talco em pó, congelada em nitrogênio líquido a -170°C , cortado em criostato com 8 a 12 micra de espessura. Estes fragmentos foram submetidos às técnicas de coloração e histoquímica conforme descritas em literatura (DUBOWITZ, 1985).

Os procedimentos foram realizados no laboratório de Histoquímica do Serviço de Doenças Neuromusculares do Complexo Hospital de Clínicas – UFPR. As colorações de rotina incluem: HE, TG, Oil Red O, ácido periódico de Schiff (PAS), cresil violeta e sirius red; e, as reações histoquímicas incluem: ATPase pré-incubada em diferentes pHs (9,4; 4,6 e 4,3), NADH-TR, esterase inespecífica, miofosforilase, fosfatase ácida (FA) fosfatase alcalina (FAL), succinato desidrogenase (SDH), citocromo C oxidase (COX), e adenilato ademinase.

A análise morfológica e histoquímica da amostra foi realizada em microscópio óptico marca Nikon Eclipse 80i, nas objetivas de aumento (100X, 200X, 400X). Foram avaliadas aproximadamente 200 fibras musculares. Os seguintes parâmetros foram analisados: alterações histológicas específicas nas fibras musculares e nas reações oxidativas, avaliou-se a reatividade dos corpos hialinos (WERNECK, 1981).

5.5.8 Estudo genético

Amostras de sangue periférico foram coletados à vácuo em tubos revestidos com ácido etilenodiamino tetracético (EDTA). O DNA linfocitário foi extraído usando

kit comercial a partir do método de coluna com membrana de sílica conforme as recomendações do fabricante. Os materiais genéticos foram quantificados por espectrofotometria no laboratório de biologia molecular Unigenne. Uma alíquota do DNA extraído da paciente índice foi enviada ao Centro de Estudos do Genoma Humano para a realização do sequenciamento completo do exoma.

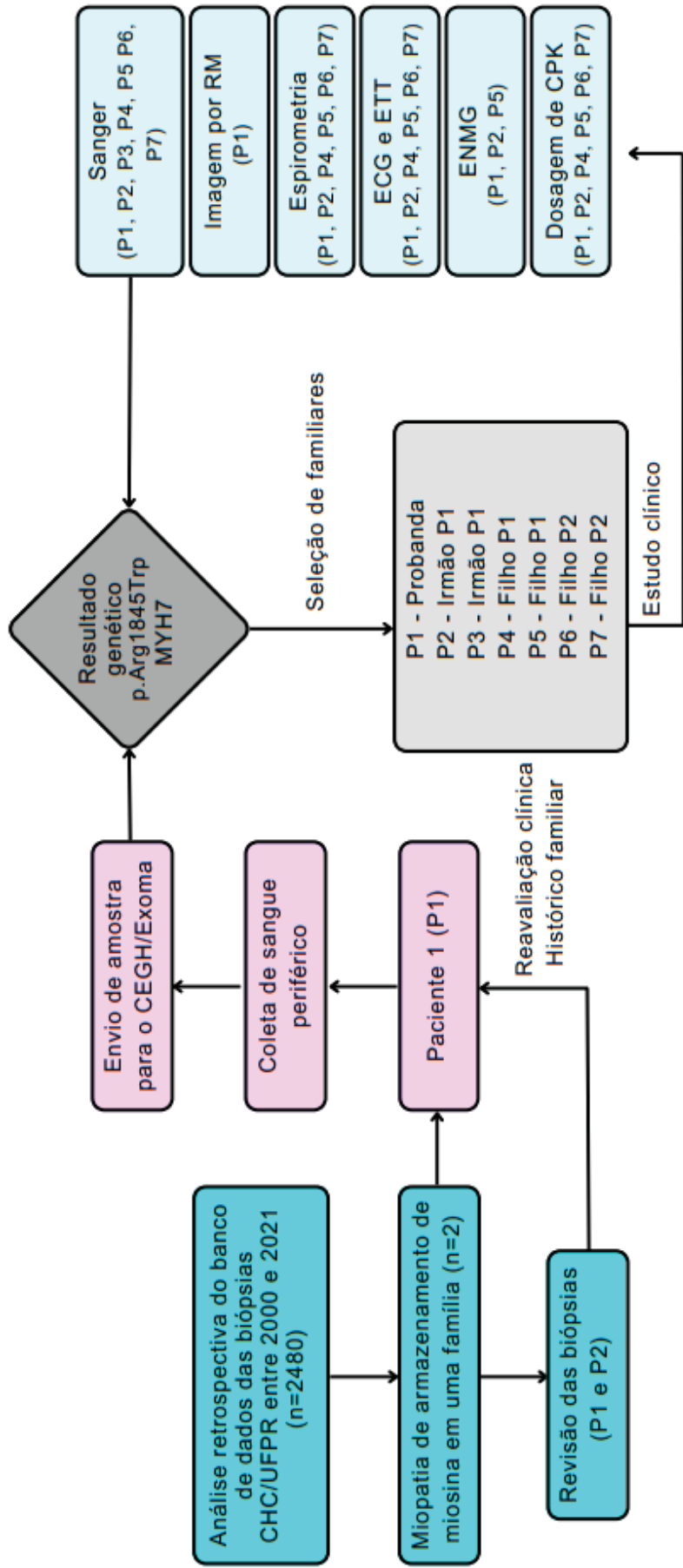
A partir do resultado encontrado no exoma foi realizado o sequenciamento de Sanger para a mesma mutação no laboratório de genética Unigenne, incluindo a paciente índice. Para a amplificação do éxon 37 foram utilizados os seguintes primers: *forward* 5'GATGTAAGTCCCCCACTCCAC^{3'} e *reverse* 3'CCTGGAAGAGGCTAAGAGCAA^{5'}. A região de interesse amplificada foi submetida a identificação de bandas específicas por eletroforese em gel de agarose corado com Gel *Green*.

O sequenciamento foi realizado utilizando o kit *Big Dye Terminator* (Applied Biosystems) e um analisador genético automático modelo ABI 3500 *Genetic Analyzer*. A análise da sequência foi realizada utilizando protocolos de bioinformática, tendo como referência a versão GRCh37 do genoma humano. Segue abaixo nos próximos tópicos a descrição detalhada de cada técnica utilizada. O fluxograma dos métodos de estudo estão representados na FIGURA 3.

5.5.8.1 Extração de DNA

O método utilizado consiste no isolamento do material genético (DNA) pelo processo de purificação com kit comercial em coluna de sílica em sangue total. O DNA é separado dos outros constituintes celulares através de quatro etapas: lise, ligação, lavagem e eluição. As amostras de sangue coletadas em EDTA foram colocadas em bancada, na posição vertical a fim de separar os constituintes celulares de forma natural. O DNA é extraído dos leucócitos mesmo com a presença das hemácias em solução, o protocolo utilizado possui um rendimento adequado não sendo necessário a extração do botão leucocitário.

FIGURA 3 - FLUXOGRAMA DOS MÉTODOS DE ESTUDO



LEGENDAS: n: número de indivíduos; P: paciente; CEGH: Centro de Estudos Genoma Humano; CPK: creatina quinase; ENMG: eletro-neuromiografia; ECG: eletrocardiograma; ETT: ecocardiograma transtorácico; RM: ressonância magnética.
 FONTE: O autor (2023)

Na sequência o termobloco foi regulado para a temperatura de 56°C e os tampões foram preparados conforme as instruções do fabricante. Os microtubos de 1,5 ml foram identificados na tampa com um número de identificação específico para cada amostra. Pipetamos 20 µl de proteinase K em um tubo de microcentrifuga. Os ácidos nucleicos são ligados a proteínas, sendo necessário uma etapa de lise eficiente para a ligação seletiva deste material genético à coluna de sílica. Posteriormente adicionamos 200 µl de amostra. Em seguida adicionamos 200 µl de solução de lise. Misturamos no vórtex por 15 segundos. Para garantir uma lise eficiente, é essencial que a amostra e os componentes sejam misturados completamente para produzir uma solução homogênea.

Em seguida as amostras foram incubadas no termobloco a 56°C por 10 minutos para iniciar a incubação da lise. O rendimento máximo de DNA é atingido após este período e temperatura. Desta forma, as amostras são lisadas em temperatura elevada na presença da proteinase K e solução de lavagem, garantindo a desativação das Dnases e RNases promovendo a liberação dos ácidos nucleicos de proteínas, lipídios e outros constituintes celulares. Removemos os microtubos do termobloco contendo as amostras e adicionamos 250 µl de solução de ligação e levamos brevemente ao vórtex. Centrifugamos brevemente o tubo de microcentrifuga de 1,5 ml para remover as gotas do interior da tampa.

Adicionamos 200 µl de etanol (96–100%) à amostra e misturamos novamente por vórtex de pulso por 15 segundos. O uso do etanol foi utilizado para a obter a precipitação, visto que, o etanol desidrata o DNA tornando o meio hidrofóbico. Assim, o DNA sobe a superfície pela diminuição da densidade em relação aos outros constituintes celulares. Aplicamos essa mistura na coluna de centrifugação. Fechamos a tampa e centrifugamos a 8000 rpm (rotação por minuto) por 1 minuto. Colocamos a coluna de centrifugação em um tubo de coleta limpo de 2 ml e descartamos o tubo que contém o filtrado.

Abrimos cuidadosamente a coluna de centrifugação e adicionamos 500 µl de solução de lavagem. Colocamos a coluna de centrifugação em um tubo de coleta limpo de 2 ml. Fechamos a tampa e centrifugamos a 8000 rpm por 1 minuto. Descartamos o tubo que contém o filtrado. Abrimos cuidadosamente a coluna de centrifugação e adicionamos 500 µl da solução de lavagem e centrifugamos em

velocidade máxima por 14.000 rpm por 3 minutos. Descartamos a solução que passou pela coluna e transferimos a coluna para um novo tubo coletor. Pipetamos 80 µl de solução de eluição e acrescentamos a coluna de sílica, incubamos a temperatura ambiente por 2 minutos e centrifugamos por 1 minuto a 8000 rpm. Na sequência descartamos a coluna de sílica e procedemos com o processo de quantificação.

5.5.8.2 Quantificação do DNA em espectrofotômetro

Para este estudo utilizou-se o espectrofotômetro *Nanodrop 2000*. A quantificação do DNA é um procedimento essencial para avaliar a adequação da amostra para os testes posteriores. Com o auxílio de uma pipeta calibrada, limpamos as superfícies superior e inferior do sistema de retenção pipetando 3 µl de água autoclavada.

Fechamos o braço da alavanca para que o suporte superior entre em contato com a água. Posteriormente levantamos a alavanca e com o auxílio de lenço de papel limpamos as superfícies. O software foi acionado, selecionando a aba de ácido nucleico. Aplicamos 2 µl de água reagente para uma medição em branco. E selecionamos a opção *blank* no sistema operacional.

Posteriormente a medição em branco, limpamos as superfícies com um lenço de papel e escolhemos a constante DNA-50 para o cálculo da concentração. Em seguida, aplicamos 2 µl da amostra de DNA extraído no suporte inferior e fechamos a alavanca e pressionamos a opção *measure*. O software realizou automaticamente o cálculo da concentração do ácido nucléico e as taxas de pureza dos materiais genéticos extraídos. Após a medição, observamos a imagem espectral para avaliarmos a qualidade da amostra.

5.5.8.3 Seleção dos primers

A partir do resultado prévio da probanda identificamos a sequência de referência, a qual foi encontrada no banco de dados genômicos *Clinvar NCBI*: NM_000257.4, no formato *FASTA* sendo 6027 pb, localizada no cromossomo 14 (14q11.2). Posteriormente, na sessão *Analyze this sequence* selecionamos a opção *pick primers* para o desenho de primers. Os primers referente ao éxon 37 foram

gerados pelo site *Primer Blast - Basic Local Alignment Search Too*. Adicionamos os parâmetros referentes às características dos primers (tamanho, concentração G/C%, temperatura de melting, formação de dímeros e hairpin) e neste mesmo software adicionamos os parâmetros de verificação de especificidade do par de primers, validando-os para uso *in vitro*.

Com as informações obtidas na plataforma, os primers *forward* e *reverse* foram desenhados de maneira a flanquear o éxon antes do início do mesmo, específicos para a região alvo conforme FIGURA 4.

FIGURA 4 - PRIMERS (EM AMARELO) DESENHADOS PARA O FRAGMENTO CORRESPONDENTE AO ÉXON 37 (REPRESENTADO EM VERMELHO) DO GENE *MYH7* PARA AMPLIFICAÇÃO POR MEIO DA PCR, GERANDO UM PRODUTO DE 486 PB

5'
GATGTAAGTCCCCCACTCCACCGACCCGATCCAGACCAGTGTCTCTCCGTGGGCTGGGCAGCAAGTG
 TGTGAGGACTTGACCAGACCATGTGCCACCTCTTCTCCTGCACACAG**GCCGCCATGATGGCAGAGGA**
GCTGAAGAAGGAGCAGGACACCAGCGCCACCTGGAGCGCATGAAGAAGAACATGGAACAGACCA
TTAAGGACCTGCAGCACCGGCTGGACGAAGCCGAGCAGATCGCCCTCAAGGGCGGCAAGAAGCAG
CTGCAGAAGCTGGAAGCGCGGGTGCGGGAGCTGGAGAATGAGCTGGAGGCCGAGCAGAAGCGCA
ACGCAGAGTCGGTGAAGGGCATGAGGAAGAGCGAGCGGCATCAAGGAGCTCACCTACCAGGTG
 CGACGGGCGTGACTCCAGGCAGAGCCCTGGCACCATAGCCACAGTGACAACCAGCTGAGGAGAATGA
 AGAG**TTTGCTCTTAGCCTCTCCAGG**
 3'

FONTE: O autor (2023)

Para a validação deste processo, acessamos a plataforma *BLAST* a fim de averiguar o anelamento destes primers em regiões de similaridade entre sequências biológicas, onde foi verificado o pareamento com a região de escolha.

5.5.8.4 Amplificação de DNA por PCR

A reação de PCR foi preparada para um volume total de 30 µl contendo: 1 µl de DNA genômico, 5 µl de buffer 10X, 0,5 µl dos primers F (*forward*) e R (*reverse*), 5 µl dNTPs (200 mM), 0,5 µl TAq polimerase a (5 U/µl), 1,5 µl cloreto de magnésio. O programa utilizado no termociclador utilizado foi de 94°C por 3 minutos para desnaturação e abertura da dupla fita de DNA inicial, seguidos por 30 ciclos, sendo 1 minuto a 94°C para desnaturação, 1 minuto à 60°C para o anelamento, e para a síntese da nova fita, a temperatura de 72°C. Na etapa final acrescentou-se um passo de 4 minutos a 72°C e um *hold* de 4°C para a conservação da amostra.

5.5.8.5 Quantificação do DNA em gel de agarose

Inicialmente separamos os materiais necessários para a preparação do gel de agarose contendo: 2 g de agarose, 100 ml de TBE 1X (Tris-Borato-EDTA), corante, proveta de 100 ml, balão volumétrico de 500 ml. Com o auxílio da proveta, adicionamos 100 ml de TBE 1X no balão volumétrico, acrescentamos 2 g de agarose e homogeneizamos até a solução apresentar-se sem grumos. A presença de grumos pode afetar a mobilidade das moléculas no gel. Essa solução foi aquecida em micro-ondas por 2 minutos. Posteriormente adicionamos 5 μ l de corante *Gel Green*. Separamos a cuba, encaixamos as borrachas de suporte, despejamos o gel delicadamente. Inserimos o suporte contendo os pentes para formar os poços no gel.

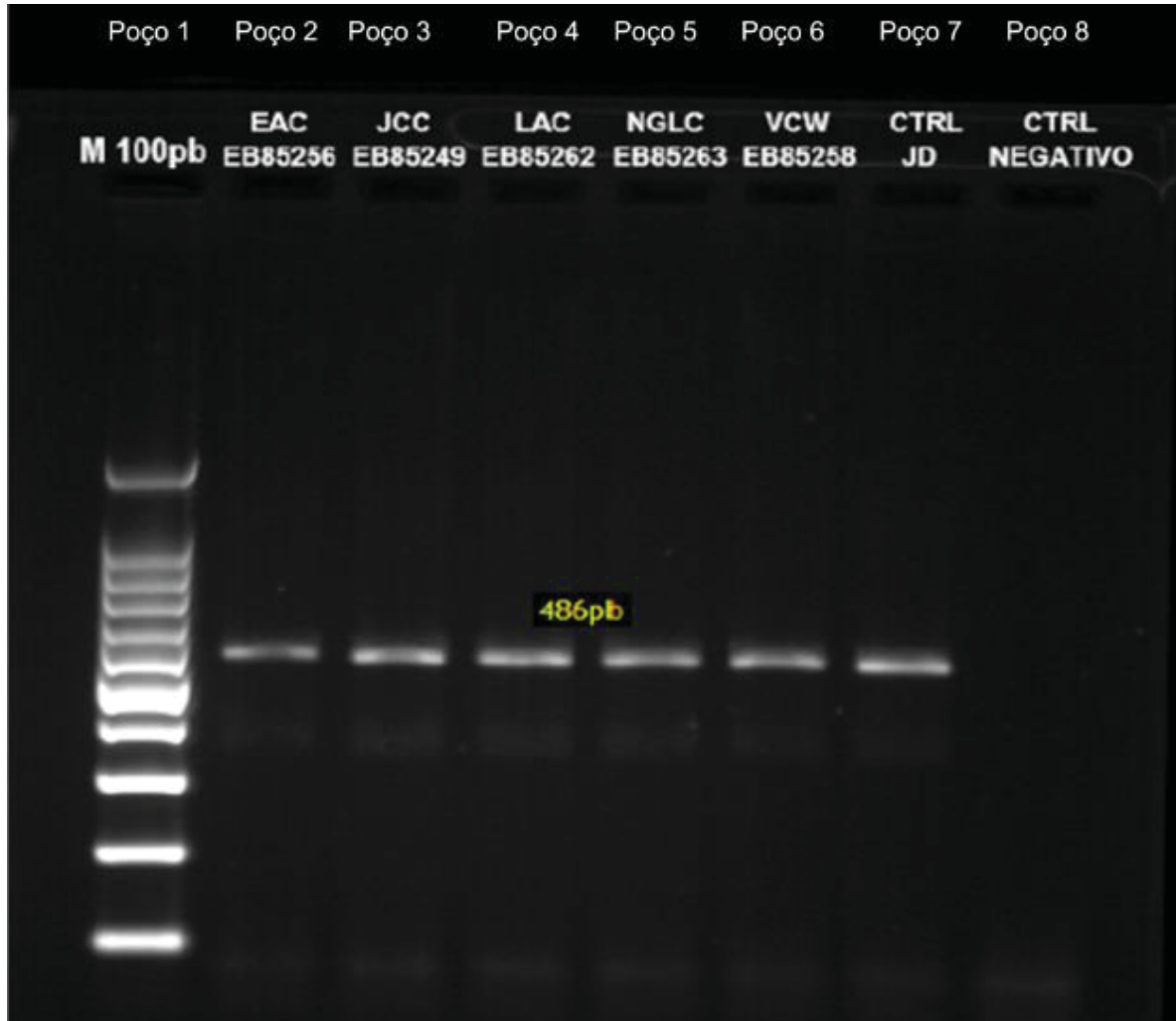
Aguardamos aproximadamente 10 minutos para a polimerização da matriz de agarose. Após verificada a resistência, o pente e as borrachas foram retiradas cuidadosamente para não danificar o gel. O gel preparado foi inserido na cuba de eletroforese imerso em tampão TBE 1X. A partir disso iniciou-se o processo de aplicação das amostras para a corrida eletroforética. Para esta etapa utilizamos o marcador de peso molecular 100 pb, agarose preparada, tampão de eletroforese TBE 1X, água reagente para o controle negativo, corante *Blue Juice*, cuba, fonte e transiluminador UV (radiação ultravioleta).

Homogeneizamos 2 μ l da amostra de peso molecular, 2 μ l de cada amostra em análise, e 2 μ l de controle negativo com 2 μ l de corante *Blue Juice* respectivamente em cada eppendorf. Aplicamos no gel o marcador de peso molecular, cada amostra e o controle negativo com uma micropipeta calibrada. Conectamos a cuba a uma fonte de alimentação de energia e programamos a voltagem, corrente e tempo de corrida.

Realizamos a revelação do gel. Ao final da corrida, desligamos a fonte principal e desconectamos os cabos de alimentação. Retiramos delicadamente o gel da cuba eletroforética e inserimos o mesmo no suporte do Transiluminador UV. Visualizamos a corrida eletroforética e documentamos as imagens obtidas a partir de um programa chamado *Gelcapture* conforme FIGURA 5. Para validação da corrida

foi observado o marcador molecular de 100 pb e a ausência de bandas no controle negativo. Estes fatores indicam a qualidade do gel preparado.

FIGURA 5 - PERFIL ELETROFORÉTICO DAS AMOSTRAS. BANDAS DE DNA EM AGAROSE.



LEGENDA: Poço 1: padrões de peso molecular de 100 pb. Poços 2 a 6: amostras dos casos 1,2,3,4 e 7; Poço 7: Controle positivo; Poço 8: Controle negativo.

FONTE: O autor (2023)

5.5.8.6 Sequenciamento de Sanger

O primeiro passo antes do sequenciamento propriamente dito, é a purificação dos produtos de PCR. Esta etapa tem por objetivo eliminar os primers não hibridizados, desoxinucleotídeos (dNTPs) que não foram utilizados na reação e resíduos de DNA de fita simples que possam ter sobrado ou se originado na reação de amplificação anterior, ressalta-se que a presença destes elementos residuais pode comprometer na análise sequencial. O procedimento foi realizado a partir de manual disponibilizado pelo fabricante. Em um microtubo de 0,2 ml

adicionamos 2,0 µl de enzima EXO/SAP previamente preparada para cada amostra a ser sequenciada. Adicionamos à enzima, 5 µl do produto de PCR, resultando em um volume final de 7 µl. Incubamos a solução em termociclador a 37°C por 30 minutos para degradar primers e nucleotídeos não utilizados na reação de PCR. Na sequência incubamos a solução a 80°C por 10 minutos para inativar a enzima. O produto de PCR purificado foi levado ao processo de sequenciamento.

Para o sequenciamento com kit *Big Dye Terminator*, foram utilizados os seguintes componentes: Kit *Big Dye Terminator* (1 µl), *BigDyeBuffer 5X* (1 µl), Primers (1 µl), água deionizada (10 µl), amostra (2 µl), totalizando um volume final de (15 µl). O mesmo mix foi utilizado para uma reação de amostra controle (1 µl) para validação da técnica. Na sequência distribuimos o mix da reação em placa de 96 poços e executamos os ciclos no termociclador conforme programa de sequenciamento. Para a precipitação e purificação da reação de sequenciamento por etanol, inicialmente removemos a placa do termociclador e centrifugamos brevemente. Adicionamos 2,5 µl de solução de 125 mM EDTA à reação de sequenciamento juntamente com 30 µl de etanol absoluto. Deixamos as amostras em repouso, protegido da luz em temperatura ambiente por 15 minutos. Na sequência centrifugamos a placa por 35 minutos a 3700 rpm. Removemos o sobrenadante invertendo a placa e incluindo um rápido spin (1 minuto 550 rpm) com aceleração e desaceleração mínimas.

Adicionamos 30 µl de etanol 70% em cada poço e centrifugamos por 20 minutos a 3700 rpm e novamente removemos o sobrenadante invertendo a placa (sobre papel absorvente) e incluindo um rápido spin (1 minuto a 550 rpm) com aceleração e desaceleração mínimas. Posteriormente deixamos a placa por 1 minuto no banho seco à 95°C para a evaporação completa do álcool. Em seguida, ressuspendemos as reações purificadas e secas em 10 µl de formamida Hi-Di e homogeneizamos no vórtex. As amostras foram levadas no banho seco por 5 minutos a 95°C para desnaturação e na sequência colocadas no gelo por 5 minutos. Para a leitura utilizamos o Sequenciador automático *ABI3500*. A placa foi configurada no software do sequenciador conforme as instruções do fabricante. A análise das sequências foi realizada utilizando protocolos de bioinformática

específicos, tendo como referência a versão GRCh37 do genoma humano. Os resultados foram coletados do sequenciador através de um *pen drive*, e os dados foram encaminhados ao software *SeqPilot* para montagem e análises das sequências.

6 RESULTADOS

6.1 CASO 1

6.1.1 Dados demográficos e achados clínicos

Paciente 1 é do sexo feminino e foi avaliada aos 55 anos. Filha de pais não consanguíneos e mãe com provável doença muscular. O curso da doença nesta paciente manifestou-se de forma lenta e progressiva. Apresentou fraqueza muscular desde a infância, por volta dos 12 anos, marcada principalmente pela presença de quedas frequentes, relata também, dificuldade para correr e subir escadas nesta fase. Os dados demográficos e achados iniciais estão dispostos na TABELA 5. Ao exame físico apresentou fraqueza muscular grave de predomínio proximal e axial com envolvimento proeminente dos músculos abdutores e adutores de ombros e quadril. Anormalidades osteoesqueléticas encontradas foram: face miopática, escápula alada, cifose, escoliose, pseudo-hipertrofia de panturrilhas, pés cavos conforme FIGURA 6 e retração do tendão de aquiles. As características clínicas mais importantes estão descritas nas TABELAS 6 e 7 . Além disso, apresentou marcha anserina, dificuldade em levantar-se da cadeira e elevar os braços acima dos ombros e relatou mialgia, fadiga e câimbras frequentes.

FIGURA 6—IMAGEM DA PACIENTE 1 E ACHADOS CLÍNICOS IMPORTANTES



Em A: Face miopática; B: Escápula alada; C: Fraqueza da cintura escapular, cifose, escoliose; D: Pé cavo; E: Pseudo-hipertrofia das panturrilhas.

FONTE: O autor (2023).

6.1.2 Exame laboratorial

A dosagem sérica de CPK estava dentro da referência de normalidade. O nível encontrado foi de 141,0 U/L, com valores de referência de 26,0 a 192,0 U/L para mulheres conforme descrito na TABELA 8.

6.1.3 Eletro-neuromiografia

O padrão da eletromiografia de agulha observado nesta paciente foi miopático. O estudo da velocidade de condução nervosa estava normal conforme TABELA 8.

6.1.4 Avaliação cardíaca

A avaliação cardíaca foi normal, tanto no eletrocardiograma como no ecocardiograma transtorácico conforme TABELA 8.

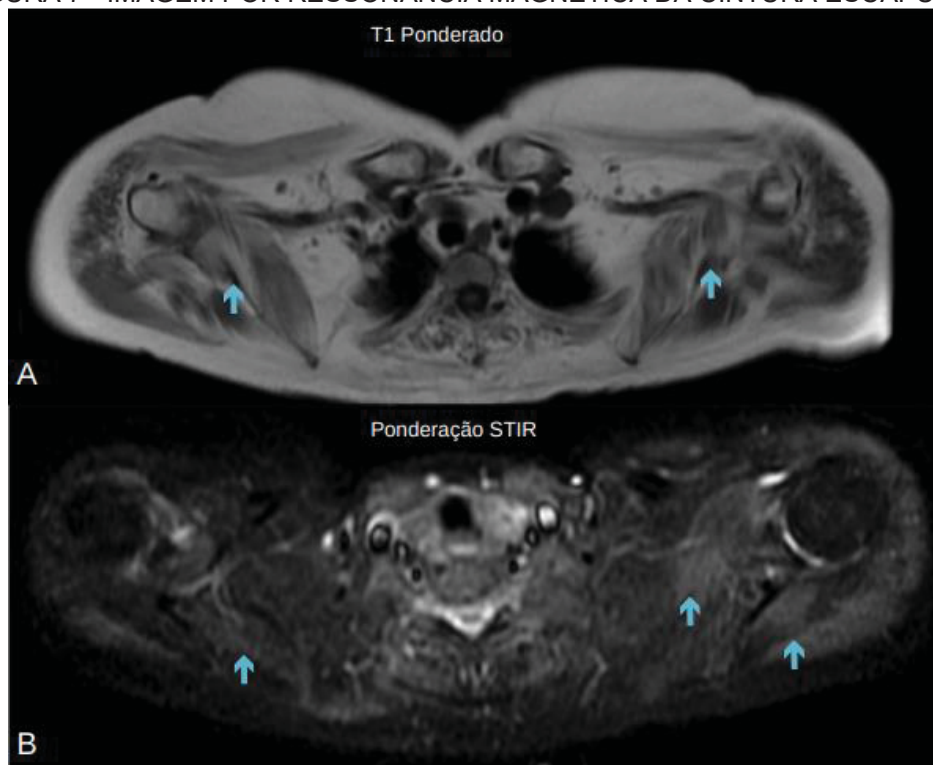
6.1.5 Espirometria

O teste de função respiratória apresentou distúrbio ventilatório restritivo grave, com capacidade vital forçada de 46% do previsto conforme TABELA 8.

6.1.6 Exame de imagem

A imagem por ressonância magnética mostrou discreta lipossustituição dos ventres musculares da cintura escapular, bilateralmente. Leve edema dos ventres musculares da cintura escapular, bilateralmente. Edema nos ventres musculares dos compartimentos anteriores das coxas. Discreta lipossustituição dos ventres musculares do compartimento anterior dos terços proximal e médio das coxas. Atrofia e acentuada lipossustituição dos ventres musculares do compartimento posterior por toda a extensão das coxas. Atrofia e acentuada lipossustituição dos glúteos, bilateralmente, mais evidente dos glúteos máximos. As imagens estão fotodocumentadas conforme FIGURAS 7, 8 e 9.

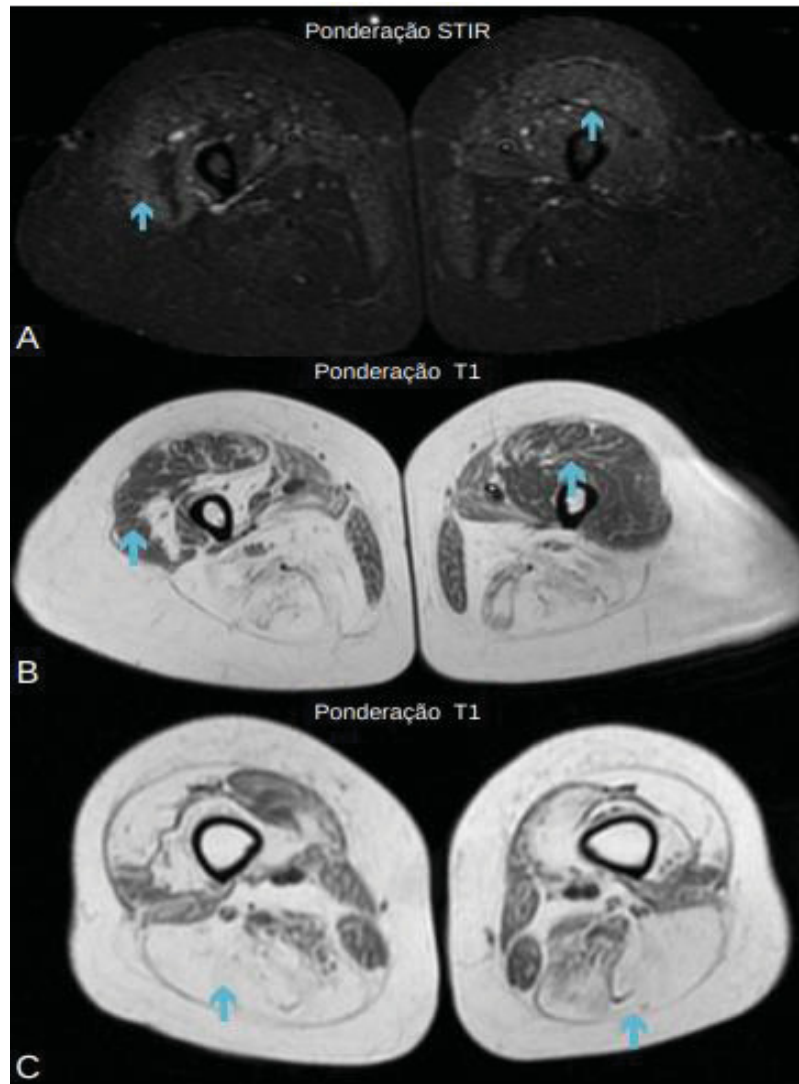
FIGURA 7 - IMAGEM POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DA CINTURA ESCAPULAR



Em A: Cintura escapular, plano axial, ponderação T1 mostrando discreta lipossustituição dos ventres musculares, bilateralmente (setas); B: Cintura escapular, plano axial, ponderação STIR: leve edema dos ventres musculares, bilateralmente (setas).

FONTE: O autor (2023)

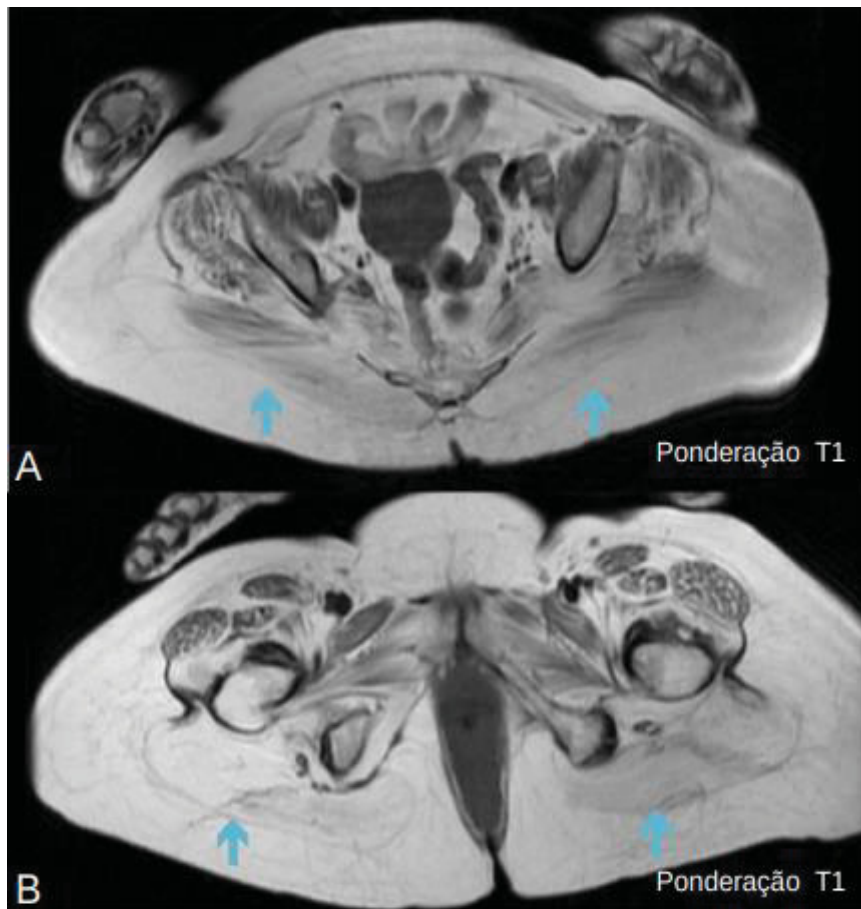
FIGURA 8 - IMAGEM POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DAS COXAS



A: Terço proximal das coxas, plano axial, ponderação STIR: edema nos ventres musculares dos compartimentos anteriores das coxas (primeira seta no vasto lateral oblíquo direito; segunda seta no reto femoral esquerdo); B: Terço médio das coxas, plano axial, ponderação T1: discreta lipossustituição dos ventres musculares do compartimento anterior caracterizada áreas de hipersinal em T1 de permeio as fibras musculares; C: Terço médio/distal das coxas, plano axial, ponderação T1: sinais de atrofia e acentuada lipossustituição dos ventres musculares do compartimento posterior, bilateralmente.

FONTE: O autor (2023)

FIGURA 9 - IMAGEM POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DA CINTURA PÉLVICA



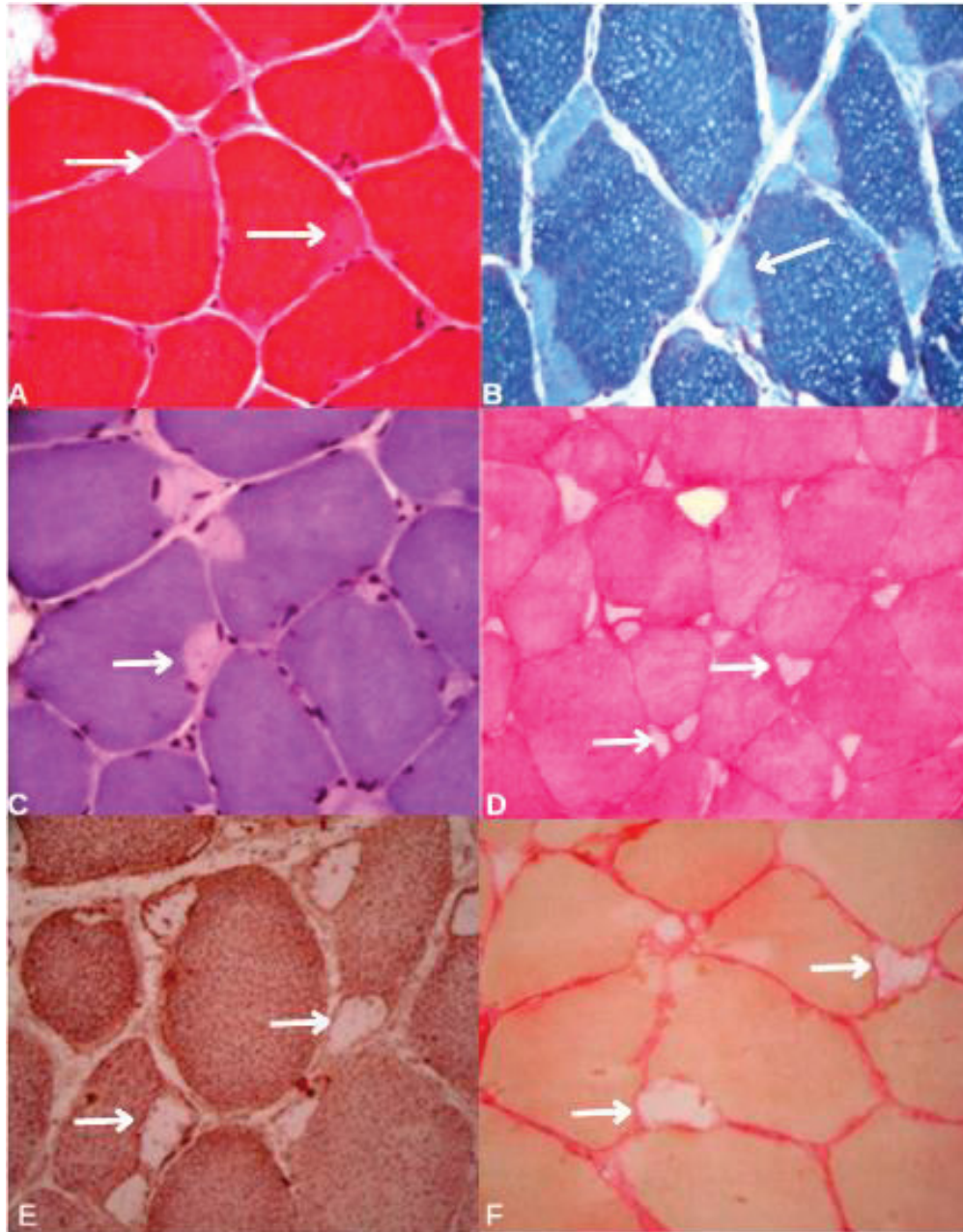
Em A e B: Cintura pélvica, plano axial, ponderação T1: Sinais de atrofia e lipossustituição dos adutores, glúteos mínimo, médio e sobretudo glúteo máximo (setas), bilateralmente.

FONTE: O autor (2023).

6.1.7 Biópsia Muscular

A presença de fibras musculares com corpos hialinos estavam presentes em 60% das fibras tipo 1. A TABELA 2 descreve os achados morfológicos dos corpos hialinos e as TABELAS 3 e 4 descrevem as alterações histológicas específicas. As imagens das biópsias estão fotodocumentadas nas FIGURAS 10 e 11.

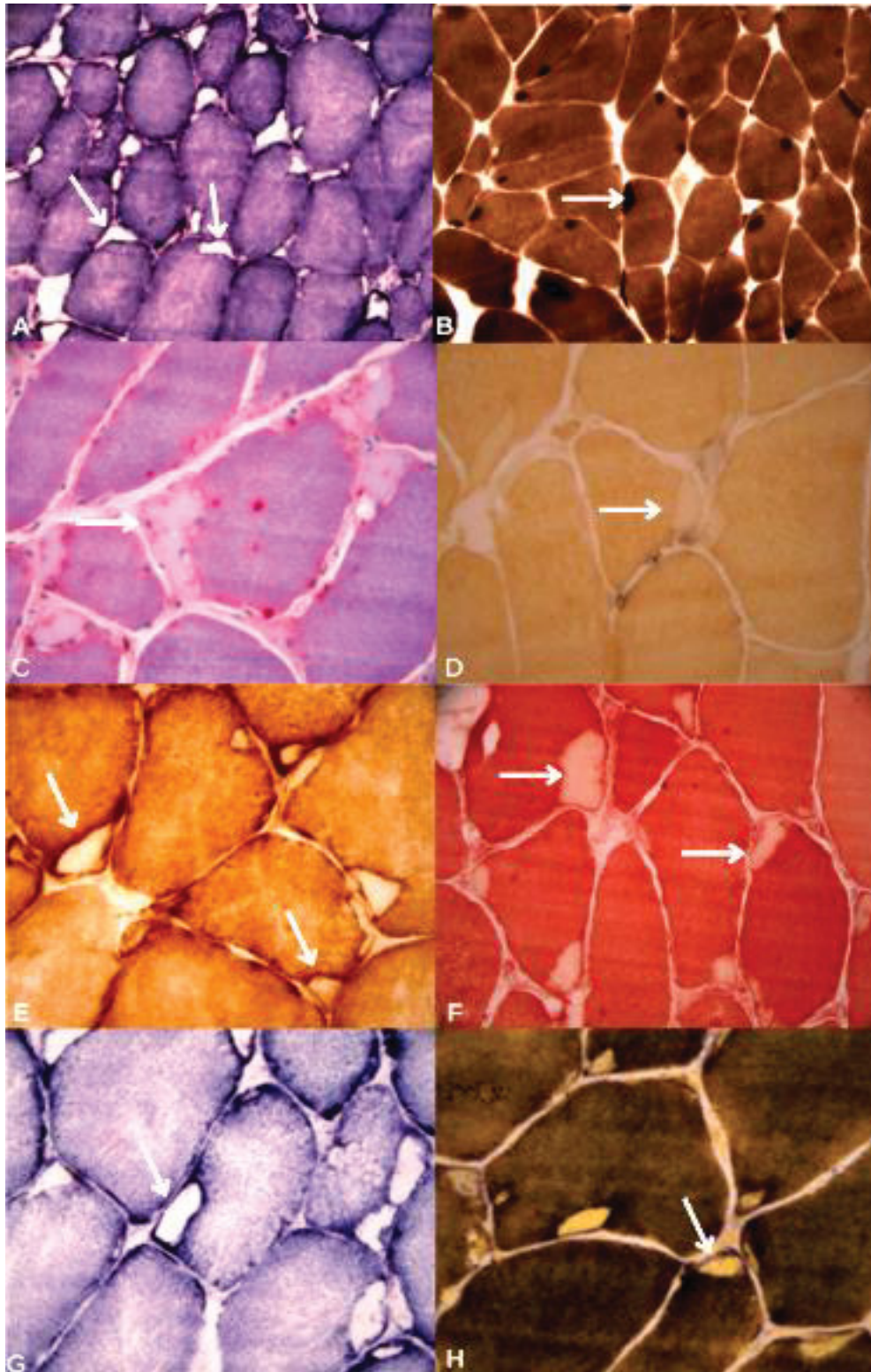
FIGURA 10 - CARACTERÍSTICAS DAS COLORAÇÕES NA BIÓPSIA MUSCULAR DO CASO 1



Em A: HE, corpos hialinos subsarcolemais (setas) ampliação de 400X. B: Coloração em TG, acúmulo de material subsarcolemal com aspecto hialino (seta), ampliação de 400X. C: Cresil violeta, corpo hialinos sem coloração (seta) ampliação de 400X; D: PAS, corpos hialinos com leve coloração (setas), ampliação de 200X; E: Oil Red O, corpos hialinos sem coloração (setas) ampliação de 400X; F: Sirius Red, corpos hialinos sem coloração (setas), ampliação de 400X;

FONTE: O autor (2023).

FIGURA 11 - CARACTERÍSTICAS DAS REAÇÕES NA BIÓPSIA MUSCULAR DO CASO 1



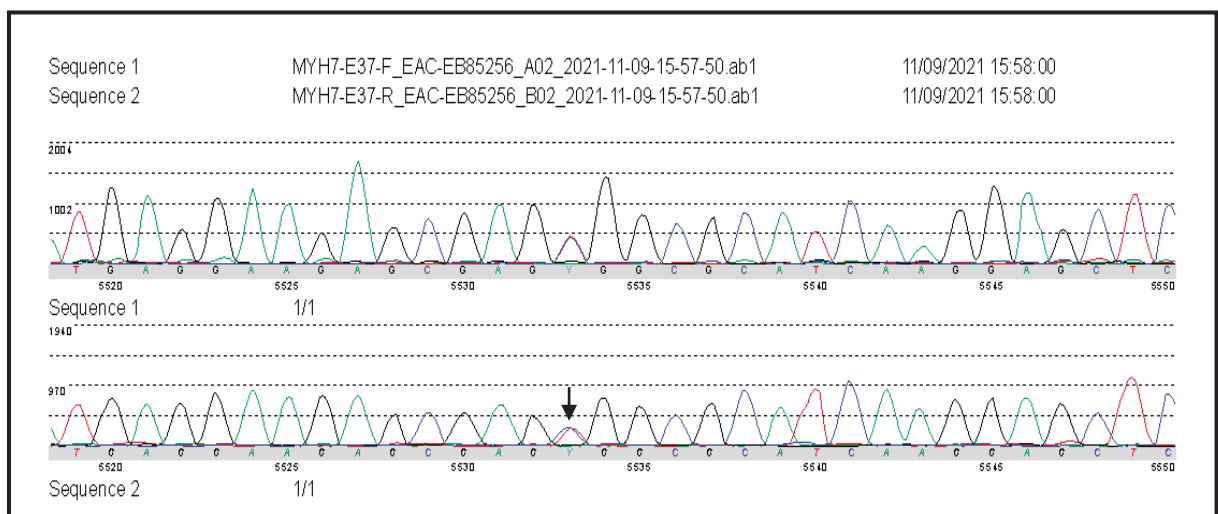
Em A: Reação em NADH-TR, corpos hialinos não reagem e estão presentes nas fibras do tipo I, ampliação de 200X; B: Reação em ATPase 4.3, corpos hialinos reagem e estão presentes nas fibras do tipo 1, ampliação de 200X; C: Fosfatase ácida, corpos hialinos não reagem, ampliação de 400X; D: Fosfatase alcalina, corpos hialinos não reagem, ampliação de 400X. E: COX, corpos hialinos não reagem, ampliação 400X; F: Esterase inespecífica, corpos hialinos não reagem, aumento de 400X; G: SDH, corpos hialinos não reagem, aumento em 400X H: Miofosforilase, corpos hialinos não reagem, aumento em 400X.

FONTE: O autor (2023)

6.1.8 Estudo genético

A análise molecular identificou a variante c.5533C>T (p.Arg1845Trp) em heterozigose no gene *MYH7*, ou seja, apresentam alelos diferentes em cromossomos homólogos, conforme observado nos gráficos apresentados pelo software de análise *Seqpilot* na FIGURA 12.

FIGURA 12 - ELETROFEROGRAMA DA PACIENTE 1. NA SETA, EM Y INDICA A MUTAÇÃO EM HETEROZIGOSE NO SÍTIO c.5533C>T

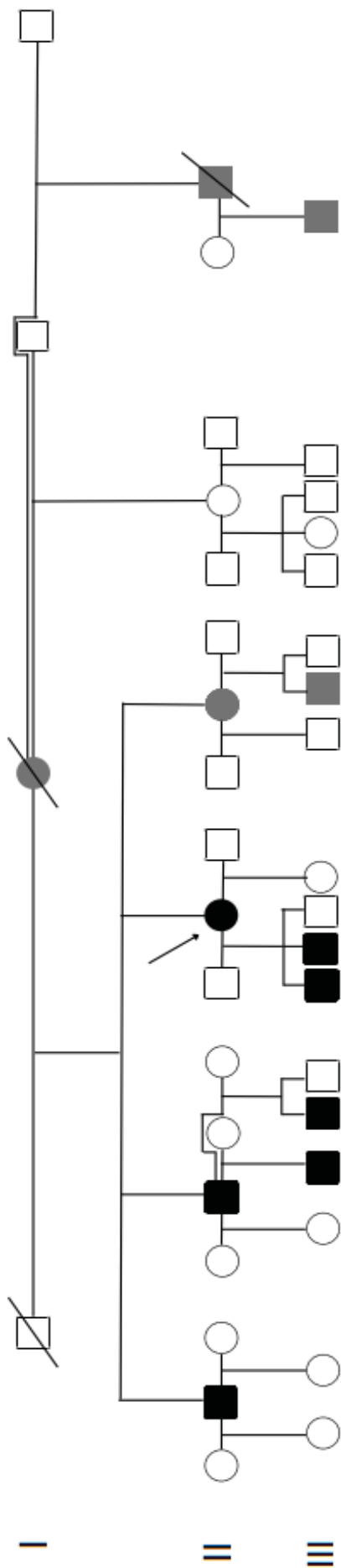


FONTE: O autor (2022).

6.1.9 Heredograma

O heredograma familiar foi construído a partir dos resultados genéticos obtidos neste trabalho, e, com as informações obtidas na anamnese com a paciente 1. Observa-se o comprometimento de duas gerações, com provável origem materna e padrão de herança autossômico dominante conforme FIGURA 13.

FIGURA 13 - HEREDOGRAMA FAMILIAR



NOTAS: Heredograma da família. A mutação nesta família é de linhagem materna e o padrão de herança é autossômico dominante. Familiares fenotipicamente suspeitos que não participaram do estudo foram ressaltados pelo preenchimento de cor cinza. Símbolos cortados por linha diagonal indicam indivíduos falecidos. A seta indica o propósipto. FONTE: O autor (2023).

6.2 CASO 2

6.2.1 Dados demográficos e achados clínicos

Paciente do sexo masculino foi avaliado aos 57 anos, irmão da paciente 1. Relata quedas frequentes na infância, porém nega hipotonia e nega atraso nos marcos motores no período neonatal. Informa que os primeiros sintomas iniciaram-se a partir dos 6 anos de idade, onde observou dificuldade para correr. O curso da doença foi lento e progressivo conforme descrito na TABELA 5. Ao exame físico apresentou fraqueza muscular grave de predomínio proximal e axial com envolvimento dos músculos nos abdutores, extensores e flexores de ombros, abdutores, adutores, extensores e flexores do quadril, flexores do joelho, eversores e inversores dos pés. As principais anormalidades osteoesqueléticas foram: escápula alada, cifose, hiperlordose, baqueteamento digital e pseudo-hipertrofia das panturrilhas conforme FIGURA 14 e retração do tendão de aquiles. As características clínicas mais importantes estão descritas nas TABELAS 6 e 7. Além disso, apresentou marcha anserina, dificuldade em levantar-se da cadeira, dificuldade para elevar os braços acima dos ombros e levantar peso e dificuldade para andar com o calcanhar. Relatou mialgia, fadiga e câimbras frequentes.

FIGURA 14 - IMAGEM DO PACIENTE 2 E ACHADOS CLÍNICOS IMPORTANTES



Em A:Fraqueza da cintura escapular; B: Cifose; C: Escápula alada; D: Baqueteamento digital e unhas em vidro de relógio; E:Pseudo-hipertrofia das panturrilhas.

FONTE: O autor (2023)

6.2.2 Exame laboratorial

A dosagem sérica de CPK estava elevada. O nível encontrado foi de 657,0 U/L, com valores de referência de 39,0 a 308,0 U/L para homens conforme descrito na TABELA 8.

6.2.3 Eletroneuromiografia

O padrão da eletromiografia de agulha observado neste paciente foi miopático. O estudo da velocidade de condução nervosa estava normal conforme TABELA 8.

6.2.4 Avaliação cardíaca

O eletrocardiograma apresentou sobrecarga ventricular esquerda. O ecocardiograma transtorácico apresentou refluxo discreto tricúspide conforme TABELA 8.

6.2.5 Espirometria

O teste de função respiratória apresentou distúrbio ventilatório restritivo moderado com capacidade vital forçada de 52% do previsto conforme TABELA 8.

6.2.6 Biópsia muscular

A presença de fibras musculares com corpos hialinos estavam presentes em 65% das fibras do tipo 1. A TABELA 2 descreve os achados dos corpos hialinos e as TABELAS 3 e 4 descrevem as alterações anatomopatológicas específicas. As imagens das biópsias estão fotodocumentadas nas FIGURAS 15 e 16.

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DAS ESTRUTURAS EM CORPOS HIALINOS POR MICROSCOPIA ÓPTICA DOS CASOS 1 E 2

COLORAÇÕES	CASO 1	CASO 2
Hematoxilina e Eosina	Irregulares eosinofílicos	Irregulares eosinofílicos
Tricrômico de Gomori	Irregulares material hialino	Irregulares material hialino
Adenilato deaminase	-	-
Cresil Violeta	-	-
Oil Red O	-	-
PAS	+/-	+/-
Sirius Red	-	-
REAÇÕES		
ATPase pH 9.4	-	-
ATPase pH 4.6	+	+
ATPase pH 4.3	+	+
Citocromo C-Oxidase	-	-
Esterase inespecífica	-	-
Fosfatase ácida	-	-
Fosfatase alcalina	-	-
Miofosforilase	-	-
NADH-TR	-	-
SDH	-	-

LEGENDA: coloração/reação: (+) presente (-) ausente (+/-) leve; PAS: ácido periódico Schiff; ATPase: adenosina trifosfatase; NADH-TR - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo - Tetrazolium Redutase; SDH: desidrogenase succínica.

FONTE: O autor (2023)

TABELA 3 - ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS ESPECÍFICAS DAS COLORAÇÕES NA BIÓPSIA MUSCULAR DOS CASOS 1 E 2

Hematoxilina-Eosina e Tricrômico de Gomori Modificado	CASO 1	CASO 2
Proliferação tecido conjuntivo	+	++
Infiltração tecido adiposo	0	0
Variação diâmetro fibras	++	+++
Fibra hipertrófica dispersa	0	+
Necrose	0	0
Infiltrado inflamatório difuso	0	0
Infiltração inflamatório desproporcional à necrose	0	0
Núcleos centrais	0	++
Grumos nucleares	+	+
Basofilia	0	0
Corpos hialinos	+++	+++
Segmentações	0	0
Adenilato Deaminase		
Deficiência em fibras	0	0
Oil Red O		
Aumento gotículas fibras tipo 1	0	0
Sirius Red		
Aumento tecido intersticial	0	0

LEGENDA: (0) ausência; (+) presença discreta; (++) presença moderada; (+++) presença acentuada.

FONTE: O autor (2023).

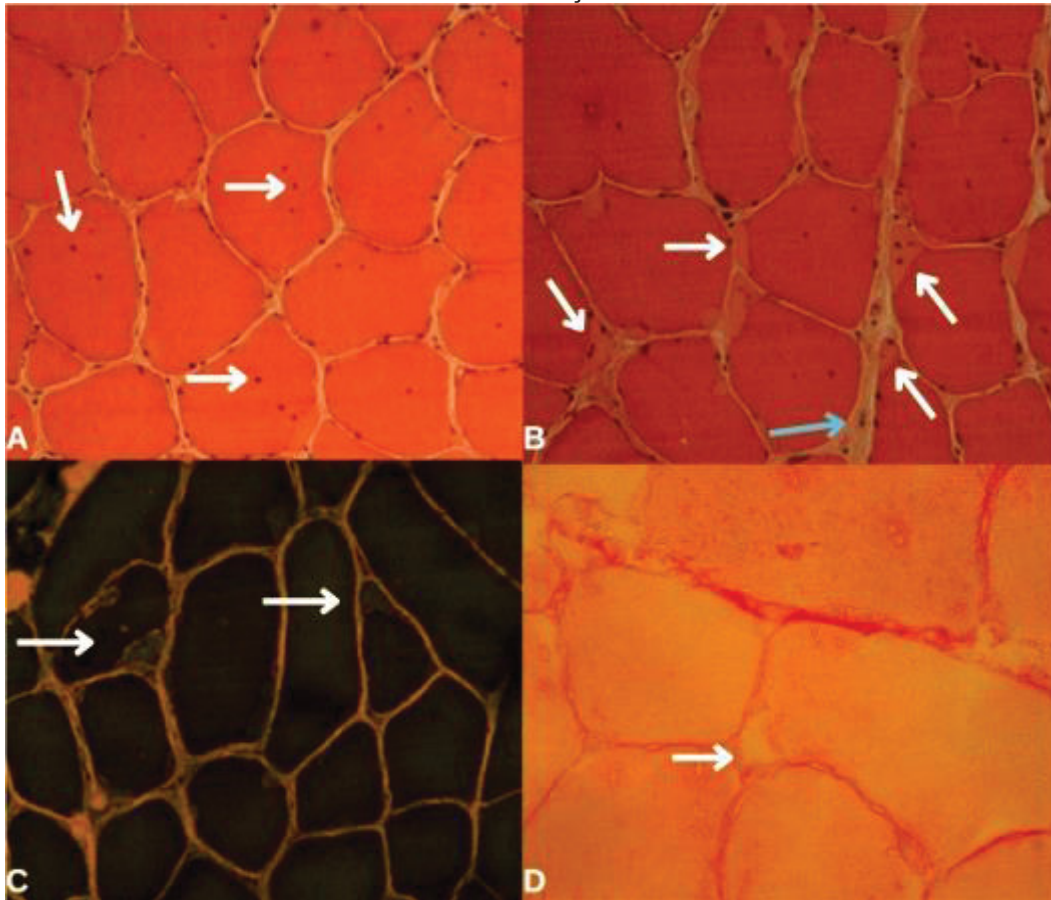
TABELA 4 - ATERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS ESPECÍFICAS DAS REAÇÕES NA BIÓPSIA MUSCULAR DOS CASOS 1 E 2

	CASO 1	CASO 2
NADH-Tetrazolium Reductase		
Saca-bocados	0	0
Turbilhões	0	0
Enrodilhamentos	0	0
Anéis	0	0
Aumentofocal NBT reduzido na fibra	0	0
<i>Moth-eaten</i>	+++	+++
ATPases pH 9,4, 4,3 e 4,6		
Agrupamentos	0	+
Atrofia fibras tipo I	++	+
Atrofia fibras tipo II	0	0
Hipertrofia fibras tipo I	0	0
Hipertrofia fibras tipo II	0	++
Predomínio fibras tipo I	++	++
Predomínio fibras tipo II	0	0
Esterase inespecífica		
Fibras angulares atroficas	+	+
Aumento atividade interstício	0	0
Fosfatase ácida		
Aumento focal fibras	0	0
Fibras positivas	++	+
Aumento interstício	0	0
Aumento fagócitos mononucleares	0	0
Fosfatase alcalina		
Fibras positivas	0	0
Aumento interstício	0	0
Desidrogenase Succínica		
Acúmulo sub-sarcolemal	0	0
Acúmulo focal celular	0	0
Aumento volume grânulos	0	0
Citocromo C-Oxidase		
Acúmulo sub-sarcolemal	+	+

LEGENDA: (0) ausência; (+) presença discreta; (++) presença moderada; (+++) presença acentuada.

FONTE: O autor (2023).

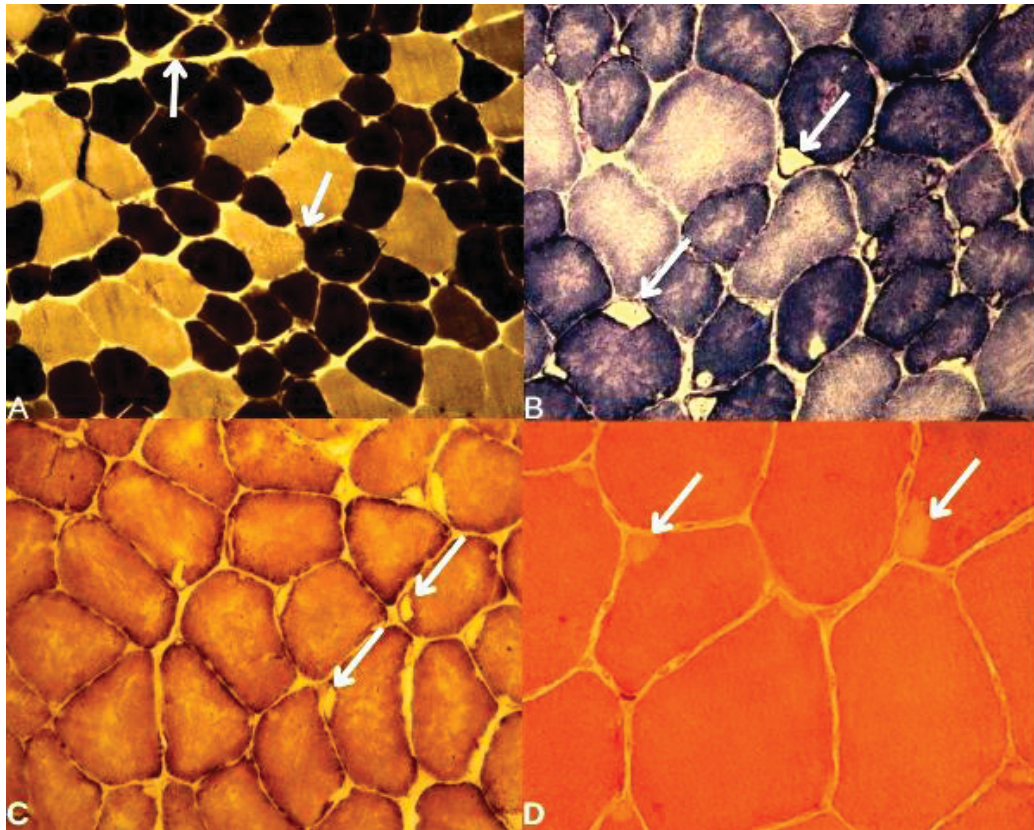
FIGURA 15 - CARACTERÍSTICAS DAS COLORAÇÕES NA BIÓPSIA MUSCULAR DO CASO 2



Em A: HE, vários núcleos centrais (setas) ampliação de 200X; B:HE, vários corpos hialinos na periferia da fibra muscular (setas brancas), tecido endomesial discretamente aumentado (seta azul), ampliação de 200X; C: TG, acúmulo de material subsarcolemal com aspecto hialino (setas) ampliação 400X; D: Sirius Red, corpos hialinos sem coloração, ampliação de 400X.

FONTE: O autor (2023)

FIGURA 16 - CARACTERÍSTICAS DAS REAÇÕES NA BIÓPSIA MUSCULAR DO CASO 2



Em A: reação em ATPase em pH 4,6 os corpos hialinos reagem (setas) ampliação de 100X; B: reação em NADH-TR, inúmeras fibras com *moth-eaten* e corpos hialinos não reagem (seta) ampliação de 200X; C: reação em COX, acúmulo de material subsarcolemal, corpos hialinos não reagem (setas) ampliação de 200X; D: reação em esterase inespecífica, corpos hialinos não reagem (setas) ampliação de 400X.

FONTE: O autor (2023)

6.2.7 Estudo genético

A análise molecular identificou a variante c.5533C>T (p.Arg1845Trp) em heterozigose no gene *MYH7*, ou seja, apresentam alelos diferentes em cromossomos homólogos, conforme observado nos gráficos apresentados pelo software de análise *Seqpilot* na FIGURA 17.

FIGURA 18 - IMAGEM DO PACIENTE 3 E ACHADOS CLÍNICOS IMPORTANTES

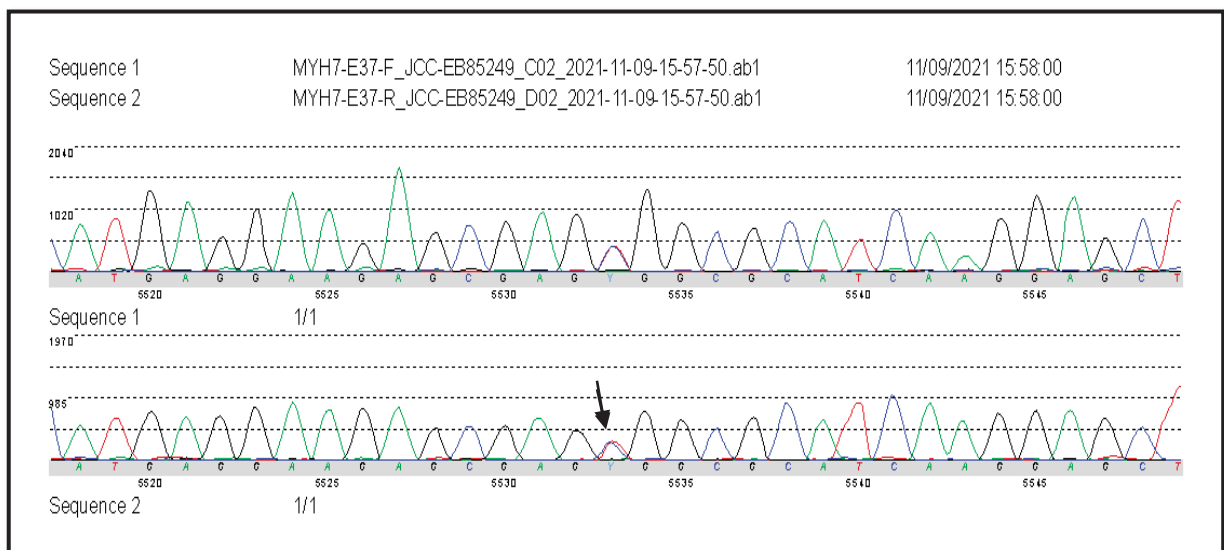


Em A: Escápula alada B: Cifose; C: Pseudo-Hipertrofia das panturrilhas.
FONTE: O autor (2023).

6.3.2 Estudo genético

A análise molecular identificou a variante c.5533C>T (p.Arg1845Trp) em heterozigose no gene *MYH7*, ou seja, apresentam alelos diferentes em cromossomos homólogos, conforme observado nos gráficos apresentados pelo software de análise *Seqpilot* na FIGURA 19.

FIGURA 19 - ELETROFEROGRAMA DO PACIENTE 3. NA SETA, EM Y INDICA A MUTAÇÃO EM HETEROZIGOSE NO SÍTIO c.5533C>T



FONTE: O autor (2022).

6.4 CASO 4

6.4.1 Dados demográficos e achados clínicos

Paciente do sexo masculino, avaliado aos 27 anos de idade, filho da paciente 1. Conforme relato da mãe, as manifestações clínicas iniciaram-se no período neonatal com hipotonia e fraqueza muscular. Não teve atraso no desenvolvimento motor, porém na infância apresentou dificuldade para correr, subir escadas e tinha quedas frequentes. O curso da doença é lento e progressivo conforme TABELA 5. Ao exame físico apresentou fraqueza muscular leve de predomínio proximal e distal com envolvimento dos músculos flexores do quadril e dorsoflexores dos pés. A principal anormalidade osteoesquelética foi a presença proeminente da escápula alada, além disso, outro achado importante foi a observação de baqueteamento digital e unhas em vidro de relógio conforme FIGURA 20 e retração do tendão de aquiles. As características clínicas mais importantes estão descritas nas TABELAS 6 e 7. Além disso, apresentou dificuldade para elevar os braços acima dos ombros e dificuldade para andar com o calcanhar. Nega fadiga, mialgia e câimbras.

FIGURA 20 - IMAGEM DO PACIENTE 4 E ACHADOS CLÍNICOS IMPORTANTES



Em A e B: Escápula alada; C: Pseudo-hipertrofia de panturrilhas; D e E: Baqueteamento digital; F: Unhas em vidro de relógio

FONTE: O autor (2023).

6.4.2 Exame laboratorial

A dosagem sérica de CPK estava elevada. O nível encontrado foi de 1008,0 U/L com valores de referência de 39,0 a 308,0 U/L para homens conforme descrito na TABELA 8.

6.4.3 Avaliação cardíaca

O eletrocardiograma apresentou desvio do eixo elétrico para a direita e sobrecarga ventricular esquerda. O ecocardiograma transtorácico apresentou ventrículo esquerdo com padrão geométrico de hipertrofia excêntrica, dimensão interna preservada e fração de ejeção no limite inferior da normalidade, conforme TABELA 8.

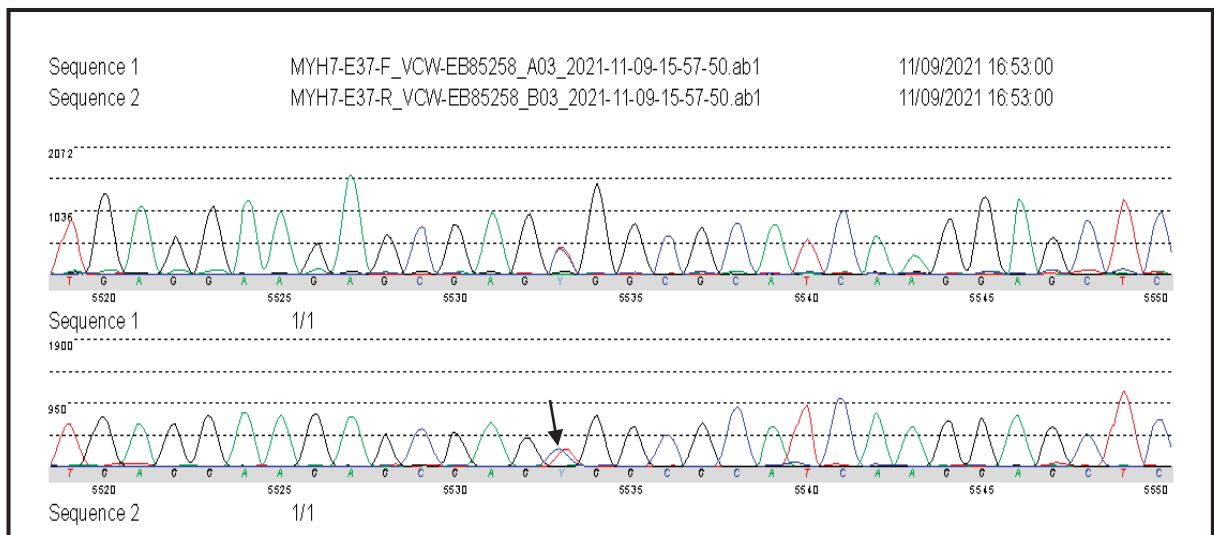
6.4.4 Espirometria

O teste de função respiratória apresentou distúrbio ventilatório restritivo moderado com capacidade vital forçada de 59% do previsto conforme TABELA 8.

6.4.5 Estudo genético

A análise molecular identificou a variante c.5533C>T (p.Arg1845Trp) em heterozigose no gene *MYH7*, ou seja, apresentam alelos diferentes em cromossomos homólogos, conforme observado nos gráficos apresentados pelo software de análise *Seqpilot* na FIGURA 21.

FIGURA 21 - ELETROFEROGRAMA DO PACIENTE 4. NA SETA, EM Y INDICA A MUTAÇÃO EM HETEROZIGOSE NO SÍTIO c.5533C>T



FONTE: O autor (2022).

6.5 CASO 5

6.5.1 Dados demográficos e achados clínicos

Paciente do sexo masculino, avaliado aos 23 anos, filho da paciente 1. As manifestações clínicas iniciaram-se no nascimento, apresentando hipotonia e atraso no desenvolvimento dos marcos motores. Relatou fraqueza muscular na infância com dificuldade para correr, subir escadas, além de quedas frequentes e marcha anserina conforme TABELA 5. Ao exame físico observou-se atrofia muscular grave e fraqueza de predomínio proximal com envolvimento dos músculos flexores e extensores de ombros, extensores dos dedos, extensores do quadril, dorsoflexores dos tornozelos, inversores e eversores dos pés. Escoliose, hiperlordose e pseudo-hipertrofia das panturrilhas foram achados importantes conforme FIGURA 22 e retração do tendão de aquiles. As características clínicas mais importantes estão descritas nas TABELAS 6 e 7. Apresentou marcha anserina, dificuldade em elevar os braços acima dos ombros, dificuldade para subir escadas, correr e levantar-se de uma cadeira. Nega mialgia, fadiga e câimbras.

FIGURA 22 - IMAGEM DO PACIENTE 5 E ACHADOS CLÍNICOS IMPORTANTES



Em A: Escoliose; B: Pseudo-hipertrofia de panturrilhas.

FONTE: O autor (2023).

6.5.2 Exame laboratorial

A dosagem sérica de CPK estava elevada. O nível encontrado foi de 1946,0 U/L, com valores de referência de 39,0 a 308,0 U/L para homens conforme descrito na TABELA 8.

6.5.3 Eletroneuromiografia

O padrão da eletromiografia de agulha observado neste paciente foi miopático. O estudo da velocidade de condução nervosa estava normal TABELA 8.

6.5.4 Avaliação cardíaca

O eletrocardiograma apresentou um distúrbio de condução do ramo direito do feixe de HIS. O ecocardiograma transtorácico apresentou ventrículo esquerdo com dimensão interna, função diastólica, e fração de ejeção preservadas, átrio esquerdo e câmaras direitas preservados conforme TABELA 8.

6.5.5 Espirometria

O teste de função respiratória apresentou distúrbio ventilatório restritivo grave com capacidade vital forçada de 50% do previsto conforme TABELA 8.

6.5.6 Estudo genético

A análise molecular identificou a variante c.5533C>T (p.Arg1845Trp) em heterozigose no gene *MYH7* conforme TABELA 8.

6.6 CASO 6

6.6.1 Dados demográficos e achados clínicos

Paciente do sexo masculino, avaliado aos 27 anos, filho do paciente 2. As manifestações clínicas iniciaram-se no período neonatal, no qual apresentou hipotonia, porém, nega atraso no desenvolvimento motor. Relata fraqueza muscular na infância marcada pela presença de quedas frequentes, dificuldade de correr e marcha anserina conforme TABELA 5. Ao exame clínico apresentou fraqueza proximal e axial com envolvimento dos músculos flexores e extensores do pescoço,

abdutores, adutores, flexores e extensores dos ombros, flexores do quadril, dorsoflexores, eversores e inversores dos pés. Foram observadas escápula alada, baqueteamento digital e unhas em vidro de relógio conforme FIGURA 23 e retração do tendão de aquiles. As características clínicas mais importantes estão descritas nas TABELAS 6 e 7. Apresentou dificuldade de elevar os braços acima dos ombros, subir escadas e dificuldade para andar com o calcanhar. Relata fadiga e nega mialgia e câimbras.

FIGURA 23 - IMAGEM DO PACIENTE 6 E ACHADOS CLÍNICOS IMPORTANTES



Em A: Face miopática; B: Escápula alada; C: Baqueteamento digital e unhas em vidro de relógio.

FONTE: O autor (2023)

6.6.2 Exame laboratorial

A dosagem sérica de CPK estava elevada. O nível encontrado foi de 733,0 U/L, com valores de referência de 39,0 a 308,0 U/L para homens conforme descrito na TABELA 8.

6.6.3 Avaliação cardíaca

A avaliação cardíaca foi normal, tanto no eletrocardiograma como no ecocardiograma transtorácico conforme TABELA 8.

6.6.4 Espirometria

O teste de função respiratória apresentou distúrbio ventilatório restritivo leve com capacidade vital forçada de 67% do previsto conforme TABELA 8.

6.6.5 Estudo genético

A análise molecular identificou a variante c.5533C>T (p.Arg1845Trp) em heterozigose no gene *MYH7* conforme TABELA 8.

6.7 CASO 7

6.7.1 Dados demográficos e achados clínicos

Paciente do sexo masculino, avaliado aos 17 anos de idade, filho do paciente 2. Informa que observou anormalidade escapular aos 5 anos de idade, porém nega hipotonia, atraso no desenvolvimento dos marcos motores, fraqueza muscular ou quaisquer dificuldades em atividades físicas durante a infância TABELA 5. Ao exame físico apresentou acometimento moderado dos músculos proximais com envolvimento dos músculos extensores e flexores de ombros, abdutores, adutores, extensores e flexores do quadril, dorsoflexores dos tornozelos e pés. As principais anormalidades osteoesqueléticas foram: escápula alada, hiperlordose e pé cavo, ademais, outro achado relevante foi a presença de baqueteamento digital FIGURA 24 e retração do tendão de aquiles. As características clínicas mais importantes estão descritas nas TABELAS 6 e 7. Além disso, apresentou dificuldade de andar com o calcanhar e nega fadiga, mialgia e câimbras.

FIGURA 24 - IMAGEM DO PACIENTE 7 E ACHADOS CLÍNICOS IMPORTANTES



Em A: Hiperlordose; B: Escápula alada; C: Pé cavo
FONTE: O autor (2023).

6.7.2 Exame laboratorial

A dosagem sérica de CPK estava elevada. O nível encontrado foi de 691,0 U/L, com valores de referência de 39,0 a 308,0 U/L para homens conforme descrito na TABELA 8.

6.7.3 Avaliação cardíaca

A avaliação cardíaca foi normal, tanto no eletrocardiograma como no ecocardiograma transtorácico conforme TABELA 8.

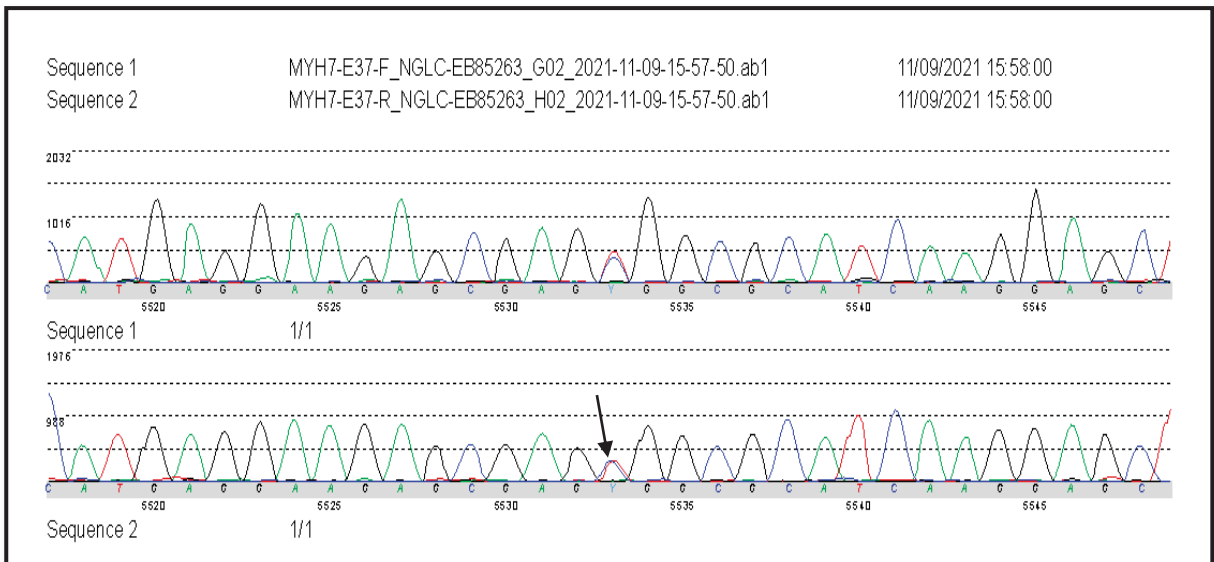
6.7.4 Espirometria

O teste de função respiratória apresentou distúrbio ventilatório restritivo moderado com capacidade vital forçada de 58% do previsto conforme TABELA 8.

6.7.5 Estudo genético

A análise molecular identificou a variante c.5533C>T (p.Arg1845Trp) em heterozigose no gene *MYH7*, ou seja, apresentam alelos diferentes em cromossomos homólogos, conforme observado nos gráficos apresentados pelo software de análise Seqpilot na FIGURA 25.

FIGURA 25 – ELETROFEROGRAMA DO PACIENTE 7. NA SETA, EM Y INDICA A MUTAÇÃO EM HETEROZIGOSE NO SÍTIO c.5533C>T



FONTE: O autor (2022).

6.8 RESULTADOS GERAIS

Foram avaliados 7 pacientes, dentre os quais a idade variou entre 17 e 58 anos, sendo 6 pacientes do sexo masculino e uma paciente do sexo feminino. A apresentação clínica neste grupo foi heterogênea. Para melhor visualização e comparação entre os resultados, os parâmetros demográficos, achados clínicos importantes e força muscular estão dispostos nas TABELAS 5, 6 e 7. As manifestações clínicas iniciais mais frequentes foram: quedas frequentes e acometimento escapular. Complicações neonatais foram relatadas em 3 pacientes

com hipotonia, sendo que, apenas um paciente apresentou atraso no desenvolvimento dos marcos motores. A maioria dos pacientes apresentou fraqueza muscular na infância marcada pela dificuldade para subir escadas, correr e a presença de marcha anserina. Ao exame clínico, foi observado em todos os pacientes: face alongada, palato arqueado, escápula alada e pseudo-hipertrofia de panturrilhas. Escoliose e hiperlordose também foram achados frequentes. Fraqueza muscular foi observada em todos os pacientes, sendo de predomínio proximal. Os resultados dos exames realizados estão exemplificados na TABELA 8. A eletroneuromiografia apresentou padrão miopático para 3 pacientes. A dosagem da enzima CPK estava elevada em 5 pacientes. O eletrocardiograma apresentou alterações relevantes em 3 pacientes. O teste de função respiratória através da mensuração da capacidade vital forçada apresentou distúrbio ventilatório restritivo leve em um paciente, moderado em três pacientes e grave em dois pacientes. Ademais, dois pacientes que apresentaram baqueteamento digital e unhas em vidro de relógio com distúrbio restritivo respiratório moderado também apresentaram alterações cardiológicas. Em contrapartida, tivemos um paciente que também apresentou baqueteamento digital e unhas em vidro de relógio com distúrbio respiratório restritivo leve porém sem alterações cardiológicas, e, outro paciente com baqueteamento digital com distúrbio respiratório grave, porém também sem alterações cardiológicas. Todos os pacientes apresentaram a mutação p.Arg1845Trp no gene *MYH7*.

TABELA 5 - DADOS DEMOGRÁFICOS, SINTOMAS INICIAIS E EVOLUÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES COM MIOPATIA DE ARMAZENAMENTO DE MIOSINA DO PRESENTE ESTUDO

Casos	Sexo	Idade na avaliação	Idade de início dos sintomas	Sintomas iniciais	Curso da doença
Caso 1	Feminino	55	12	Quedas frequentes	Lento e progressivo*
Caso 2	Masculino	57	6	Dificuldade para correr	Lento e progressivo
Caso 3	Masculino	55	4	Atraso no desenvolvimento motor	Lento e progressivo
Caso 4	Masculino	27	5	Fraqueza da cintura escapular	Lento e progressivo
Caso 5	Masculino	23	6	Quedas frequentes	Lento e progressivo
Caso 6	Masculino	27	5	Quedas frequentes	Lento e progressivo
Caso 7	Masculino	17	5	Fraqueza da cintura escapular	Lento e progressivo

NOTAS: * Doença inicia-se na infância, estende-se até a fase adulta e há atrofia muscular e perda contínua da força muscular.

FONTE: O autor (2023)

TABELA 6 - ACHADOS CLÍNICOS IMPORTANTES DOS PACIENTES COM MIOPATIA DE ARMAZENAMENTO DE MIOSINA DO PRESENTE ESTUDO

Parâmetros	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5	Caso 6	Caso 7
<i>Atrofia muscular MMSS</i>							
Proximal	+	+	+	+	+	+	+
Distal	-	-	-	-	-	-	-
<i>Atrofia muscular MMII</i>							
Proximal	+	+	+	+	+	+	+
Distal*	+	+	+	+	+	+	+
Pseudo-hipertrofia de panturrilhas	+	+	+	+	+	+	+
<i>Tônus</i>							
Hipotonia	+	+	+	+	+	+	+
<i>Deformidades faciais e esqueléticas</i>							
Fraqueza facial	+	+	+	+	+	+	-
Face alongada	+	+	+	+	+	+	+
Palato arqueado	+	+	+	+	+	+	+
Ptose	-	-	+	+	-	-	-
Cifose	+	+	+	-	-	-	-
Escápula alada	+	+	+	+	+	+	+
Escoliose	+	+	+	-	+	+	+
Hiperlordose	+	+	+	+	+	-	+
Pés cavos	+	+	+	+	+	-	+
<i>Outros sinais e sintomas</i>							
Baqueteamento digital/Unha em vidro de relógio	+/AI	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-
Marcha anserina	+	+	+	-	+	-	-
Reflexos tendinosos	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Normo/Hipo	Normo/Hipo	Normo/Hipo	Normo/Hipo

LEGENDA: MMSS - membros superiores; MMII - membros inferiores; (+) presente (-)ausente

NOTAS: Normo: reflexos normais; Hipo: reflexos hipoativos; AI: ausência de informação; * atrofia em pés

FONTE: O autor (2023).

TABELA 7 - FORÇA MOTORA DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO MODIFICADA DO MEDICAL RESEARCH COUNCIL DOS PACIENTES ESTUDADOS

MOVIMENTOS AVALIADOS	Grau de Força Muscular*						
	CASO 1	CASO 2	CASO 4	CASO 5	CASO 6	CASO 7	
Músculos flexores do pescoço	4-	4-	5	5	4-	5	
Músculos extensores do pescoço	4-	4-	5	5	4-	5	
Músculos flexores do tronco	4+	3+	5	5	5	5	
Músculos extensores do tronco	4+	3+	5	5	5	5	
Abdução de ombros	3+	3+	4+	4-	3+	4-	
Adução de ombros	3+	3+	4+	4-	3+	4-	
Flexores de ombros	4-	4-	4+	3-	4-	4-	
Extensores de ombros	4-	4-	4+	3-	4-	4-	
Flexores de cotovelo	4+	4+	5	5	5	5	
Extensores de cotovelo	4+	4+	5	5	5	5	
Extensores dos punhos	5	5	5	5	5	5	
Flexores dos punhos	5	5	5	5	5	5	
Extensores dos dedos	5	5	5	5	5	5	
Abdução de quadril	3-	3	4+	4+	4+	4+	
Adução de quadril	3-	3	4+	4+	4+	4+	
Extensores do quadril	3-	3-	4+	4+	4+	4+	
Flexores de quadril	3-	3-	4+	4+	4+	4+	
Extensores de joelho	4-	4-	5	5	5	5	
Flexores de joelho	4-	4-	5	5	5	5	
Dorsoflexão dos tornozelos	4+	4+	5	5	5	5	
Flexão plantar	4+	4+	4+	4+	4-	4-	
Eversores do pé	4+	4+	4+	4+	4-	4-	
Inversores do pé	4+	4+	4+	4+	4-	4-	

NOTAS: * escala de Mendell; Florence (1990)

FONTE: O autor (2023)

TABELA 8 - RESULTADOS DOS EXAMES REALIZADOS NOS PACIENTES COM MIOPATIA DE ARMAZENAMENTO DE MIOSINA DO PRESENTE ESTUDO

EXAMES	CASO 1	CASO 2	CASO 3	CASO 4	CASO 5	CASO 6	CASO 7
CPK (U/L)*	141 U/L	657 U/L	NR	1008 U/L	1946 U/L	733 U/L	691 U/L
Eletro-neuromiografia	Padrão Miopático	Padrão Miopático	NR	NR	Padrão Miopático	NR	NR
Eletrocardiograma	Normal	Alterado (SVE)	NR	Alterado (DEED; SVE)	Alterado (DCD)	Normal	Normal
Ecocardiograma	Normal	Alterado (RDT)	NR	Alterado (HE)	Normal	Normal	Normal
Espirometria (CVF#)	46%	52%	NR	59%	50%	67%	58%
Gene envolvido	MYH7	MYH7	MYH7	MYH7	MYH7	MYH7	MYH7
Mutação genética	p.Arg1845Trp	p.Arg1845Trp	p.Arg1845Trp	p.Arg1845Trp	p.Arg1845Trp	p.Arg1845Trp	p.Arg1845Trp

LEGENDA: CPK: creatina fosfoquinase; U/L: unidades por litro

NOTAS: RDT: Refluxo discreto tricúspide; SVE: Sobrecarga ventricular esquerda; DEED: Desvio eixo elétrico para a direita; HE: Hipertrofia excêntrica; DCD: Distúrbio de condução direito; NR: Não realizado; *valor de referência da CPK: 26,0 a 192,0 U/L-mulheres e 39,0 a 308,0 U/L-homens; CVF: capacidade vital forçada, #valor de referência: percentual do previsto, leve 60-LI%, moderada 51-59% e grave ≤50%.

FONTE: O autor (2023)

7 DISCUSSÕES

A amostra do presente estudo apresenta um número significativo de casos de miopatia de armazenamento de miosina. O número pequeno de casos descritos na literatura, assim como a amostra deste estudo sugere cautela na interpretação dos dados. A idade média do início dos sintomas dos pacientes aqui estudados foi de 6 anos, e a evolução clínica apresentou-se lenta e progressiva, consistente com a maioria dos casos descritos anteriormente (SAHGAL; SAHGAL, 1977; CEUTERIK; MARTIN; MARTENS, 1993; BAROHN; BRUMBACK; MENDELL, 1994; MASUZUGAWA, *et al.*, 1997; BOHLEGA *et al.*, 2003; TAJSHARGHI *et al.*, 2003; ONENGUT, *et al.*, 2004; LAING *et al.*, 2005; RAFAY; HALLIDAY; BRIL, 2005; SHINGDE, *et al.*, 2006; PEGORARO *et al.*, 2007; URO-COSTE *et al.*, 2009; STALPERS, *et al.*, 2011; BANFÁI, *et al.*, 2017; MAMELONA, *et al.*, 2019).

Além disso, em nossa série de pacientes estudados, o acometimento foi maior em homens do que em mulheres, o que pode ser devido ao número pequeno de indivíduos estudados, visto que, na literatura, há uma proporção equilibrada entre os sexos, (SAHGAL; SAHGAL, 1977; CEUTERIK; MARTIN; MARTENS, 1993; BAROHN; BRUMBACK; MENDELL, 1994; MASUZUGAWA, *et al.*, 1997; BOHLEGA *et al.*, 2003; TAJSHARGHI *et al.*, 2003; ONENGUT, *et al.*, 2004; LAING *et al.*, 2005; RAFAY; HALLIDAY; BRIL, 2005; SHINGDE, *et al.*, 2006; PEGORARO *et al.*, 2007; URO-COSTE *et al.*, 2009; STALPERS, *et al.*, 2011; BANFÁI, *et al.*, 2017; MAMELONA, *et al.*, 2019).

A maioria dos casos descritos em literatura apresentou acometimento proximal proeminente compatível com os achados dos nossos pacientes (SAHGAL; SAHGAL, 1977; BAROHN; BRUMBACK; MENDELL, 1994; MASUZUGAWA, *et al.*, 1997; TAJSHARGHI *et al.*, 2003; RAFAY; HALLIDAY; BRIL, 2005; TAJSHARGHI *et al.*, 2007; PEGORARO *et al.*, 2007; MAMELONA, *et al.*, 2019). Ademais, há vários casos de acometimento distal, em nosso estudo todos os pacientes apresentaram acometimento distal de forma menos acentuada, compatível com as descrições de literatura (TAJSHARGHI *et al.*, 2003; SHINGDE, *et al.*, 2006; PEGORARO *et al.*, 2007). Além disso, nenhum dos nossos pacientes apresentava pés caídos, embora os pacientes apresentassem dificuldade em andar com o calcanhar atribuímos esse sinal a retração tendínea do Aquileu. Outra característica importante encontrada na

maioria dos nossos pacientes foi a pseudo-hipertrofia de panturrilhas, corroborando também com vários casos descritos (SAHGAL; SAHGAL, 1977; MASUZUGAWA, *et al.*, 1997; TAJSHARGHI *et al.*, 2003; LAING *et al.*, 2005; TAJSHARGHI *et al.*, 2007; PEGORARO *et al.*, 2007).

Ademais, os pacientes descritos catalogados com miopatia de armazenamento de miosina, bem como a família aqui relatada apresentaram características clínicas físicas semelhantes como escápula alada, escoliose e hiperlordose (MASUZUGAWA, *et al.*, 1997; LAING *et al.*, 2005). Ainda, o que chamou a atenção foi a observação de baqueteamento digital e unhas em vidro de relógio em nossos pacientes, estas características não foram relatadas em literatura até o momento. O baqueteamento digital, ou hipocratismo digital está associado a doenças cardiológicas, pulmonares, hepáticas podendo também ser congênita (MACEDO, *et al.*, 2004). Marcha anserina também foi observada em quatro dos nossos pacientes, sendo um achado comum reportado em outros estudos (CEUTERIK; MARTIN; MARTENS, 1993; BAROHN; BRUMBACK; MENDELL, 1994; MASUZUGAWA, *et al.*, 1997; TAJSHARGHI *et al.*, 2003; ONENGUT, *et al.*, 2004; LAING *et al.*, 2005; PEGORARO *et al.*, 2007; STALPERS, *et al.*, 2011). Contudo, é importante destacar que há variabilidade clínica e de evolução entre pacientes da mesma família conforme relatam os estudos de Bohlega *et al.* (2003) e Pegoraro *et al.* (2007).

A dosagem do nível de CPK na maioria dos nossos pacientes apresentou-se elevada entre 2 até 6 vezes o limite da normalidade corroborando com vários casos descritos até o momento (TAJSHARGHI *et al.*, 2003; ONENGUT, *et al.*, 2004; RAFAY; HALLIDAY; BRIL, 2005; SHINGDE, *et al.*, 2006; TAJSHARGHI *et al.*, 2007).

A eletromiografia de agulha nos pacientes estudados está em acordo com as descrições da literatura para miopatia de armazenamento de miosina apresentando um padrão miopático na maioria dos casos (TAJSHARGHI *et al.*, 2003; ONENGUT, *et al.*, 2004; TAJSHARGHI *et al.*, 2007; KINPHUTH *et al.*, 2010; MAMELONA, *et al.*, 2019). Os estudos de condução nervosa foram normais em todos os pacientes investigados na literatura assim como em nossos pacientes (SAHGAL; SAHGAL, 1977; BAROHN; BRUMBACK; MENDELL, 1994; MASUZUGAWA, *et al.*, 1997; LAING *et al.*, 2005).

Na nossa amostra, 3 pacientes apresentaram alterações eletrocardiográficas relevantes. Um deles apresentou sobrecarga ventricular esquerda e desvio do eixo elétrico do coração para a direita, outro paciente também demonstrou sobrecarga ventricular esquerda pelo índice de Sokolow-Lyon e outro apenas um distúrbio de condução do ramo direito do feixe de His. As alterações observadas já foram relatadas por Tajsharghi *et al.* (2003) e por Uro-coste *et al.* (2009), que evidenciaram hipertrofia ventricular esquerda, desvio do eixo elétrico para a direita e alterações na condução do ramo direito do feixe de His. Na nossa amostra não foram observados pacientes com alterações na condução do ramo esquerdo do feixe de His ou outras arritmias cardíacas, como demonstrado por Laing *et al.* (2005) e Pegoraro *et al.* (2007).

Em relação às alterações ecocardiográficas, quatro dos seis pacientes estudados apresentaram *strain* longitudinal global do VE alterado, o que sugere disfunção sistólica precoce do VE, dado ainda não relatado na literatura. Porém, nenhum paciente apresentou disfunção sistólica franca, ou seja, fração de ejeção do VE esquerdo reduzida, como observado por Onengut *et al.* (2004) e Uro-coste *et al.* (2009) e Stalpers *et al.* (2011). Um dos pacientes da nossa amostra apresentou hipertrofia ventricular excêntrica, achado frequente relatado pela literatura, e fração de ejeção do VE limítrofe. Outros achados observados por outros autores, como dilatações cavitárias e hipertrabeculação do VE, não estiveram presentes nos pacientes da nossa amostra.

A investigação respiratória revelou distúrbio ventilatório restritivo em todos os pacientes do nosso estudo. Embora tenha sido feito apenas a mensuração da capacidade vital forçada em nossos pacientes podemos, de forma mais abrangente, correlacionar com alguns estudos da literatura. Quanto à gravidade, um deles apresentou distúrbio ventilatório restritivo leve, semelhante ao estudo de Stalpers *et al.* (2011) que relatou capacidade vital forçada de 70% e volume expiratório forçado de 82% dos valores normais. Além disso, os estudos de Pegoraro *et al.* (2007) e Kinphuth *et al.* (2010) não apresentaram alterações. Três dos nossos pacientes apresentaram a forma moderada, semelhante ao estudo de Shingde *et al.* (2007) que relatou fraqueza muscular respiratória em um dos pacientes, sendo que o teste de função respiratória apresentou pressão inspiratória e expiratória máxima de 113%

e 58% respectivamente do previsto. Dois pacientes apresentaram distúrbio ventilatório restritivo grave (46% e 50% do previsto) assim como no estudo de Mamelona *et al.* (2019) em que a CVF foi de 27% e VEF de 29% dos valores normais.

A ressonância magnética é o método de imagem que permite, por meio das diferentes sequências de pulso, avaliar anatomicamente e funcionalmente o tecido muscular com excelente contraste entre o músculo e as partes moles adjacentes (HARTMANN; RODRIGUES, 2014). Considerando esses benefícios, nossa paciente realizou o estudo por ressonância magnética do corpo inteiro, possibilitando inclusive a identificação da distribuição e simetria dos achados. Na literatura observamos que poucos estudos realizaram o exame de imagem por ressonância magnética como os de Li *et al.* (2018), Kinphuth *et al.* (2010) e o de Pegoraro *et al.* (2007).

As sequências sensíveis ao líquido (STIR) adquiridas no estudo por ressonância magnética da nossa paciente mostraram sinais de leve edema muscular nas cinturas pélvica e escapular, tênue edema nos ventres musculares do terço distal dos antebraços, edema nos ventres musculares dos compartimentos anteriores das coxas e nas pernas. Contudo, foi na ponderação T1 que observamos as alterações mais significativas do nosso caso. Enquanto o estudo de Kinphuth *et al.* (2010) relatou a atrofia e lipossustituição do músculo gastrocnêmio como seu principal achado, nosso estudo, que contemplou o corpo todo, demonstrou sinais de atrofia e lipossustituição na cintura pélvica (sobretudo dos glúteos máximos), nas coxas (sobretudo no compartimento posterior) e nas pernas (sobretudo nos gastrocnêmios).

Na biópsia muscular os corpos hialinos presentes na periferia das fibras musculares em nossos pacientes são coerentes com relatos anteriores. Os corpos hialinos apresentam coloração eosinofílica em HE e verde claro em TG, são reativos ou moderadamente reativos para a ATPase ácida e não reativos para NADH-TR compatível com as descrições da literatura (CANCILLA, *et al.*, 1971; ENGEL; BAKER, 1986; BOHLEGA *etal.* 2003; DUBOWITZ; OLDFORDS; SEWRY, 2013). Algumas características permitem diferenciar a miopatia de armazenamento de miosina da miopatia congênita de *Cap*, visto que ambas apresentam estruturas

semelhantes localizadas na periferia das fibras musculares. Na miopatia congênita de *Cap* essas estruturas subsarcolemais estão presentes predominantemente nas fibras tipo 1, embora também tenham sido encontradas nas fibras tipo 2 (LEHTOKARI, *et al.*, 2007), em contrapartida, na miopatia de armazenamento de miosina essas estruturas são encontradas exclusivamente nas fibras musculares tipo 1 (DUBOWITZ; OLDFORDS; SEWRY, 2013). Além disso, há diferenças nas reações histoquímicas que permitem o diagnóstico diferencial. Na miopatia congênita de *Cap* a maioria dos estudos relata intensa reatividade para NADH-TR e ausência de reatividade para ATPase (FIDZIANSKA, 2002; CUISSET *et al.*, 2006; OHLSSON *et al.*, 2008). No entanto, o estudo de Lehtokari, *et al.* (2007) relatou ausência de reatividade para NADH-TR e fracamente reativa em ATPase. Todavia, na miopatia de armazenamento de miosina, os corpos hialinos na maioria dos casos são reativos a ATPase ácida, indicando acúmulo de miosina (TAJSHARGHI *et al.*, 2003; PEGORARO *et al.*, 2007). Porém, o estudo de Shingde *et al.*, (2006) relatou um caso em que os corpos hialinos são reativos em ATPase pH 9.4 e não reativos a ATPase 4.3 . Além disso, os corpos hialinos não apresentam reatividade para as enzimas oxidativas, características que contrastam com as *caps* (DUBOWITZ; OLDFORDS; SEWRY, 2013). No que tange ao número de fibras com corpos hialinos, nossos pacientes apresentam 60 e 65% de fibras com corpos hialinos, e, na literatura, os casos publicados apresentam entre 10 e 40% das fibras com corpos hialinos sem correlação com a apresentação clínica da doença (CEUTERIK; MARTIN; MARTENS, 1993; MASUZUGAWA, *et al.*, 1997; RAFAY; HALLIDAY; BRIL, 2005; SHINGDE, *et al.*, 2006).

Neste estudo relatamos mais uma família com 7 membros identificados com miopatia de armazenamento de miosina causada por uma mutação de herança autossômica dominante no gene *MYH7*, como também ocorreu nas famílias descritas por Masuzugawa, *et al.* (1997), Bohlega *etal.* (2003) e Tajsharghi *et al.* (2003). O gene *MYH7*, fornece as informações necessárias para codificar uma proteína chamada cadeia pesada beta (β)-miosina. Essa proteína constitui os filamentos grossos do sarcômero e é encontrada no músculo cardíaco e nas fibras musculares esqueléticas do tipo 1 (TAJSHARGHI, *et.al.*, 2003). Os músculos esqueléticos resistentes à fadiga são constituídos principalmente de fibras musculares do tipo 1, nesse sentido, os músculos envolvidos na postura, como por

exemplo, o músculo do pescoço que permite manter a cabeça firme é composto predominantemente de fibras tipo 1, e, dessa maneira, considerando a fraqueza proximal e axial dos nossos casos, a mutação neste gene poderia explicar os fenótipos clínicos de nossos pacientes. Ademais, o estudo de Jandreski, *et al.*, (1987) revelou uma expressão acentuada da cadeia pesada beta (β)-miosina no músculo sóleo que também é rico em fibras musculares do tipo 1.

A mutação detectada Arg1845Trp promove a substituição de um aminoácido arginina pelo aminoácido triptofano na posição 1845 da proteína *MYH7*. Neste tipo de mutação há a alteração em um único nucleotídeo, que confere a mudança de um aminoácido e consequente alteração da proteína. Armel e Leinwand (2009) realizaram um estudo sobre os efeitos funcionais de mutações no gene *MYH7*, incluindo a mutação identificada em nosso estudo, e verificaram que a mutação conferiu a formação de filamentos maiores em tamanho e mais resistentes a degradação, o qual poderia resultar na formação inadequada de filamentos, gerando doenças musculares.

Mutações no gene *MYH7* estão relacionadas também a outros fenótipos: miopatia distal de Laing (OMIM 160500), forma miopática da síndrome escápulo-peroneal (OMIM 181430) cardiomiopatia hipertrófica 1 (OMIM 192600); cardiomiopatia dilatada 1S (OMIM 613426) e não-compactação ventricular 5 (OMIM 613426). As doenças relacionadas ao gene *MYH7* vêm crescendo significativamente como um importante grupo, no qual, as características clínicas, histopatológicas e moleculares são variáveis. É importante destacar que éxons codificadores das regiões mais proximais da proteína são a causa da cardiomiopatia hipertrófica, em contrapartida, os éxons codificadores das porções distais (cauda) têm sido associadas a várias miopatias esqueléticas que podem acometer ou não a função cardíaca, incluindo a miopatia de armazenamento de miosina e miopatia distal de Laing (VISWANATHAN, *et al.*, 2017).

Até o momento oito mutações foram associadas a miopatia de armazenamento de miosina R1845W, H1901L, L1793P, E1883K, L1779P, X1936W K1784del e R1820W (VISWANATHAN, *et al.*, 2017). A mutação R1845W ou p.Arg1845Trp que foi identificada em nossos pacientes foi a primeira causa genética determinada para essa doença (TAJSHARGHI, *et al.*, 2003). Desde então, outros

estudos também identificaram a mesma mutação em pacientes com fenótipo semelhante (LAING *et al.*, 2005; SHINGDE, *et al.*, 2006; KINPHUTH *et al.*, 2010).

Contudo, pode-se observar a heterogeneidade genética, assim, as diferentes mutações que resultam no fenótipo histológico não é bem compreendida. As limitações do nosso estudo compreendem o número relativamente pequeno de casos e a impossibilidade da realização da imunohistoquímica e microscopia eletrônica pela limitação da técnica e indisponibilidade dos pacientes, a qual não foi possível durante a pesquisa. Por fim, uma variedade de mutações resultam no fenótipo histológico da miopatia de armazenamento de miosina, assim mais estudos são necessários para entender os mecanismos dessa doença.

8 CONCLUSÕES

Este estudo apresenta uma única família com miopatia de armazenamento de miosina. As características clínicas são heterogêneas, encontramos similaridades e divergências com as descrições em literatura. Os nossos pacientes apresentavam fraqueza escapular proeminente, sendo que, algumas descrições da literatura relatam um grupo de miopatia com fraqueza escápulo-peroneal, no entanto, o acometimento distal em nossos pacientes é pouco significativo. Este é o primeiro relatado de baqueteamento digital e unhas em vidro de relógio para essa doença. As características anatomopatológicas são compatíveis com outros estudos. Além disso, esse é um estudo que complementa o estudos anteriores, sendo a miopatia de armazenamento de miosina causada por uma mutação em heterozigose (pArg1845Trp) no gene *MYH7*. Em virtude da apresentação clínica heterogênea desta miopatia e similaridade clínica com outras miopatias, ainda se faz necessário a biópsia muscular para confirmar o diagnóstico, no entanto a pesquisa da mutação no gene *MYH7* pode contribuir e direcionar o diagnóstico. Mais estudos, e maiores são necessários para elucidar o entendimento sobre esse subtipo de miopatia e suas características clínicas, histológicas e moleculares.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMEL, T.Z.; LEINWAND, L.A. Mutations in the β -myosin rod cause myosin storage myopathy via multiple mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences-PNAS**, Colorado, v. 106, n.15, p.6291-6296, Apr.2009. DOI. 10.1073pnas.0900107106.
- BÁNFAI, Z.; HADZSIEV, K.; PÁL, E.; KOMLÓSI, K.; MELEGH, M.; BALIKÓ, L.; MELEGH, B. Novel phenotypic variant in the MYH7 spectrum due to a stop-loss mutation in the C-terminal region: a case report. **BMC Medical Genetics**, Pécs, v. 18, n.105, p. 1-7, Sep. 2017. DOI. 10.1186/s12881-017-0463-y.
- BAROHN, R.J.; BRUMBACK, R.A.; MENDELL, J.R. Hyaline body myopathy. **Neuromuscular Disorders**, Dallas, v. 4, n.3, p. 257-262, May.1994. DOI. 10.1016/0960-8966(94)90027-2.
- BISCIGLIA, M.; MALFATTI, E. Diagnostic des myopathies congénitales. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture*, Bruxelles, v. 33, n. 6, p.260-267, Set/Dec. 2020. DOI. 10.1016/j.jpp.2020.09.007
- BOHLEGA, S.; LACH, B.; MEYER, B.F.; SAID, Y.A.; KAMBOURIS, M.; HOMSI, M. A.; CUPLER, E.J. Autosomal dominant hyaline body myopathy: Clinical variability and pathologic findings. **Neurology**, Riyadh, v.61, n.11, p.1519-1523, Dec. 2003. DOI. 10.1212/01.wnl.0000096022.09887.9d.
- CANCILLA, P.A.; KALYANARAMAN, K.; VERITY, M.A.; MUNSAT, T.; PEARSON, C.M. Familialmyopathy with probable lysis of myofibrils in type I fibers. **Neurology**, v.21, n.6, p. 579–585, Jun. 1971. DOI: 10.1212/wnl.21.6.579.
- CASSANDRINI D.; TROVATO R.; RUBEGNI, A.; LENZI, S.; FIORILLO, S.; BALDACCI, J.; MINETTI, C.; ASTREA, G.; BRUNO, C.; SANTORELLI, F.M; ITALIAN NETWORK ON CONGENITAL MYOPATHIES. Congenital myopathies: clinical phenotypes and new diagnostic tool. **Italian Journal of Pediatrics**, Pisa, v.43, n.101, p.1-16, Nov. 2017. DOI.10.1186/s13052-017-0419-z.
- CEUTERICK, C.; MARTIN, J.J.; MARTENS, C. Hyaline bodies in skeletal muscle of a patient with a mild chronic nonprogressive congenital myopathy. **Clinical Neuropathology**, Antwerp, v.12, n. 2, p.79-83, Mar/Apr. 1993.
- CUISSET, J.M.; MAURAGE C.A.; PELLISSIER, J.F.; BAROIS, A.; URTIZBEREA, J.A.; LAING, N.; TAJSHARGHI H.; VALLÉE L. 'Cap myopathy': Case report of a family. **Neuromuscular Disorders**, France, v.16, n.4, p. 277-281, Mar/Apr. 2006. DOI: 10.1016/j.nmd.2006.01.014.
- D'AMICO, A.; BERTINI, E. Congenital myopathies. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, Roma, v 8, p.73-79, Jan. 2008. DOI:10.1007/s11910-008-0012-3.
- DUBOWITZ, V. Histological and histochemical stains and reactions. **Muscle biopsy: practical approach**. London, p. 19-40, 1985.
- DUBOWITZ, V.; OLDFORDS, A; SEWRY, C.A.**Muscle biopsy: a practical approach**. 4 ed. London, Saunders, 2013.
- DUMITRU, D.; AMATO, A.A.; ZWARS, M. **Eletrodiagnostic medicine**. 2nd ed. Philadelphia: Hanley & Belfus, p. 159-291, 2002.
- ENGEL, A.G.; BANKER, B.Q. **Myology: basic and clinical**. New York, McGraw-Hill, p. 909-1044, 1986.
- FIDZIANSKA, A. "Cap disease"—a failure in the correct muscle fibreformation. **Journal of the Neurological Sciences**. Poland, v.201, n.1-2, p. 27–31, Sep. 2002. DOI:10.1016/s0022-510x(02)00156-9.

HARTMANN, L.C.; RODRIGUES, M.B. **CBR-Musculoesquelético**. Elsevier Brasil, 1ª edição, 1056p, 2014.

HUANG, K.; BI, F-F.; YANG, H. A Systematic Review and Meta-Analysis of the Prevalence of Congenital Myopathy. **Frontiers in Neurology**, Changsha, v.12, n. 761636, p.1-10, Nov. 2021. DOI. 10.3389/fneur.2021.761636.

JANDRESKI, M.A.; SOLE, M.J.; LIEW, C-C. Two different forms of beta myosin heavy chain are expressed in human striated muscle. **Human genetics**, Ontario, v. 77, n.2, p. 127-131, Oct. 1987. DOI. 10.1007/BF00272378.

KIPHUTH, I.C.; NEUEN-JACOB E.; STRUFFERT, T.; WEHNER, M.; WALLEFELD, W.; LAING, N.; SCHRÖDER, R. Myosin storage myopathy: a rare subtype of protein aggregate myopathies. **Fortschritte der Neurologie Psychiatrie**, Erlangen, v. 78, n.4, p. 219-222, Epub. 2010. DOI. 10.1055/s-0029-1245145.

LAING, N.G.; GROOTE, C.C.D; DYE, D.E.; LIYANAGE, K.; DUFF, R.M.; DUBOIS, B., ROBBERECHT, W., SCIOT, R.; MARTIN, J-J.; GOEBEL, H.H. Myosin storage myopathy: slow skeletal myosin (MYH7) mutation in two isolated cases. **Neurology**, Nedlands, v. 64, n.3, p. 527-529, Feb. 2005. DOI. 10.1212/01.WNL.0000150581.37514.30.

LANG, R.M.; BADANO, L.P.; MOR-AVI, V.; AFILALO, J.; ARMSTRONG, A.; ERNANDE, L.; FLACHSKAMPF, F.A.; FOSTER, E.; GOLDSTEIN, S.A.; KUZNETSOVA,T.; LANCELOTTI, P.; MURARU, D.; PICARD, M.H.; RIETZSCHEL, E.R.; RUDSKI, L.; SPENCER, K.T.; TSANG, W.; VOIGT, J-U. Recommendations for Cardiac Chamber Quantification by Echocardiography in Adults: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. **Journal of the american society of echocardiography**, Chicago, v. 28, p.1-39, Jan.2015. DOI. 10.1016/j.echo.2014.10.003.

LEHTOKARI V.L.; GROOTE, C.C.D.; C., JONGHE P.D.; MARTTILA M.; LAING N.G.; PELIN K.; WALLGREN-PETTERSSON C. Cap disease caused by heterozygous deletion of the beta-tropomyosin gene TPM2. **Neuromuscular Disorders**.Antwerpen,v.17, n.6, p.433-442, Jun. 2007. DOI: 10.1016/j.nmd.2007.02.015.

LI, N.; ZHAO, Z.; SHEN, H.; BING, Q.; GUO, X.; HU, J. MYH7 mutation associated with two phenotypes of myopathy. **Neurological Sciences**, Shijiazhuang, v. 39, n.2, p. 333–339, Fev. 2018. DOI: 10.1007/s10072-017-3192-2.

MACEDO, A.G.; FUSARI, V.C.; ALMEIDA, J.R.P.; DINATO, S.L.M.; ROMITI, N. Baqueteamento digital como manifestação inicial de neoplasia pulmonar. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.79, n.4, p. 457-462, Ago. 2004. DOI. 10.1590/S0365-05962004000400007.

MAMELONA, J.; FILICE, L.; OUSSEDIK, Y.; CRAPOULET, N.; OUELLETTE, R.J.; MARRERO, A. A novel missense mutation in the MYH7 gene causes an uncharacteristic phenotype of myosin storage myopathy: a case report. **BMC Medical Genetics**, Moncton, v.20, n.78, p.1-8, May.2019. DOI. 10.1186/s12881-019-0804-0.

MASUZUGAWA, S.; KUZUHARA, S.; NARITA, Y.; NAITO, Y.; TANIGUCHI, A.; IBI, T. Autosomal dominant hyaline body myopathy presenting as scapulooperoneal syndrome: clinical features and muscle pathology. **Neurology**, Tsu, v.48, n.1, p. 253-257, Jan. 1997. DOI. 10.1212/wnl.48.1.253.

MENDELL, J.R.; FLORENCE, J. Manual muscle testing. **Muscle e Nerve**, Columbus, v.13, p.16-20, 1990. 10.1002/mus.880131307.

MORANDI, L.; ANGELINI C.; PRELLE, A.; PINI, A.; GRASSI, B.; BERNARDI, G.; POLITANO, L.; BRUNO, C.; GRANDIS, D.; CUDIA, P.; CITTERIO, A. High plasma creatine kinase: review of the literature and proposal for a diagnostic algorithm. **Neurological Sciences**, Milan, v. 27, n.5, p.303-311, Nov.2006. DOI. 10.1007/s10072-006-0701-0.

OHLSSON, M.; QUIJANO-ROY, S.; DARIN, N.; BROCHIER, G.; LACENE, E.; ÁVILA-SMIRNOW, D.; FARDEAU, M.; OLDFORS, A.; TAJSHARGHI. New morphologic and genetic findings in cap disease associated with beta-tropomyosin (TPM2) mutations. **Neurology**, Goteborg, v. 71, n.23, p. 1896-1901, Dec. 2008. DOI. 10.1212/01.wnl.0000336654.44814.b8.

ONENGÜT, S.; UĞUR, S.A.; KARASOY, H., YÜCEYAR, N.; TOLUN, A. Identification of a locus for an autosomal recessive hyaline body myopathy at chromosome 3p22.2-p21.32. **Neuromuscular Disorders**, Istanbul, v. 14, n.1, p. 4-9. Jan. 2004. DOI. 10.1016/s0960-8966(03)00163-9.

PEGORARO, E.; GAVASSINI, B.F.; BORSATO, C.; MELACINI, P.; VIANELLO, A.; STRAMARE, R.; CENACCHI, G.; ANGELINI, C. *MYH7* gene mutation in myosin storage myopathy and scapulo peroneal myopathy. **Neuromuscular Disorders**, Padova, v.17, n.4, p. 321-329, Apr. 2007. DOI. 10.1016/j.nmd.2007.01.010.

PEREIRA, C.A.C. Espirometria. **Jornal de Pneumologia**, São Paulo, v. 28, n.3, p. 1-82, Out.2002.

PEREIRA, C.A.C.; SATO, T.; RODRIGUES, S.C. Novos valores de referência para espirometria forçada em brasileiros adultos de raça branca. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v. 33, n.4, p. 397-406, Ago. 2007. DOI. 10.1590/S1806-37132007000400008.

RAFAY, M.F.; HALLIDAY, W.; BRIL, V. Hyaline body myopathy: adulthood manifestations. **Canadian Journal of Neurological Sciences**, Toronto, v. 32, n.2, p. 253-256, May. 2005. DOI. 10.1017/s0317167100004078.

SAHGAL, V.; SAHGAL, S. A new congenital myopathy. A Morphological, Cytochemical and Histochemical Study. **Acta Neuropathologica**, Chicago, v.37, p. 225-230, Jan. 1977.

SHINGDE, M.V.; SPRING, P.J.; MAXWELL, A.; WILLS, E.J.; HARPER, C.G.; DYE, D.E.; LAING, N.G.; NORTH, K.N. Myosin storage (hyaline body) myopathy: A case report. **Neuromuscular Disorders**. Sydney, v.16, n.12, p. 882-886, Dec. 2006. DOI: 10.1016/j.nmd.2006.09.001.

STALPERS, X.; VERRIPS, A.; BRAAKHEKKE, J.; LAMMENS, M.; WIJNGAARD, A.V.D.; MOSTERT, A. Scoliosis surgery in a patient with "de novo" myosin storage myopathy. **Neuromuscular Disorders**, Nijmegen, v.21, n.11, p. 812-815, May. 2011. DOI. 10.1016/j.nmd.2011.05.005.

TAJSHARGHI, H.; THORNELL, L-E.; LINDBERG, C.; LINDVALL, B.; HENRIKSSON, K-G.; OLDFORS, A. Myosin storage myopathy associated with a heterozygous missense mutation in MYH7. **Annals of Neurology**, Göteborg, v. 54, n. 4, p. 494-500, Oct. 2003. DOI. 10.1002/ana.10693.

TAJSHARGHI, H.; OLDFORS, A.; MACLEOD, D.P.; SWASH, M. Homozygous mutation in *MYH7* in myosin storage myopathy and cardiomyopathy. **Neurology**, Goteborg, v. 68, n.12, p. 962, Mar.2007. DOI. 10.1212/01.wnl.0000257131.13438.2c.

TAJSHARGHI, H. Thick and Thin Filament Gene Mutations in Striated Muscle Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, Göteborg, v. 9, n.7, p. 1259-1275, Jun. 2008. DOI. 10.3390/ijms9071259.

URO-COSTE, E.; ARNÉ-BES, M-C.; PELLISSIER, J-F.; RICHARD, P.; LEVADE, T.; HEITZ, F.; FIGARELLA-BRANGER, D.; DELISLE, M-B. Striking phenotypic variability in two familial cases of myosin storage myopathy with a MYH7 Leu1793pro mutation. **Neuromuscular Disorders**, Toulouse, v. 19, n.2, p. 163-166, Fev.2009. DOI. 10.1016/j.nmd.2008.11.012.

VISWANATHAN, M.C.; THAM, R.C.; KRONERT, W.A.; SARSOZA, F.; TRUJILLO, A.S.; CAMMARATO, A.; BERNSTEIN, S. I. Myosin storage myopathy mutations yield defective myosin filament assembly in vitro and disrupted myofibrillar structure and function in vivo. **Human Molecular Genetics**, San Diego, v.26, n.24, p. 4799-4813, Dec. 2017. DOI: 10.1093/hmg/ddx359.

WERNECK, L.C. The value of muscle biopsy in Neurology: a study of 290 biopsies. **Revista Brasileira de Clínica e Terapêutica** , v.10, p. 2-24, 1981.

WERNECK, L.C.; LIMA, J.C.G. Muscle biopsy correlated with electromyography: study of 100 cases. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 46, n.2, p.156-165, 1988. DOI. <https://doi.org/10.1590/S0004-282X1988000200006>.

YÜCEYAR, N.; A,1, AYHAN, O.; KARASOY, H.; TOLUN, A. Homozygous MYH7 R1820W mutation results in recessive myosin storage myopathy: Scapuloperoneal and respiratory weakness with dilated cardiomyopathy. **Neuromuscular Disorders**, Istanbul, v. 25, n.4, p. 340-344, Jan. 2015. DOI. 10.1016/j.nmd.2015.01.007.

APÊNDICE 1 – PARÂMETROS AVALIADOS EM PACIENTES COM MIOPATIA DE ARMAZENAMENTO DE MIOSINA

PARÂMETROS AVALIADOS	Paciente I	Paciente II	Paciente III	Paciente IV	Paciente V	Paciente VI	Paciente VII
DADOS DEMOGRÁFICOS							
Sexo							
Idade na avaliação (anos)							
Pais consanguíneos							
Presença de história familiar							
Idade de início dos sintomas (anos)							
Curso da doença							
Sintomas iniciais							
HISTÓRICO NA INFÂNCIA							
Apresentou hipotonia ao nascimento							
Apresentou atraso nos marcos motores							
Apresentou fraqueza muscular na infância							
Apresentou dificuldade de correr na infância							
Apresentou dificuldade em subir escadas							
Apresentava quedas com frequência							
Apresentou distúrbios da marcha							
Apresentou sinal de Gowers							
ACOMETIMENTO MUSCULAR							
Atrofia muscular							
Músculo proximal							
Músculo Distal							
Músculo Axial							
ANORMALIDADES DE MUSCULATURA							
Face alongada							
Palato arqueado							
Face miopática							

continua

--

APÊNDICE 2 - FORÇA MOTORA DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO MODIFICADA DO MEDICAL RESEARCH COUNCIL

MOVIMENTOS AVALIADOS	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5	Caso 6	Caso 7
Músculos do pescoço							
Flexores							
Extensores							
Músculos do tronco							
Flexores							
Extensores							
Abdução de ombros							
Adução de ombros							
Flexores de ombros							
Extensores de ombros							
Bíceps							
Tríceps							
Extensores dos punhos							
Flexores dos punhos							
Extensores dos dedos							
Abdução de quadril							
Adução de quadril							
Extensores de quadril							
Flexores de quadril							
Extensores de joelho							
Flexores de joelho							
Dorsoflexão dos tornozelos							
Dorsoflexão dos pés							

ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO PARA USO DE IMAGENS (FOTOS E VÍDEOS)

Eu, _____, AUTORIZO a responsável pelo projeto ROSANA HERMINIA SCOLA e pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, autores da pesquisa intitulada: Estudo clínico, histopatológico e molecular na Miopatia de Armazenamento de Miosina a fixar, armazenar e exibir a minha imagem com o fim específico de inseri-la nas informações que serão geradas na pesquisa, aqui citada, e em outras publicações dela decorrentes, quais sejam: dissertações, revistas científicas, congressos e jornais.

A presente autorização abrange, exclusivamente, o uso de minha imagem para os fins aqui estabelecidos e deverá sempre preservar o meu anonimato. Qualquer outra forma de utilização e/ou reprodução deverá ser por mim autorizada.

Curitiba ,

Assinatura do participante da pesquisa

Assinatura do pesquisador responsável