

LAÍS REGINA ROCHA DE CARVALHO



**ESTUDO DE 43 PACIENTES  
COM ATROFIA MUSCULAR ESPINHAL  
E SEU DIAGNÓSTICO MOLECULAR**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna do Departamento de Clínica Médica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

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

CURITIBA  
2003

LAÍS REGINA ROCHA DE CARVALHO

**ESTUDO DE 43 PACIENTES  
COM ATROFIA MUSCULAR ESPINHAL  
E SEU DIAGNÓSTICO MOLECULAR**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna do Departamento de Clínica Médica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

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

CURITIBA  
2003

Carvalho, Lais Regina Rocha de

Estudo de 43 pacientes com atrofia muscular espinhal e seu diagnóstico molecular – Curitiba, 2003

xii, 107 folhas

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná

1 Atrofia muscular espinhal 2 Doenças neuromusculares I Título



Ministério da Educação  
Universidade Federal do Paraná  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna  
= Mestrado e Doutorado =

## PARECER

**PARECER CONJUNTO** dos Professores **Dr. Wilson Marques Júnior, Dr. Lineu César Werneck e Dra. Rosana Herminia Scola**, sobre a Dissertação de Mestrado em Medicina Interna da Universidade Federal do Paraná, elaborada por **Lais Regina Rocha de Carvalho**, intitulada: **“ESTUDO DE 43 PACIENTES COM ATROFIA MUSCULAR ESPINHAL E O SEU DIAGNÓSTICO MOLECULAR”**. A Banca Examinadora considerou que **Lais Regina Rocha de Carvalho**, apresentou trabalho adequado para Dissertação de Mestrado e o defendeu com segurança e propriedade nas argüições que lhe foram feitas, atribuindo-lhe: **Conceito "A"**, correspondente ao **Grau "40"**, sendo pois unanimemente recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **MESTRE**, conferido pelo **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA INTERNA - MESTRADO** e a publicação da Dissertação em veículo de divulgação conveniente, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das argüições.

Curitiba, 25 de agosto de 2003.

  
Professor **Dr. Wilson Marques Júnior**

  
Professor **Dr. Lineu César Werneck**

  
Professora **Dra. Rosana Herminia Scola**

*Jesus ainda estava falando, quando chegaram alguns empregados da casa de Jairo e disseram:*

- *Seu Jairo, a menina já morreu. Por que aborrecer o Mestre?*
- *Mas Jesus não se importou com a notícia e disse a Jairo:*
- *Não tenha medo; tenha fé!*

*Quando entraram na casa de Jairo, Ele encontrou ali uma confusão geral e viu todos chorando alto e gritando. Então disse:*

- *Por que tanto choro e confusão? A menina não morreu; ela está dormindo.*

*Então todos começaram a caçoar dele. Mas Jesus mandou que todos saíssem e, junto com os três discípulos e os pais da menina, entrou no quarto onde ela estava. Pegou-a pela mão e disse:*

- *Talita cumi! (Menina, levante-se!)*

*No mesmo instante, a menina, que tinha doze anos, levantou-se e começou a andar. E todos ficaram muito admirados.*

*Bíblia – Marcos 5:35-42*

Certamente pude observar essa mesma situação algumas vezes em minha vida profissional, e tenho certeza de que não sou a única. Pacientes que desenganamos para nós mesmos e que, inexplicavelmente, nos surpreenderam da mesma maneira. E nós ficamos admirados.

Aos meus irmãos, Patrick e Edward, e em especial aos meus queridos pais, José Gastão e Soeli, eternos companheiros, que sempre me apoiaram nas horas mais difíceis, guiando-me na direção mais correta, com paciência, dedicação, respeito, humildade e força.

## AGRADECIMENTOS

Aos **Professores Dr. Lineu César Werneck e Dr.<sup>a</sup> Rosana Herminia Scola**, pelo estímulo, paciência, confiança e fraternidade que tiveram comigo;

Aos amigos **Maurício César Werneck, Aline Andrade Freund, Nyvia Milicio Coblinski Hrysay e Eunice Rechetelo**, pelo aconselhamento e suporte técnico na realização do estudo;

À **Dr.<sup>a</sup> Noemi Farah Pereira**, que me introduziu no universo da biologia molecular muito antes de eu iniciar este trabalho;

Aos amigos **Vitor Last Pintarelli, Carlos Andrea e Rúbia Fátima Fiuzza**, pela ajuda inestimável na execução da dissertação;

Aos **Doutores José Weniger, José Leon Zindeluk, Arnaldo Beraldi, Gilberto Pascolat e Maurício Marcondes Ribas**, que, muito mais do que excelente formação profissional, ensinaram-me a ter respeito, amor e compaixão pelo próximo, virtudes que podem ser atribuídas a toda a equipe de Pediatria do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba;

Aos **Doutores Sérgio Antônio Antoniuk e Isac Bruck**, responsáveis por importantes passos na minha jornada;

A todos os meus queridos amigos e amigas, e aos demais familiares, que, nas horas difíceis, souberam ensinar-me o valor da união, respeito e amizade, acolhendo-me em seus corações.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE APÊNDICE E ANEXOS</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	2
2.1 HISTÓRICO.....	2
2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	4
2.3 CLASSIFICAÇÃO .....	4
2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS .....	6
2.4.1 AME Tipo I .....	6
2.4.2 AME Tipo II .....	7
2.4.3 AME Tipo III .....	9
2.4.4 AME Tipo IV .....	9
2.5 VARIANTES CLÍNICAS DA AME .....	10
2.5.1 Doença das Células do Corno Anterior com Hipoplasia Pontocerebelar .....	10
2.5.2 Doença das Células do Corno Anterior com Fraturas Congênitas .....	11
2.5.3 Doença das Células do Corno Anterior com Insuficiência Respiratória Precoce .....	11
2.5.4 Doença das Células do Corno Anterior com Deficiência Cardíaca Congênita .....	11
2.5.5 Doença das Células do Corno Anterior com Artropose .....	12
2.6 Exames Complementares .....	12
2.6.1 Eletroneuromiografia .....	12
2.6.1.1 AME tipo I .....	12
2.6.1.2 AME tipo II e AME tipo III .....	14
2.6.2 Biópsia Muscular .....	15
2.6.2.1 AME tipo I .....	15
2.6.2.2 AME tipo II e AME tipo III .....	15
2.6.3 Exame Anatomopatológico da Medula Espinhal .....	16
2.6.4 Exames Laboratoriais .....	16
2.7 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL .....	16
2.8 PROGNÓSTICO .....	17
<b>3 FATORES GENÉTICOS</b> .....	18
3.1 SMN .....	18
3.2 NAIP .....	23
3.3 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE .....	24
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	26
<b>5 CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	27
5.1 CASUÍSTICA .....	27
5.2 CLASSIFICAÇÃO .....	27
5.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS .....	28
5.4 ESCALA FUNCIONAL DE VIGNOS E ARCHIBALD .....	31
5.5 ENZIMAS MUSCULARES .....	32
5.6 ELETRONEUROMIGRAFIA .....	33

5.7 BIÓPSIA MUSCULAR .....	34
5.8 GRUPO DE CONTROLE .....	39
5.9 MÉTODOS .....	39
5.9.1 Extração de DNA da Biópsia Muscular .....	39
5.9.2 Quantificação dos DNAs Extraídos das Biópsias .....	40
5.9.3 Técnica de Amplificação .....	40
5.9.4 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida .....	41
5.9.5 Coloração com Nitrato de Prata .....	41
5.9.6 Revelação .....	41
5.9.7 Fixação .....	42
<b>6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>44</b>
<b>7 RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
7.1 ANÁLISE DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR .....	45
7.1.1 NAIP .....	45
7.1.2 SMN .....	45
7.2 ANÁLISE ENTRE DIAGNÓSTICO MOLECULAR E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS .....	47
7.3 ANÁLISE ENTRE DIAGNÓSTICO MOLECULAR E DOSAGENS ENZIMÁTICAS .....	48
7.4 ANÁLISE ENTRE DIAGNÓSTICO MOLECULAR E ENMG .....	48
7.5 ANÁLISE ENTRE DIAGNÓSTICO MOLECULAR E BIÓPSIAS MUSCULARES .....	49
7.6 GRUPO DE CONTROLE .....	51
<b>8 DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
8.1 DIAGNÓSTICO MOLECULAR .....	52
8.1.1 NAIP .....	52
8.1.2 SMN .....	54
8.2 ASPECTOS CLÍNICOS .....	56
8.3 DOSAGENS ENZIMÁTICAS .....	59
8.4 ELETRONEUROMIOGRAFIA .....	59
8.5 BIÓPSIA MUSCULAR .....	60
<b>9 CONCLUSÕES .....</b>	<b>63</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>64</b>
<b>APÊNDICE E ANEXOS .....</b>	<b>70</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AME</b>	- Atrofia muscular espinhal
<b>CK</b>	- Creatinoquinase
<b>DNA</b>	- Ácido desoxirribonucléico
<b>EMG</b>	- Eletromiografia
<b>ENMG</b>	- Eletroneuromiografia
<b>LDH</b>	- Desidrogenase láctica
<b>NAIP</b>	- Proteína inibidora da apoptose neuronal
<b>PAMC</b>	- Potencial de ação muscular composto
<b>PAUM</b>	- Potenciais de ação da unidade motora
<b>PCR</b>	- Reação em cadeia da polimerase
<b>SIP1</b>	- Proteína 1 de interação com SMN
<b>SMN</b>	- Proteína de sobrevivência do neurônio motor
<b>SNC</b>	- Sistema nervoso central
<b>snRNP</b>	- Ribonucleoproteínas nucleares de pequeno tamanho
<b>TGO</b>	- transaminase glutâmica oxalacética
<b>TGP</b>	- transaminase glutâmica pirúvica

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do SMN1 e do SMN2.....	22
Figura 2 - Fascículos de fibras atroficas ao lado de fascículos de fibras hipertróficas. Hematoxilina-Eosina, barra = 50µm (caso 7).....	37
Figura 3 - Fibras musculares hipertróficas entremeadas entre fibras atroficas arredondadas. Hematoxilina-Eosina, barra = 50µm. (caso 8).....	37
Figura 4 - Fibras musculares hipertróficas entremeadas entre fibras atroficas arredondadas. Hematoxilina-Eosina, barra = 50µm (caso 7).....	38
Figura 5 - Hipertrofia de fibras tipo 2, fibras em segmentação, atrofia de fascículos de fibras, agrupamentos de fibras tipo 1 e 2. ATPase pH 9,4, barra = 50µm (caso 7).....	38
Figura 6 - PCR para pesquisa do NAIP (éxon 5).....	43
Figura 7 - PCR para pesquisa do NAIP (éxon 5) e SMN (éxons 7 e 8).....	43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Doenças primárias do neurônio motor inferior (GOMES, 1994) .....	5
Tabela 2 -	Classificação da Atrofia Muscular Espinhal (ZERRES, 1997) .....	5
Tabela 3 -	Número de pacientes para cada tipo de AME, distribuição conforme o sexo, idade de início e tempo de seguimento em cada grupo .....	28
Tabela 4 -	Dados obtidos na anamnese dos pacientes com AME .....	28
Tabela 5 -	Dados referentes às anormalidades dos reflexos profundos e superficiais nos pacientes com AME .....	29
Tabela 6 -	Dados referentes às anormalidades da força muscular nos pacientes com AME .....	29
Tabela 7 -	Análise descritiva entre desenvolvimento motor e idade de início em cada etapa .....	30
Tabela 8 -	Escala de Vignos e Archibald (VIGNOS, 1963) .....	31
Tabela 9 -	Frequência por grau na escala de Vignos .....	31
Tabela 10 -	Frequência de pacientes com dosagens de enzimas musculares aumentadas em cada grupo .....	32
Tabela 11 -	Definições diagnósticas empregadas na determinação do padrão ENMG .....	33
Tabela 12 -	Resultados do estudo com eletroneuromiografia em cada paciente .....	34
Tabela 13 -	Diagnósticos anatomopatológicos finais estipulados em cada paciente .....	35
Tabela 14 -	Resultados anatomopatológicos nos pacientes com AME .....	36
Tabela 15 -	Relação dos dados clínicos e exames complementares com o diagnóstico molecular .....	46
Tabela 16 -	Relação entre o diagnóstico molecular, dados demográficos e aspectos clínicos .....	47
Tabela 17 -	Relação entre o diagnóstico molecular e as dosagens enzimáticas aumentadas .....	48
Tabela 18 -	Relação entre o diagnóstico molecular e os resultados da eletroneuromiografia .....	48

Tabela 19 -	Relação entre o diagnóstico molecular e os resultados da biópsia muscular .....	49
Tabela 20 -	Relação entre os achados de biópsia muscular com o diagnóstico molecular .....	50
Tabela 21 -	Grupo de controle e seus diagnósticos .....	51

## LISTA DE APÊNDICE E ANEXOS

Apêndice -	Protocolo de pesquisa para a revisão de prontuários dos pacientes .....	71
Anexo 1 -	Resultados das dosagens enzimáticas em cada paciente .....	73
Anexo 2 -	Estudo da condução nervosa motora (CNM) em 16 pacientes com AME .....	75
Anexo 3 -	Estudo da condução nervosa sensitiva (CNS) em 16 pacientes com AME .....	78
Anexo 4 -	Estudo da eletromiografia (EMG) em 16 pacientes com AME .....	81
Anexo 5 -	Técnica empregada na realização das biópsias musculares .....	90
Anexo 6 -	Resultados anatomopatológicos nos pacientes com AME do tipo I .....	92
Anexo 7 -	Resultados anatomopatológicos nos pacientes com AME do tipo II .....	94
Anexo 8 -	Resultados anatomopatológicos nos pacientes com AME do tipo IIIa .....	96
Anexo 9 -	Resultados anatomopatológicos nos pacientes com AME do tipo IIIb .....	98
Anexo 10 -	Oligonucleotídeos utilizados para a pesquisa do NAIP e do SMN.....	100
Anexo 11 -	Quantidade calculada para cada éxon a ser empregada na PCR .....	102
Anexo 12 -	Achados de concentração e pureza das respectivas amostras suscetíveis ao diagnóstico molecular .....	104
Anexo 13 -	Fórmulas das soluções da PCR .....	106

## RESUMO

A atrofia muscular espinhal é uma doença degenerativa das células do corno anterior da medula, com quatro tipos descritos (I, II, IIIa/b, IV). Somente os tipos I, II, IIIa e IIIb apresentam comprometimento do cromossomo 5q13, em que dois genes são os causadores da doença: o primeiro codifica a proteína de sobrevivência do neurônio motor (SMN) e o segundo codifica a proteína inibidora da apoptose neuronal (NAIP). Há deleção dos éxons 7 e 8 em mais de 90% dos casos, ambos envolvidos na codificação do SMN. A deleção do éxon 5, envolvido na codificação do NAIP, ocorre em 45% a 70% dos pacientes com atrofia muscular espinhal tipo I, e em menos de 20% dos casos tipo II e III. Com o propósito de desenvolver e introduzir o diagnóstico molecular nas investigações de rotina da atrofia muscular espinhal, selecionaram-se 43 pacientes com diagnóstico já estabelecido de atrofia muscular espinhal, baseando-se no quadro clínico, dosagens enzimáticas, resultados de biópsia muscular e eletromiografia. Pesquisou-se a deleção dos éxons envolvidos no DNA extraído de biópsias musculares através da análise por reação em cadeia da polimerase. Relacionaram-se os resultados com os respectivos pacientes, por meio de dados de anamnese, exame físico, achados de biópsia muscular e eletroneuromiografia. Nove pacientes foram classificados como tendo atrofia muscular espinhal tipo I; quatorze pacientes, como atrofia muscular espinhal tipo II, e 20, como atrofia muscular espinhal tipo III (12 IIIa e 8 IIIb). Nos pacientes com atrofia muscular espinhal tipo I, houve deleção do NAIP em 5 dos 9 casos (55%); naqueles com o tipo II, houve deleção em 3 dos 14 casos (21,4%). Todos os casos considerados como tipo I e II demonstraram deleção simultânea dos éxons 7 e 8. No tipo III, o éxon 5 esteve deletado em 5 dos 20 casos (25%), mas com deleção do éxon 7 em 18 dos 20 pacientes (90%) e do éxon 8 em 19 deles (95%). A deleção do NAIP teve relação estatisticamente significativa com os casos de fraqueza muscular da porção distal dos membros superiores ( $p < 0,05$ ) e com o achado de núcleos internos na biópsia muscular ( $p < 0,05$ ). A deleção do éxon 8 foi estatisticamente significativa na presença de fibras angulares atroficas ( $p < 0,05$ ) e de fibras redondas atroficas dispersas ( $p < 0,05$ ) na biópsia muscular. A biópsia muscular foi condizente com desinervação em 80% dos casos, e a eletromiografia em 88,8%, enquanto que a deleção concomitante dos éxons 7 e 8 esteve presente em 93% dos casos nos três tipos de atrofia muscular espinhal. Há estreita relação entre o diagnóstico clínico e o diagnóstico molecular, corroborando os índices de deleção descritos na literatura. A análise pela reação em cadeia da polimerase, portanto, serve como exame diagnóstico tão seguro e preciso quanto a biópsia muscular e a eletromiografia, além de menos invasiva.

## ABSTRACT

Spinal muscle atrophy results from degeneration of motor neurons in the anterior horn of the spinal cord. There are four clinical types (I, II, IIIa/b, IV), but only three forms (I, II, IIIa and IIIb) were found to be linked to the 5q13 region of chromosome 5, where 2 genes were postulated: one was designated as the Survival Motor Neuron (SMN) gene, and the other as the Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein (NAIP) gene. Deletion of exons 7 and 8 occurs in over 90% of cases, both related to SMN codification. Deletion of exon 5 (related to NAIP gene) occurs in 45% to 70% of type I spinal muscle atrophy patients, and in less than 20% of type II and III patients. The purpose of this study is to develop and to establish molecular research in routine investigation of spinal muscle atrophy. Forty-three patients were included in this study, all of them with previous diagnosis of spinal muscle atrophy, according to their clinical features, muscular enzymes levels, electromyography and anatomopathologic results. The DNA was isolated from muscle biopsies. Polimerase chain reaction (PCR) amplification of SMN exons 7 and 8, and NAIP exon 5 was carried out and to clinical history, physical exam, electromyography and anatomopathologic results. A population of 9 type I, fourteen patients type II and 20 patients type III (12 IIIa and 8 IIIb) was enrolled into this study. Type I spinal muscle atrophy patients presented deletion of exon 5 (NAIP gene) in 5 cases (55%), and type II patients presented this deletion in 3 cases (21,4%). Type I and type II patients showed concomitant deletion of exons 7 and 8 in 100% of cases. In type III patients, exon 5 was deleted in 5 cases (25%), with deletion of exon 7 in 18 patients (90%) and deletion of exon 8 in 19 (95%) of them. Distal impairment of upper limbs was significantly correlated to the cases of NAIP deletion ( $p < 0,05$ ), as to the presence of internal nucleus in muscle biopsy ( $p < 0,05$ ). Deletion of exon 8 was significantly correlated when associated to atrophic angulated fibers ( $p < 0,05$ ) as well to the presence of atrophic dispersed rounded fibers ( $p < 0,05$ ) in muscle biopsy. Muscle biopsy presented with denervation in 80% of cases, and electromyography with the same pattern in 88,8%. Concomitant deletion of exons 7 and 8 occurred in 93% of cases, in all three types of spinal muscle atrophy. Precise identification of deletion by PCR in spinal muscle atrophy patients provides an important diagnostic achievement, which may be considered as good as the muscle biopsy and electromyography, but less invasive.

## 1 INTRODUÇÃO

A atrofia muscular espinhal (AME) é uma das doenças neuromusculares mais comuns da infância, sendo superada somente pela distrofia muscular de Duchenne. Ela também é reconhecida como uma das doenças hereditárias mais fatais de herança autossômica recessiva, ocupando o segundo lugar, logo depois da fibrose cística (ASBURY, 1992).

Há quatro tipos de AME proximal, definidos de acordo com a idade de início e o grau de acometimento: o tipo I (doença de Werdnig–Hoffmann) é o mais grave, com óbito nos primeiros meses de vida; tipo II (forma intermediária ou doença de Dubowitz); o tipo III (doença de Kugelberg- Welande) e o tipo IV (o menos grave, correspondente à forma adulta de AME) (ZERRES, 1997).

O diagnóstico de AME pode ser confirmado por meio de biópsia muscular e eletroneuromiografia (EMG). Ambos são exames complementares invasivos e casualmente podem não demonstrar resultados exatos, havendo a necessidade de repeti-los ou de simplesmente observar a evolução da doença.

LEFEBVRE (1995) e ROY (1995) possibilitaram o diagnóstico molecular da AME ao descobrir os genes causadores da doença, denominados proteína de sobrevivência do neurônio motor (SMN) e proteína inibidora da apoptose neuronal (NAIP).

Com a disponibilidade do diagnóstico molecular, tornou-se viável realizar o presente estudo, proporcionando procedimento bem menos invasivo, além de diagnóstico muito mais preciso, podendo substituir, eventualmente, a necessidade de confirmação pela EMG e biópsia muscular.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 HISTÓRICO

As primeiras descrições de AME datam de 1848, quando ARAN, citado por GOMEZ (1994), relatou o caso de um paciente com 47 anos de idade que apresentava fraqueza muscular progressiva em mãos e membros inferiores. Dois anos mais tarde, com a evolução da doença, foi empregada pela primeira vez a expressão “atrofia muscular progressiva” (GOMEZ, 1994).

Em 1860, LUYSS, citado por GOMEZ (1994), obteve evidências histológicas da degeneração das células do corno anterior da medula espinhal nos casos de atrofia muscular progressiva, fato que foi contestado por DUCHENNE, em 1883. Ele alegava que a lesão primária no caso descrito por ARAN não se localizava nos cornos anteriores da medula, mas era provavelmente de origem periférica (GOMEZ, 1994).

Embora HEUBNER, citado por GOMEZ (1994), tenha recebido os créditos da primeira descrição de atrofia muscular infantil, foi WERDNIG, em 1888, citado por GOMEZ (1994), quem propôs a origem neural da doença em duas publicações clássicas, realizadas nos anos de 1891 e 1894 (GOMEZ, 1994). As descrições eram de dois irmãos com fraqueza muscular proximal cujos sinais iniciaram ao redor dos 10 meses de idade. Ambos apresentavam também ausência dos reflexos tendinosos profundos, sem comprometimento sensorial, nervos cranianos ou anormalidades mentais (GOMEZ, 1994).

Em 1893, HOFFMANN, citado por GOMEZ (1994), descreveu doença semelhante em quatro famílias, denominando então a doença de “atrofia muscular espinhal progressiva e hereditária em crianças” (GOMEZ, 1994).

Todos os casos descritos por WERDNIG e HOFFMANN, citados por GOMEZ (1994), revelaram na autópsia degeneração das células do corno anterior da medula, e desde então a forma infantil de AME é referida como doença de Werdnig–Hoffmann (GOMEZ, 1994).

WOHLFART (1955), KUGELBERG e WELANDER (1956), citados por BUNDEY (1992), descreveram a forma de início tardio, conhecida como AME crônica, em que 21 pacientes foram pesquisados no total, com instalação da doença aos 3 anos de idade ou mais. Posteriormente, DUBOWITZ (1964), citado por BUNDEY (1992), relatou a forma infantil tardia, definida como “doença arrastada de Werdnig–Hoffmann”, “variante de Dubowitz” e até mesmo AME tipo Ib (BUNDEY, 1992).

Durante muitas décadas, contudo, várias formas crônicas da AME foram diagnosticadas de modo equivocado como distrofias musculares, uma vez que as características clínicas são muito similares. Em 1973, PEARN et al., citados por BUNDEY (1992), analisaram 42 irmãos com AME e constataram que, apesar de a amostra ser heterogênea, ela representava, na verdade, uma entidade geneticamente distinta e homogênea. O autor, juntamente com WILSON, citado por BUNDEY (1992), estipulou os seguintes critérios, que, na época, consistiam de fraqueza muscular generalizada acompanhada de hipotonia acentuada, sintomas respiratórios e bulbares, reflexos tendinosos profundos ausentes, fasciculações de língua e/ou membros, tremor de dedos e deformidades esqueléticas (GOMEZ, 1994).

Com o desenvolvimento da pesquisa genética, MELKI et al. (1990) identificaram, em 1990, o cromossomo 5q11.2 – q13.3 como o envolvido na doença; cinco anos mais tarde, dois genes, localizados no mesmo cromossomo, foram relacionados com a AME: o gene de sobrevivência do neurônio motor (*survival motor neuron — SMN*), descrito por LEFEBRVE, e o da proteína inibidora da apoptose neuronal (*neuronal apoptosis–inhibitory protein — NAIP*), descoberto por ROY (LEFEBRVE, 1995; ROY, 1995) .

LEFEBRVE e ROY (1995) foram os primeiros a incorporar o diagnóstico molecular da AME como exame complementar aos convencionais, permitindo o reconhecimento precoce dessa patologia, além de promover método muito menos invasivo.

Atualmente a atrofia muscular espinhal é descrita como uma doença neuromuscular de etiologia autossômica recessiva (MELKI, 1990) associada à degeneração dos neurônios motores alfa. Estes se localizam no corno anterior da medula espinhal, compondo síndrome de neurônio motor inferior. Caracteriza-se, portanto, por fraqueza e atrofia muscular progressiva de distribuição simétrica, proximal, acometendo os músculos voluntários de membros superiores e predominantemente de membros inferiores. O início ocorre em geral na infância, poupando o músculo diafragmático, esfíncter anal e vesical (TALBOT, 1999; ORRELL, 2001).

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA

Dentre as doenças autossômicas recessivas, a AME é reconhecida como a segunda entidade mais fatal, logo depois da fibrose cística. É também uma das patologias neuromusculares mais comuns da infância, sendo superada somente pela distrofia muscular de Duchenne (ASBURY, 1992).

A incidência de AME varia de 1/ 6.000 a 1/ 10.000 nascidos vivos, e o estado de portador corresponde a 1:50 (TSAI, 2001; VRBOVÁ, 2003).

Todas as raças são acometidas, não existe predomínio quanto ao sexo e a sua distribuição é mundial (TALBOT, 1999).

## 2.3 CLASSIFICAÇÃO

Numerosos sistemas de classificação foram propostos para caracterizar as síndromes do neurônio motor inferior, de acordo com o tipo de herança genética, grau de comprometimento muscular e envolvimento concomitante de outras patologias. As

principais classificações das doenças do neurônio motor inferior descritas na literatura baseiam-se no tipo de herança genética das mesmas (GOMEZ, 1994) (Tabela 1).

ZERRES, em 1995, propôs a classificação da AME baseada na idade de início da doença e no desenvolvimento motor alcançado (ZERRES, 1997) (Tabela 2).

Tabela 1 - Doenças primárias do neurônio motor inferior (GOMES, 1994)

Herança autossômica recessiva	
	AME predominantemente proximal
	Aguda, ou AME tipo I (Werdnig–Hoffmann)
	Intermediária, ou AME tipo II
	Crônica, ou AME tipo III (Kugelberg–Welander)
	Paralisia bulbar progressiva da infância
	AME escapuloperoneal
	AME predominantemente distal
Herança autossômica dominante	
	AME predominantemente proximal
	AME escapuloperoneal
	AME facioescapuloumeral
	AME distal
Herança ligada ao X	
	AME proximal ou juvenil bulbar
	AME proximal da adolescência
Doenças esporádicas do neurônio motor inferior	
	AME esporádica
	ELA juvenil

AME = Atrofia Muscular Espinhal; ELA = Esclerose Lateral Amiotrófica

Tabela 2 - Classificação da Atrofia Muscular Espinhal (ZERRES, 1997)

Tipo	Definição
I	Incapaz de sentar-se
II	Capaz de sentar-se, mas incapaz de andar
III	Capaz de andar
	a. Início antes dos 3 anos de vida
	b. Início após 3 anos de vida
IV	Início após os 30 anos de vida

## 2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A AME é uma das únicas doenças que afeta exclusivamente o neurônio motor inferior, tendo como a sua principal apresentação clínica fraqueza e atrofia muscular progressiva, com redução ou ausência dos reflexos tendinosos profundos. Há ausência de sinais piramidais e extrapiramidais, assim como comprometimento sensorial, intelectual ou outro envolvimento do sistema nervoso central (SNC) (DUBOWITZ, 1985; BURGHEES, 1999).

O grau de comprometimento e as outras manifestações clínicas associadas variam em cada tipo de AME, conforme será descrito a seguir.

### 2.4.1 AME Tipo I

Esta forma clínica de AME identifica-se principalmente por fraqueza muscular generalizada, simétrica, proximal, associada à hipotonia global, com predomínio em membros inferiores (MELKI, 1990; WIRTH, 1997; PELLIZZONI, 1999). podendo o paciente adotar a “postura de rã” (ASBURY, 1992).

Os reflexos tendinosos profundos encontram-se reduzidos ou ausentes, mas, em 5% a 7% dos casos, eles podem estar normais e, em 2% dos pacientes, encontram-se aumentados (DUBOWITZ, 1985; BURGHEES, 1999).

De acordo com PEARN e WILSON, a idade de início dos sintomas se dá antes dos 4 meses em 95% dos casos (BUNDEY, 1992). Um terço dos pacientes com AME tipo I apresenta manifestações clínicas da doença antes ou já ao nascimento (THOMAS, 1994), e no restante, o atraso do desenvolvimento motor já pode ser constatado aos 6 meses, associado a disfagia, intenso esforço respiratório durante a amamentação, aspiração freqüente de alimentos e secreções, com choro e sucção debilitados (BUNDEY, 1992).

Os membros superiores tendem a permanecer em rotação externa, com adução dos ombros e semiflexão dos cotovelos. Com menor frequência, pode-se observar tremor fino, rápido e irregular dos quirodáctilos (GOMEZ, 1994).

Os músculos faciais são poupados, assim como o músculo diafragmático, de tal maneira que a respiração é marcada por inspiração paradoxal, com proeminência abdominal seguida de expiração passiva (MELKI, 1990; WIRTH, 1997; PELLIZZONI, 1999).

O tórax é achatado no sentido antero-posterior devido à fraqueza dos músculos intercostais, podendo encontrar-se também *pectus excavatum*. Os músculos extensores cervicais são muito fracos para erguer a cabeça quando o paciente é colocado em decúbito dorsal (GOMEZ, 1994).

Nos estágios mais avançados da doença, a boca permanece entreaberta, como resultado de paralisia dos músculos mastigatórios. Em seguida, o paciente não consegue mais conter a saliva, que escorre pelo canto da boca em razão da paralisia dos músculos da faringe. Há incapacidade para tossir, e o choro se torna inaudível. Nesta situação, a broncoaspiração e as infecções respiratórias tornam-se as principais causas da alta mortalidade (GOMEZ, 1994).

Nessa mesma fase da doença, surgem fasciculações de língua, podendo ser vistas mais facilmente durante o sono, quando há menores chances de serem confundidas com tremores (GOMEZ, 1994). Deformidades esqueléticas são diagnosticadas em 5% a 10% dos casos (THOMAS, 1994).

Geralmente o óbito ocorre por pneumonias de repetição no decorrer do primeiro ano de vida, e mais raramente no segundo ano (GOMEZ, 1994).

#### 2.4.2 AME Tipo II

Forma intermediária da doença, definida arbitrariamente por FRIED e EMERY (1971) como uma entidade clínica com início entre os 3 e 15 meses de vida, e

sobrevida ultrapassando os 4 anos de idade. A fraqueza surge após os 2 meses de vida, com início mais freqüente ao redor dos 6 meses, de maneira mais insidiosa do que a AME tipo I. A fraqueza é generalizada, as extremidades superiores, porém, podem ou não estar acometidas (GOMEZ, 1994).

Os reflexos tendinosos profundos encontram-se reduzidos, com o reflexo patelar ausente, na maioria das vezes. Praticamente todos os pacientes apresentam os reflexos profundos abolidos ao completar 2 anos de vida (GOMEZ, 1994).

A presença de deformidades de coluna, como escoliose, e as contraturas musculares ocorrem nos pacientes mais jovens, enquanto manifestações como tremor postural fino ocorrem nos pacientes de idade mais avançada (BUNDEY, 1992). Os esfíncteres vesical e anal são poupados (MELKI, 1990; WIRTH, 1997; PELLIZZONI, 1999).

As fasciculações são visíveis nos membros superiores e parede torácica, principalmente se a gordura subcutânea não for proeminente. Fasciculações da língua também surgem nos estágios mais avançados da doença (GOMEZ, 1994). Com menor incidência há fraqueza do maxilar inferior e dos músculos faciais, fazendo com que o paciente permaneça com a boca entreaberta e face inexpressiva (GOMEZ, 1994).

Aproximadamente um quarto dos pacientes com AME tipo II consegue se manter na posição sentada. Uma menor proporção de pacientes consegue manter-se em pé com apoio, e nenhum consegue deambular sem suporte (GOMEZ, 1994).

O prognóstico se mantém favorável até que se estabeleça escoliose acentuada secundária ao comprometimento dos músculos intercostais e paraespinhais, prejudicando os movimentos respiratórios. Alguns pacientes conseguem atingir a segunda e até mesmo a terceira década de vida (GOMEZ, 1994).

### 2.4.3 AME Tipo III

A idade de início dos sintomas é ao redor dos 6 meses de vida, e 90% dos pacientes têm manifestação clínica instalada com 3 anos (GOMEZ, 1994). Há fraqueza proximal dos membros inferiores, provocando, nas crianças, atraso do desenvolvimento motor (GOMEZ, 1994). Os pacientes começam a andar sem apoio ao redor dos 3 anos de vida, com queixas de quedas freqüentes e dificuldade para subir escadas. Nesse caso, quando as manifestações clínicas se iniciam antes dos 3 anos, a AME recebe a classificação tipo IIIa; instalando-se depois dos 3 anos, é considerada tipo IIIb (ZERRES, 1997). Há lordose lombar proeminente e abdômen protuberante. A fraqueza dos músculos faciais é observada em torno dos 4 anos de idade, e a inabilidade para fechar a boca ocorre nos estágios mais avançados da doença (GOMEZ, 1994).

A maioria dos pacientes apresenta tremor de mãos e quirodáctilos, fasciculações de língua, dos músculos deltóides e dos músculos da parede torácica. Na medida em que a doença progride, a cintura escapular torna-se comprometida (GOMEZ, 1994). Os reflexos tendinosos profundos estão reduzidos na fase inicial e, posteriormente, são abolidos (GOMEZ, 1994).

Muitos ainda são capazes de se locomover na segunda década de vida, e a sobrevida não se diferencia do restante da população (GOMEZ, 1994).

### 2.4.4 AME Tipo IV

É a forma menos grave da doença, e os primeiros sinais de fraqueza muscular surgem já na fase adulta. A clínica é invariavelmente simétrica, associada à diminuição e ausência dos reflexos tendinosos profundos, hipotonia e fasciculação de língua

(TALBOT, 1999). A sensibilidade é preservada, e os pacientes conseguem deambular por várias décadas após o início dos sintomas (TALBOT, 1999).

## 2.5 VARIANTES CLÍNICAS DA AME

Muitos casos têm sido descritos na literatura como AME infantil. Entretanto, há associação de várias características atípicas como: hipoplasia cerebelar, degeneração pontocerebelar, fraturas múltiplas de ossos longos ao nascimento, paralisia diafragmática com falência respiratória precoce e defeitos cardíacos congênitos. Muitos possuem artrogripose, e alguns autores referem-se a esses pacientes como portadores de uma entidade clínica distinta da AME (BURGHES, 1992). Na seqüência, algumas dessas doenças são descritas:

### 2.5.1 Doença das Células do Corno Anterior com Hipoplasia Pontocerebelar

Diferente da AME tipo I, esses recém-nascidos não são alertas e podem apresentar sinais de envolvimento do neurônio motor superior, múltiplas contraturas das articulações e, na necropsia, observa-se atrofia cerebelar com envolvimento da ponte e medula espinhal (DUBOWITZ, 1995; RUDNIK-SCHÖNEBORN, 1996).

Há evidências de que esta é uma desordem autossômica recessiva não ligada ao cromossomo 5q (BURGHES, 1992; ZERRES, 2003).

### 2.5.2 Doença das Células do Corno Anterior com Fraturas Congênicas

Esta entidade é caracterizada por múltiplas fraturas congênicas situadas nas epífises ou metáfises de ossos longos, associadas a contraturas das grandes articulações.

Podem-se separar aqui duas condições distintas: em algumas famílias, ocorre polidrâmnio, retardo do crescimento intra-útero e hipomineralização óssea, com evidências de que se trata de doença com herança autossômica recessiva; em outros casos, a gestação é normal e o neonato apresenta peso adequado ao nascimento. Essa entidade consiste em herança ligada ao cromossomo X e parece não estar ligada ao cromossomo 5q (BURGHES, 1992; ZERRES, 2003).

### 2.5.3 Doença das Células do Corno Anterior com Insuficiência Respiratória Precoce

Essa doença apresenta-se com estresse respiratório ao nascimento ou durante as primeiras semanas de vida. A fraqueza muscular pode não ser evidente antes dos sinais respiratórios. Contraturas de articulações distais são comuns. Ao exame radiológico, podem-se observar eventrações ou movimentação anormal do diafragma. Os achados de EMG, biópsia muscular e necropsia são similares aos da AME. Essa anormalidade é pouco freqüente e nenhum estudo genético foi relatado ainda (BURGHES, 1992; ZERRES, 2003).

### 2.5.4 Doença das Células do Corno Anterior com Defeitos Cardíacos Congênicos

As malformações cardíacas são muito comuns, ocorrendo em 1% dos nascidos vivos, e os defeitos septais são os mais freqüentes. Assim, a presença de AME e

defeito cardíaco pode representar mera coincidência. A associação dessas duas entidades tem sido observada cuidadosamente em neonatos e esses pacientes parecem possuir outras anormalidades concomitantes, como: artrogripose, estresse respiratório, fraturas ósseas e, nos casos fatais, observa-se anencefalia ou hipoplasia parcial do corpo caloso à necropsia. Assim, muitos autores têm descrito esta sintomatologia como uma entidade específica (BURGHES, 1992; RUDNIK-SCHÖNEBORN, 1996).

### 2.5.5 Doença das Células do Corno Anterior com Artrogripose

A associação de artrogripose com AME do tipo I é rara. A presença de contraturas de múltiplas articulações costuma ser considerada critério de exclusão de AME, mas foi descrita a presença de deleção do gene SMN em crianças com artrogripose e degeneração neuronal (BÜRGLIN, 1996; ZERRES, 2003).

## 2.6 EXAMES COMPLEMENTARES

### 2.6.1 Eletroneuromiografia

#### 2.6.1.1 AME tipo I

Em muitos casos, a EMG é crucial para se estabelecer o diagnóstico de AME na criança, descartando assim outras condições, como distrofias musculares ou outras patologias do sistema nervoso periférico. Contudo, deve-se salientar que, por muitas vezes, tal procedimento pode proporcionar muitas dificuldades diagnósticas quando

realizado nessa faixa etária, pois a falta de cooperação na eletromiografia de agulha (EMG), principalmente na contração voluntária dos músculos, impede a avaliação correta dos potenciais de ação das unidades motoras (BOLTON, 1996).

Como há falha na reinervação dessas formas agudas da doença, os potenciais de ação da unidade motora (PAUM) encontrar-se-ão ausentes na contração voluntária, e o músculo vai sendo substituído por tecido fibroso e adiposo (BOLTON, 1996; GÁLEA, 2001).

Nos primeiros três meses de vida, a EMG pode revelar atividades anormais espontâneas diferentes das verdadeiras fasciculações, que são raras na AME tipo I (GOMEZ, 1994; RENAULT, 1996). Tais atividades são geradas por unidades motoras e disparadas regularmente numa frequência de 5 a 15Hz nos músculos relaxados. Elas persistem durante o sono e podem também ser ativadas por movimentação voluntária.

Aumento da atividade de inserção, potenciais espontâneos como fibrilações e ondas positivas podem surgir e aumentar com a idade, todavia, muitas vezes podem não estar presentes nas fases iniciais, nos casos muito graves. Já o número de potenciais de ação da unidade motora ativados por contração voluntária diminui com a idade. Esses potenciais demonstram amplitude e duração aumentadas, e muitos são polifásicos. Em adicional a grandes unidades motoras, pode existir a concomitância com potenciais polifásicos de baixa amplitude e curta duração (CARPENTER, KARPATI, 2001).

A velocidade de condução nervosa motora encontra-se normal mas pode ser discretamente reduzida nas fases precoces da doença, se comparada aos valores esperados para a idade. Também a amplitude do potencial de ação muscular composto (PAMC) pode estar diminuído. A velocidade de condução nervosa sensitiva encontra-se normal (BARISIC, 1998; CARPENTER, KARPATI, 2001; KRAJEWSKA, 2002).

De qualquer maneira, a avaliação desses resultados deve ser muito cautelosa nessas crianças, pois há relatos de EMG normais na fase inicial da doença, e somente no seguimento é que as alterações típicas de AME se revelaram (BOLTON, 1996).

### 2.6.1.2 AME tipo II e AME tipo III

Nas formas crônicas da AME, a EMG revela diminuição do recrutamento das unidades motoras durante a contração voluntária. Uma grande proporção desses potenciais é polifásico, e a duração média e a amplitude do PAUM estão aumentados entre 2 a 12 mV (LAMBERT, 1981; BOLTON, 1996).

Atividade elétrica espontânea na forma de fibrilação é menos freqüente nas doenças crônicas do corno anterior da medula, talvez pelo fato de que haja extensa reinervação das fibras musculares através de ramificações nervosas provenientes dos neurônios motores sobreviventes. Nos casos mais avançados da doença, há diminuição da atividade de inserção em razão da substituição do tecido muscular por fibrose e gordura (BOLTON, 1996). Se possível, mais de um músculo deve ser testado, dependendo da tolerância do paciente, pois algumas formas de AME podem ter acometimento focal. Por isso, nada impede que alguns resultados se apresentem normais. A dificuldade é maior principalmente no tipo III de AME, pois alguns PAUM podem revelar um padrão “miopático”, isto é, com baixa amplitude e alguns componentes de alta freqüência. No mesmo paciente, vários músculos podem mostrar-se normais, miopáticos ou neuropáticos (BOLTON, 1996).

A velocidade de condução motora pode estar normal, contudo, nos pacientes que apresentem perda neuronal grave, ela pode estar reduzida secundária à depleção de fibras nervosas de condução rápida. Também a amplitude do PAMC pode estar reduzida nos casos mais graves. A velocidade de condução nervosa sensitiva encontra-se normal. Estimulação elétrica repetitiva na freqüência de 5 a 20 Hz dos nervos que suprem os músculos fracos pode mostrar um decremento da amplitude dos seus componentes do potencial de ação (BOLTON, 1996; BARISIC, 1998; KRAJEWSKA, 2002).

## 2.6.2 Biópsia Muscular

### 2.6.2.1 AME tipo I

O exame histológico do músculo na forma aguda demonstra grupos de fibras atroficas, arredondadas, intercaladas com grupos de fibras hipertróficas, as quais são representadas principalmente pelas fibras tipo 1 (DUBOWITZ, 1985; OMRAN, 1998). Não há aumento do tecido conjuntivo perimisial, o que acontece com frequência nas formas crônicas da doença (DUBOWITZ, 1985).

### 2.6.2.2 AME tipo II e AME tipo III

Na biópsia muscular há fibras atroficas que tendem a formar pequenos grupos, ao contrário das formas graves da doença, que demonstram grandes agrupamentos de tipo específico de fibras. Elas não têm o formato tão arredondado como descrito nas formas agudas, mas mostram formato mais variável, podendo haver a presença de fibras anguladas atroficas (DUBOWITZ, 1985).

As fibras hipertróficas são predominantemente do tipo 2, e algumas podem revelar alterações intrínsecas, como degeneração, núcleos internos e divisões (*splitting*) (DUBOWITZ, 1985).

Por algumas vezes, surge dificuldade na diferenciação de AME de outras formas de distrofias musculares leves. Agrupamentos de fibras atroficas são comuns na distrofia muscular de Becker; é importante, porém, analisar o conteúdo da biópsia de uma maneira geral, assim como a distribuição das fibras, pois, na AME, pode haver agrupamento de qualquer tipo de fibra. Já nas distrofias, há predomínio das fibras tipo 1 (DUBOWITZ, 1985).

### 2.6.3 Exame Anatomopatológico da Medula Espinhal

Os cornos anteriores da medula espinhal apresentam destruição dos neurônios motores  $\alpha$ , e perdas similares são vistas nos núcleos motores do tronco encefálico, mas o III, IV e VI pares são poupados (BUNDEY, 1992).

### 2.6.4 Exames Laboratoriais

Não há exames laboratoriais que forneçam um diagnóstico preciso de AME. A dosagem sérica de creatinoquinase (CK) pode estar até 5 vezes aumentada nos casos mais crônicos, e a sua elevação é proporcional à duração da doença (GOMEZ, 1994; RUDNIK-SCHÖNEBORN, 1996). Da mesma maneira, as transaminases, a aldolase e a desidrogenase láctica séricas podem encontrar-se aumentadas na metade dos casos crônicos (GOMEZ, 1994). O líquido cefalorraquidiano demonstra-se normal (GOMEZ, 1994).

Há alguns relatos de outras alterações bioquímicas, como valores anormais de lipoproteínas séricas, diminuição dos níveis de vitamina E, assim como a presença de ácidos dicarboxílicos na urina, principalmente quando coletados em jejum, mas nenhum deles apresentou maior relevância (BUNDEY, 1992).

## 2.7 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Diversas miopatias congênitas são muito similares à AME, todavia, os pacientes portadores desta doença apresentam os músculos intercostais extremamente comprometidos, poupando o músculo diafragma. Como resultado, há deformação

torácica característica concomitante à respiração abdominal, que permite diagnóstico mais fácil de AME. Muitas miopatias também exibem acometimento dos músculos faciais, fato não observado na AME (BURGHES, 1992).

A neuropatia hipomielinizante congênita assemelha-se à doença de Werdnig-Hoffmann, contudo, ela é bem mais rara e os casos descritos são esporádicos. Ao contrário da biópsia muscular, é a EMG que proporciona o diagnóstico, baseado nas velocidades de condução nervosa, as quais demonstram-se reduzidas (BURGHES, 1992).

Deficiência de hexosaminidase dificilmente produz clínica semelhante à AME juvenil, enquanto o tipo adulto desta deficiência é muito raro. O diagnóstico faz-se pela mensuração dos níveis séricos dessa enzima (BURGHES, 1992).

## 2.8 PROGNÓSTICO

A AME é uma entidade de elevada morbidade e mortalidade, de maneira que o prognóstico depende invariavelmente da idade de início (ZERRES, 1997). Se a manifestação clínica ocorrer antes dos 3 meses de idade nos pacientes com AME tipo I, o óbito ocorrerá em aproximadamente 50% dos casos, ao redor dos 7 a 8 meses de vida, e quase todos até os 5 anos. Com a terapia de suporte, porém, muitos pacientes têm superado as expectativas, pois, à medida que a doença evolui, as crianças tornam-se dependentes de ventilação mecânica, podendo sobreviver durante vários anos. Em razão desse fato, as famílias devem estar bem orientadas, antes que a insuficiência respiratória se estabeleça (ASBURY, 1992).

Escoliose é outra complicação comum, por causa da fraqueza muscular proximal, uma vez que os portadores de AME tipo II sobrevivem comumente até a adolescência e vida adulta. Os pacientes com doença de Kugelberg-Welander têm expectativa de vida semelhante ao normal, mas podem falecer precocemente também (BURGHES, 1999).

### 3 FATORES GENÉTICOS

Em 1990, constatou-se que o cromossomo 5q11.2 – 13.3 encontrava-se envolvido na patogênese de três formas de AME (I, II, III) (DEVRIENDT, 1996; ORRELL, 2001; WANG, 2001), e cinco anos mais tarde, dois genes, localizados nesse mesmo cromossomo, foram identificados como os prováveis causadores da doença: o gene da proteína de sobrevivência do neurônio motor (*Survival Motor Neuron* — SMN) e o gene da proteína inibidora da apoptose neuronal (*Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein* — NAIP) (LEWIN, 1995; McANDREW, 1997; CAMPBELL, 1997).

#### 3.1 SMN

Cada cromossomo 5q tem duas cópias invertidas e duplicadas do SMN, ocupando uma região altamente instável, de aproximadamente 500 kb. Cada região contém pelo menos quatro genes: o SMN, o p44, o NAIP e o H4F5. O SMN é um gene pequeno, composto por nove éxons, que ocupam 20 kb de ácido desoxirribonucléico (DNA) genômico. Eles formam um DNA codificador (DNA<sub>C</sub>) de 1,7 kb, responsável pela síntese de uma proteína de 294 aminoácidos, com massa nuclear de 38 kDa. Uma cópia é representada pelo SMN1 (ou SMN telomérico), e outra é o SMN2 (ou SMN centromérico) (BURGHES, 1997; AKUTSU, 2002; ORRELL, 2001).

O SMN1 é o principal gene causador da doença, apresentando deleção ou mutação de ponto em 95% dos casos de AME tipo I, II e III. A AME do tipo IV não apresenta deleção ou mutação deste gene (ZERRES, 1997; VRBOVÁ, 2003). A deleção homozigota do SMN2 também pode acarretar na AME, contudo é descrita com menor frequência (36% dos casos). A sua ocorrência na população normal é ao redor de 5% (ECHANIZ-LAGUNA, 2002; SRIVASTAVA, 2002).

O número de cópias do SMN1 varia muito, e 82% a 96% dos indivíduos normais possuem apenas uma cópia do SMN1, enquanto 4% a 18% dos indivíduos normais mostram duas cópias desse mesmo gene. É tal variabilidade que torna complicado o teste à procura de heterozigotos. A estrutura do SMN1 e a do SMN2 são muito semelhantes, com apenas cinco nucleotídeos diferentes, mas é o SMN1 que produz a estrutura completa da proteína (MERLINI, 2002) (Figura 1).

Ao contrário, na transcrição primária do SMN2, ocorre um encadeamento (*splicing*) alternativo do éxon 7, resultando numa proteína instável do SMN e com terminação C alterada, a qual é responsável pela codificação dos 16 últimos aminoácidos (WANG, 2001; VYAS, 2002). Essa proteína derivada do SMN2 é indubitavelmente insuficiente para prevenir o dano nos neurônios motores. No nível celular, este fato proporciona a morte celular apoptótica nas colunas anteriores da medula espinhal e, conseqüentemente, leva à AME (STRACHAN, READ, 1999; ORRELL, 2001; VRBOVÁ, 2003).

Pesquisas recentes sugerem que a deleção do SMN2 possa estar envolvida com os casos esporádicos de doenças do neurônio motor inferior na fase adulta (ECHANIZ-LAGUNA, 2002).

Apesar de o SMN ser ubíquo no organismo humano, mas principalmente nos cornos anteriores da medula espinhal, não se sabe por que este fato ocorre somente nesta localização, e em particular, como ele não afeta outros tipos celulares e outros tecidos, mesmo com seus níveis reduzidos. Do mesmo modo, a função dessa proteína codificada pelo SMN não é conhecida por completo ainda, mas estudos recentes sugerem o envolvimento dessa proteína na formação de “encadeossomos” (*spliceosomes*) no citoplasma e na regeneração destes no núcleo (STRACHAN, READ, 1999; ORRELL, 2001).

Os éxons 7 e 8 são os que possuem a seqüência de oligonucleotídeos determinantes da doença. Somente deleções homólogas ou mutações do SMN1 resultam no fenótipo da AME, de maneira que os níveis de expressão do SMN são conduzidos pelo SMN2, ou seja, quanto maior a expressão do SMN centromérico (SMN2), menor a gravidade da doença (ORRELL, 2001).

Aproximadamente 98,7% dos pacientes com AME possuem deleção do SMN1 (SOMERVILLE, 1997), índice que se distribui para 95% dos casos de AME tipo I e II, e 80% dos casos de AME tipo III. A mutação espontânea ocorre em 2% dos pacientes (ORRELL, 2001; BURGHESE, 1999).

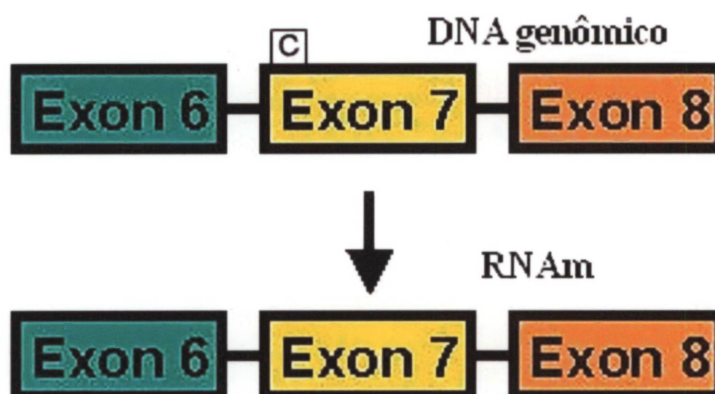
KIM (1999) realizou pesquisa semelhante no Brasil e encontrou deleção do SMN1 (éxon 7, éxon 8 ou ambos) em 69% das famílias estudadas.

Até o presente momento, cogita-se que o SMN seja responsável por 2 funções principais: ele é necessário no encadeamento do pré-RNA mensageiro (RNAm) no núcleo e também está envolvido na linha de montagem das ribonucleoproteínas nucleares de pequeno tamanho (SnRNPs), no citoplasma. Além disso, o SMN compõe um amplo complexo multiproteico. No núcleo, o SMN e as proteínas Geminas 2 (conhecidas também como SIP1 = *SMN interacting protein 1*), 3 e 4 ficam agregados em corpos chamados *gems* (WANG, 2001; CORCIA, 2002; AERBAJINAI, 2002). No citoplasma, este complexo multiproteico inclui também as proteínas Sm, que são componentes da SnRNPs. Uma vez formado este complexo no citoplasma, ele é transportado para dentro do núcleo (TALBOT, 1999; ORRELL, 2001; WANG, 2001). Se a SIP1 estiver diminuída, o mesmo ocorre com o SMN1, e vice-versa, sugerindo que a Gemina 2 seja estabilizada quando ligada ao SMN. A interação de ambos é mediada filogeneticamente pelo terminal N conservado do SMN (WANG, 2001).

A presença de uma só cópia do SMN1 pode indicar estado de portador ou doença. Pacientes com AME ligada ao cromossomo 5q, e que tenham SMN1 presente, são considerados como heterozigotos compostos se forem filhos de pais não consangüíneos. Na verdade, eles apresentam ausência de SMN1 no éxon 7 de um cromossomo 5 e uma pequena mutação no outro alelo. Deste modo, pacientes que apresentem duas cópias do gene do SMN1, onde não haja consangüinidade, não devem ser considerados com o diagnóstico de AME, devendo ser investigados para outras doenças. Isso acarreta o fato de que 3% a 4% dos indivíduos normais têm mais de uma cópia do SMN1 em um cromossomo 5, e apesar de parecer ter um SMN1 completo, na verdade eles são portadores da doença, uma vez que é o outro alelo que está comprometido (ORRELL, 2001; WANG, 2001).

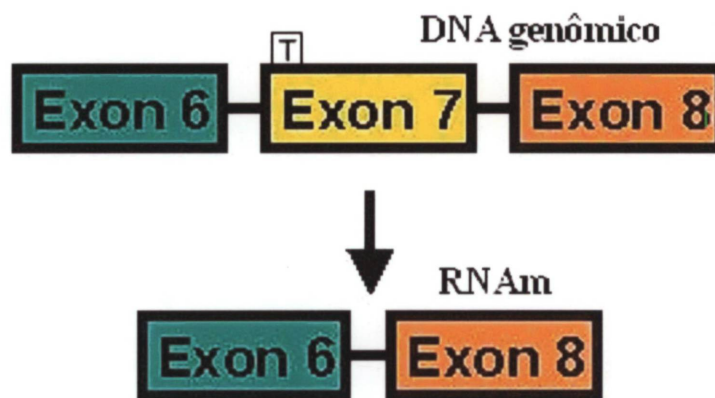
Em aproximadamente 5% dos pacientes com AME, o éxon 7 encontra-se presente, mas com deleção do éxon 8 (GAMBARDELLA, 1998). Deve-se lembrar que os genitores e os descendentes dos doentes têm chance de ter deleção do SMN em 1% dos casos, contudo, eles são assintomáticos (LEFEBVRE, 1995). A deleção concomitante dos dois éxons ocorre em 93% dos casos (BRAHE, 1995). A sensibilidade é estimada em 95% a 97%, e a especificidade, em 96% dos casos. Pesquisas quantitativas do SMN estão sendo realizadas, mas a detecção de heterozigotos permanece limitada (CUSCÓ, 2002).

# SMN1



**RNAm SMN1: codifica a estrutura completa da proteína**

# SMN2



**RNAm SMN2: 80% codifica a proteína do SMN sem o éxon 7.**

Figura 1 - A estrutura do SMN1 e a do SMN2 são muito semelhantes, com apenas cinco nucleotídeos diferentes, mas é somente o SMN1 que produz a estrutura completa da proteína. C: citosina; T: timina; RNAm: RNA mensageiro (MONANI, 2000).

### 3.2 NAIP

Este gene codifica proteína bem maior do que o SMN, de 1 232 aminoácidos (LEWIN, 1995), contudo, ela não é completamente conhecida, a não ser o fato de que é transportada nas raízes anteriores da medula espinhal (BURGHES, 1999). Acredita-se que ela sirva somente como co-fator da doença, não contribuindo muito para a predição do fenótipo. Nos indivíduos normais, ela pode estar deletada em 1% a 2% dos casos (TALBOT, 1999; CAMPBELL, 1997).

Uma das teorias para a patogênese da AME é que a sua deleção acarrete na persistência inapropriada da apoptose dos neurônios motores, o que é um fenômeno fisiológico no organismo em desenvolvimento (NOVELLI, 1997). A AME tipo I apresenta deleções homozigotas em 45% a 67% dos casos (LEWIN, 1995); nos casos de AME tipos II e III, tal índice dificilmente ultrapassa 20% (GAMBARDELLA, 1998). Estima-se, portanto, que os pacientes com deleção homozigota para o NAIP sejam cinco vezes mais propensos a apresentar a AME do tipo I, principalmente no que diz respeito ao sexo feminino, uma vez que há estudos que comprovam a fraca relação do fenótipo com o sexo masculino (NOVELLI, 1997). Além disso, pacientes apresentando AME do tipo I, com deleção do éxon 5, também são muito mais propensos à deleção concomitante do SMN (AKUTSU, 2002; BURGHES, 1999).

Esse fato foi comprovado por KIM (1999), que constatou deleção do éxon 5 em 35% dos pacientes brasileiros com AME tipo I; 16% dos que apresentavam AME tipo II e 2% dos pacientes com AME tipo III, todos com deleção concomitante do SMN.

Outro gene mencionado na AME é o p44, que apresenta deleção em 73% dos casos tipo I, mas esse fato ocorre tanto nos genitores quanto nos controles, não sendo considerado como envolvido na patogênese da doença (BURGHES, 1999).

### 3.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A revolução nos exames abrangendo a genética molecular surgiu na década de 1980, com os primeiros relatos descrevendo uma nova técnica, que permitia a clonagem e análise do DNA, denominada de reação em cadeia da polimerase (PCR). Desde então, ela tem exercido importante função na medicina forense, na pesquisa clínica de várias doenças e no diagnóstico de doenças infectocontagiosas e tumores malignos (EISENSTEIN, 1990; CAMPBELL, FIEDLER, PERSING, 1992; STRACHAN, READ, 1999).

A PCR é um método *in vitro* rápido e versátil para a amplificação de uma seqüência específica de DNA. Essa seqüência é composta geralmente de 15 a 25 nucleotídeos de extensão, que se denominam *primers* ou amplificadores (EISENSTEIN, 1990; CAMPBELL, FIEDLER, PERSING, 1992; STRACHAN, READ, 1999). Os *primers* se ligam ao DNA a ser pesquisado (“DNA-molde desnaturado”) e, por meio de uma enzima DNA-polimerase termoestável associada aos precursores do DNA (os quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatos: adenina, citosina, guanina e timina), eles iniciam a síntese de novas fitas de DNA, que são complementares a cada uma das fitas de DNA do segmento-alvo (EISENSTEIN, 1990; CAMPBELL, FIEDLER, PERSING, 1992; STRACHAN, READ, 1999).

Essas fitas de DNA irão atuar como molde para mais uma síntese de DNA nos ciclos subseqüentes e, depois de cerca de 25 ciclos de síntese de DNA, os produtos da PCR irão conter aproximadamente  $10^5$  cópias da seqüência-alvo específica, uma quantidade que é facilmente visualizada como uma banda distinta de tamanho específico, quando submetida à eletroforese em gel de agarose (EISENSTEIN, 1990; CAMPBELL, FIEDLER, PERSING, 1992; STRACHAN, READ, 1999).

Esses ciclos seqüenciais abrangem três etapas distintas: a desnaturação, tipicamente ao redor de 93 a 95°C para o DNA genômico humano; o pareamento, que ocorre a temperaturas geralmente de cerca de 50°C até 70°C; e a síntese de DNA, em

geral próximo de 70 a 75°C (EISENSTEIN, 1990; CAMPBELL, FIEDLER, PERSING, 1992; STRACHAN, READ, 1999).

As enzimas DNA-polimerases termoestáveis apropriadas têm sido obtidas de microorganismos cujo habitat natural são as fontes quentes. A mais amplamente utilizada é a *Taq* DNApolimerase, obtida de *Thermus aquaticus*. Ela é termoestável até 94°C, com uma temperatura ótima de funcionamento de 80°C (EISENSTEIN, 1990; CAMPBELL, FIEDLER, PERSING, 1992; STRACHAN, READ, 1999).

A PCR, portanto, permite a clonagem de DNA em poucas horas, a partir de quantidades ínfimas de DNA, mesmo que este seja proveniente de material degradado ou de amostras armazenadas a longo prazo (EISENSTEIN, 1990; CAMPBELL, FIEDLER, PERSING, 1992; STRACHAN, READ, 1999).

#### **4 OBJETIVOS**

1) Introduzir, no Serviço de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, o diagnóstico molecular na avaliação dos pacientes com suspeita clínica e laboratorial de atrofia muscular espinhal.

2) Relacionar os resultados do diagnóstico molecular, obtidos nas amostras pesquisadas, com os dados clínicos e os exames complementares convencionais dos respectivos pacientes.

## 5 CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 5.1 CASUÍSTICA

Admitiram-se 220 pacientes com AME no Serviço de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, baseando-se no diagnóstico clínico e exames complementares, no período de janeiro de 1977 a dezembro de 2001. Foram selecionados, revisados e analisados 43 pacientes, nos quais o protocolo de pesquisa pôde ser empregado adequadamente, desde a obtenção dos dados clínicos, laboratoriais e de exames complementares. As biópsias musculares desses pacientes encontravam-se armazenadas em nitrogênio líquido a  $-170^{\circ}\text{C}$ ; por meio delas se realizou a reação em cadeia da polimerase, a fim de se estabelecer o diagnóstico molecular, enquanto se realizava a revisão dos casos de AME.

### 5.2 CLASSIFICAÇÃO

Os prontuários foram revisados conforme protocolo exibido no Apêndice 1. A classificação do tipo de AME segue os critérios de ZERRES (Tabela 2), que, em 1995, propôs a classificação baseada na idade de início da doença e no desenvolvimento motor alcançado. Além de ser a mais empregada, optou-se também por ela em virtude da sua praticidade clínica.

Dos 43 pacientes, 20,9% da amostra apresentavam a doença de Werdnig-Hoffmann; 32,6% eram condizentes com AME tipo II; 27,9% com AME tipo IIIa e 18,6% dos pacientes, com AME IIIb. A idade de início da doença nos pacientes com AME variou de 1 mês a 17 anos, e o tempo de seguimento teve oscilações de 1 mês a 8 anos. Todos os pacientes eram da raça branca, e 53,4% deles pertenciam ao sexo feminino (Tabela 3).

Tabela 3 - Número de pacientes para cada tipo de AME, distribuição conforme o sexo, idade de início e tempo de seguimento em cada grupo

Tipo de AME	n	Sexo		Idade de início (meses)				Tempo de seguimento (meses)			
		M	F	média ± DP	mínima	máxima	mediana	média ± DP	mínimo	máximo	mediana
I	9	6	3	2,4 ± 2,2	1,0	8,0	2,0	2,4 ± 2,12	1,0	6,0	1,0
II	14	5	9	9,6 ± 7,3	1,0	24,0	7,5	14,0 ± 18,8	1,0	65,0	4,5
IIIa	12	3	9	13,0 ± 11,2	1,0	36,0	12,0	32,3 ± 29,1	1,0	96,0	30,0
IIIb	8	6	2	117,1 ± 73	1,0	204,0	150,0	21,5 ± 25,7	1,0	60,0	12,5
Total	43	20	23	29,0 ± 52,8	1,0	204,0	8,0	18,2 ± 23,6	1,0	96,0	5,0

n = número de pacientes, M = masculino, F = feminino, DP = desvio padrão

### 5.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

As características clínicas estudadas compreendiam sexo, tempo de acompanhamento, idade de início, desenvolvimento motor, força da sucção e do choro neonatais, intercorrências ginecobstétricas, história mórbida familiar para AME ou outras doenças neuromusculares, consangüinidade entre os pais, força muscular, tônus, trofismo, presença de fasciculações na língua, reflexos profundos e superficiais. A força muscular foi avaliada nos diversos grupos musculares proximais e distais dos membros inferiores e superiores, isoladamente. Em 36 pacientes (83,7%) foi possível utilizar a escala do MEDICAL RESEARCH COUNCIL (1976). Os dados obtidos na anamnese desses pacientes e os principais achados do exame neurológico são demonstrados a seguir (Tabela 4, Tabela 5 e Tabela 6). A escala de VIGNOS & ARCHIBALD (1960)<sup>1</sup> pôde ser empregada também em 27 pacientes (62,7%).

Tabela 4 - Dados obtidos na anamnese dos pacientes com AME

Tipo de AME	n	AGO	RNPT	Interc. Peri/neonatais	Hipotonia	Sucção débil	Choro débil	HMF AME	HMF DNM	Consang
(número de casos com resposta afirmativa aos dados questionados)										
I	9	3		2	4	2	1	1	1	
II	14	4	2	1	3	1	1	2	2	
IIIa	12	1	1			1	1	1	1	
IIIb	8	1			1	1	1	2	2	1
Total	43	9	3	3	8	5	4	6	6	1

AME: atrofia muscular espinhal, n: número de casos, AGO: intercorrências gestacionais, RNPT: recém-nato pré-termo. Interc: intercorrências; HMF: história mórbida familiar positiva para; DNM: doenças neuromusculares (outras), Consang consangüinidade entre os pais.

<sup>1</sup> VIGNOS PJ, SPENCER GE, ARCHIBALD KC. Management of progressive muscular dystrophy of childhood. JAMA 1963; 184:103-110.

Tabela 5 - Dados referentes às anormalidades dos reflexos profundos e superficiais nos pacientes com AME

Tipo de AME	n	Reflexos profundos diminuídos					Reflexos profundos ausentes					Reflexo CP em extensão
		Aquileu	Patelar	ER	Bicipital	Tricipital	Aquileu	Patelar	ER	Bicipital	Tricipital	
(número de casos com resposta afirmativa aos dados questionados)												
I	9		1				7	6	7	7	7	1
II	14	3	3	3	3	3	9	9	9	9	9	
IIIa	12	3	3	3	3	3	7	7	6	6	6	2
IIIb	8	2	2	3	3	3	5	5	4	4	4	
Total	43	8	9	9	9	9	28	27	26	26	26	3

AME: atrofia muscular espinhal; n: número de casos; ER: estilorrádial; CP cutâneo-plantar.

Tabela 6 - Dados referentes às anormalidades da força muscular nos pacientes com AME

Tipo de AME	n	Força muscular diminuída				Paralisia			
		MS prox.	MS distal	MI prox.	MI distal	MS prox.	MS distal	MI prox.	MI distal
(número de casos com resposta afirmativa aos dados questionados)									
I	9	3	3	3	3	4	4	4	4
II	14	11	13	11	10	1		1	2
IIIa	12	10	10	10	10				
IIIb	8	5	5	6	7				
Total	43	29	31	30	30	5	4	5	6

AME: atrofia muscular espinhal; n: número de casos; MS: membros superiores; MI: membros inferiores; prox.: proximal

As manifestações clínicas foram revisadas através dos prontuários disponíveis, seguindo o protocolo demonstrado no Apêndice 1.

Dentre as intercorrências gestacionais, foram citadas hipertensão arterial sistêmica (um caso com AME do tipo IIIb) e sangramento vaginal (quatro casos, sendo três com AME do tipo II e um com AME do tipo IIIa). Uma gestação foi gemelar, porém divitelínica (AME tipo I). Três gestantes referiram hipocinesia fetal, com dois pacientes com AME tipo I e outro com AME do tipo II (Tabela 4).

Hipotonia neonatal esteve presente em oito casos de AME, sendo que 50% eram do tipo I. Cada grupo descreveu pelo menos uma vez a ocorrência de sucção diminuída ou ausente, assim como choro débil no período neonatal (Tabela 4).

Dentre as intercorrências peri e neonatais, houve relatos de icterícia associada a exossangüineotransfusão (um caso com AME tipo I), hipoglicemia (um caso com AME tipo I) e parto prolongado (um caso com AME do tipo II). Nenhum paciente

referiu câibras e/ou dores musculares. Durante o tempo de acompanhamento desses pacientes não foi registrado óbito (Tabela 4).

Cada grupo referiu pelo menos um caso de AME na família, assim como a ocorrência de outras doenças neuromusculares não específicas. Somente um paciente com AME do tipo IIIb era filho de pais consangüíneos (Tabela 4).

Os três pacientes que apresentaram reflexo cutâneo-plantar em extensão possuíam idade inferior a 3 anos (Tabela 5).

A força muscular era considerada normal se igual a 5, diminuída quando demonstrava grau menor que 5 ao exame físico, e paralisia igual a zero. Paralisia foi constatada nas regiões proximais de 5 pacientes, tanto de membros superiores quanto inferiores, e nas regiões distais de membros superiores em 4 pacientes e de membros inferiores em 6 deles (Tabela 6).

Fasciculações na língua puderam ser observadas em 5 pacientes, sendo somente um caso observado na doença de Werdnig-Hoffmann. A sensibilidade estava preservada em todos os casos.

O desenvolvimento motor também foi analisado de maneira descritiva, englobando com que idade iniciou a sustentação cefálica, quando o paciente conseguiu sentar-se sozinho, engatinhar, ficar em pé com apoio, andar e falar as primeiras palavras (Tabela 7).

**Tabela 7 - Análise descritiva entre desenvolvimento motor e idade de início em cada etapa**

Desenvolvimento motor	n	Idade (meses)		
		mínima	máxima	Média ±DP
Sustentação cefálica	12	1	8	4 ± 2,86
Sentar-se sozinho	18	5	17	8,4 ± 3,22
Engatinhar	7	7	18	10,14 ± 3,67
Ficar em pé com apoio	4	8	15	11,25 ± 3,30
Andar	10	9	18	13,80 ± 2,82
Falar primeiras palavras	14	8	36	15,57 ± 7,72

n: número de casos; DP. desvio padrão.

#### 5.4 ESCALA FUNCIONAL DE VIGNOS E ARCHIBALD

A escala de Vignos (Tabela 8) é utilizada rotineiramente, fornecendo informações sobre os graus de comprometimento motor. Contudo, ela somente permite avaliar pacientes que já adquiriram a capacidade de andar ou subir degraus sem apoio em algum período de sua vida. Desse modo, na presente pesquisa ela foi empregada em 27 pacientes com idade superior a 24 meses. Nessa idade, segundo o teste do desenvolvimento de Denver, a criança já deve ser capaz de subir degraus sem apoio (FRANKENBURG, 1967).

Tabela 8 - Escala de Vignos e Archibald (VIGNOS, 1963)

Grau	Incapacidade funcional
1	Anda e sobe degraus sem ajuda.
2	Anda e sobe degraus com ajuda do corrimão.
3	Anda e sobe degraus lentamente (> 25 seg/8 degraus), com a ajuda do corrimão.
4	Anda sem ajuda e levanta-se da cadeira, mas não sobe degraus.
5	Anda sem ajuda, mas não consegue se levantar da cadeira, nem subir degraus.
6	Anda apenas se assistido ou com muletas.
7	Anda com muletas, mas requer auxílio para manter equilíbrio.
8	Fica em pé com muletas, mas não anda, mesmo com auxílio.
9	Cadeira de rodas. Flexiona cotovelo contra gravidade.
10	Cadeira de rodas. Não flexiona cotovelo contra a gravidade.

A escala de Vignos mostrou maior comprometimento na doença de Werdnig-Hoffmann e na AME tipo II, com valor mínimo obtido de 2 e máximo de 9 (Tabela 9).

Tabela 9 - Frequência por grau na escala de Vignos

Tipo de AME	Escala de Vignos (0-10)										média ± DP	mediana	mínimo	máximo
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10				
(número de casos com o valor demonstrado na escala)														
I										3	6	7,0	3,0	9,0
II										2	5	6,2	7,0	9,0
IIIa		1	3	2				1		2	4,4	3,5	1,0	9,0
IIIb		2	4					1		1	4	3,0	2,0	9,0

AME: Atrofia muscular espinhal; DP: desvio-padrão

## 5.5 ENZIMAS MUSCULARES

As enzimas pesquisadas em cada tipo de AME foram a creatinoquinase (CK), aldolase, desidrogenase láctica (LDH), transaminase glutâmica oxalacética (TGO) e transaminase glutâmica pirúvica (TGP), solicitadas na época de admissão dos respectivos pacientes. O número “0” era considerado como valor normal para a dosagem sérica da respectiva enzima, e os demais números eram correspondentes ao número de vezes em que ela se encontrava aumentada no paciente (Anexo 1).

Metade dos pacientes com doença de Werdnig-Hoffmann demonstrou, em pelo menos em uma das enzimas pesquisadas, um discreto aumento (no máximo 1,9 vez aumentado o valor normal de referência) dos níveis séricos (Tabela 10).

Dos 14 pacientes com AME tipo II, 13 foram testados, e destes, as enzimas se encontraram normais em 11 (84,6%) casos, estando também discretamente aumentadas em 2 (15,3%) pacientes (no máximo 1,88 vez aumentada em relação ao valor normal de referência) (Tabela 10).

Os maiores aumentos dos níveis enzimáticos foram presentes na AME tipo III, em que 7 dos 15 pacientes pesquisados (46,6%) apresentaram valores aumentados. Cinco desses 7 pacientes (71,4%) demonstravam mais de uma enzima alterada, principalmente a CK, que, em 2 casos, mostrou-se até 4 vezes acima do seu valor normal de referência, e 1 caso chegou a 5 vezes (Tabela 10), mas nenhum paciente apresentou elevação dos níveis enzimáticos maior que esse valor.

Tabela 10 - Frequência de pacientes com dosagens de enzimas musculares aumentadas em cada grupo

Tipo de AME	n	CK	LDH	Aldolase	TGO	TGP
		(número de casos em que a enzima se encontrava aumentada)				
I	9	1	2	1	1	
II	14	2	2	2	1	1
IIIa	12	1	1	1		
IIIb	8	5	1	4	2	
Total	43	8	5	9	4	2

AME: Atrofia muscular espinhal; CK: creatinoquinase; TGO: transaminase oxalacética; TGP: transaminase pirúvica; LDH: desidrogenase láctica; NR: não realizado.

## 5.6 ELETRONEUROMIOGRAFIA

Os achados de EMG foram revisados e estipulados como padrão normal, miopático, de desinervação e misto (Tabela 11). O padrão encontrado foi predominantemente de desinervação, sendo que resultado normal ou limítrofe para desinervação também era considerado condizente com o diagnóstico de AME, de acordo com a idade de realização do exame. As definições diagnósticas também seguiram roteiro empregado no Serviço de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

Tabela 11 - Definições diagnósticas empregadas na determinação do padrão EMG

Resultado da EMG
Normal
Miopática
Desinervação
Mista
Não realizado

EMG: eletroneuromiografia

O padrão de desinervação foi encontrado em 88,8% dos 36 pacientes avaliados (não foi realizado exame em 7 dos 43) (Tabela 12). Esses resultados estavam expressos na forma de laudo final nos prontuários revisados, mas o exame completo foi recuperado em 16 casos (Anexos 3, 4 e 5).

A EMG foi realizada em 77,7% dos 9 pacientes com AME tipo I, e destes, 71,4% demonstraram padrões de desinervação. Dois pacientes (2 e 4) apresentaram padrão miopático (Tabela 12).

Onze dos 14 pacientes com AME tipo II submeteram-se ao exame, e o achado de desinervação esteve presente em 81,8% deles. Dois exames revelaram padrão miopático (10 e 12), realizados respectivamente com 24 e 17 meses de vida (Tabela 12).

Todos os pacientes com AME tipo III submetidos à EMG (18 dos 20 casos) manifestaram características de desinervação (Tabela 12).

Tabela 12 - Resultados do estudo com eletroneuromiografia em cada paciente

Tipo de AME	n	Desinervação	Miopático	NR
(número de casos com o padrão citado ou NR)				
I	9	5	2	2
II	14	9	2	3
IIIa	12	10		2
IIIb	8	8		
<b>Total</b>	<b>43</b>	<b>32</b>	<b>4</b>	<b>7</b>

n: número de casos; AME: Atrofia muscular espinhal; NR: não realizado

## 5.7 BIÓPSIA MUSCULAR

As biópsias musculares de pacientes com AME, baseadas no diagnóstico clínico e exames complementares, foram realizadas e armazenadas em nitrogênio líquido a  $-170^{\circ}\text{C}$  (Anexo 5).

As biópsias armazenadas nesse período foram reaproveitadas, de modo que a pesquisa obteve 43 amostras viáveis, e os diagnósticos anatomopatológicos foram revisados, analisados e definidos como padrão miopático, de desinervação, misto e músculo em estágio final (Tabela 13), através do protocolo empregado no Serviço de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

As colorações empregadas para o estudo de cada biópsia compreendiam: hematoxilina-eosina (HE), Gomori modificado, nicotinamida adenina dinucleotídeo tetrazólio redutase (NADH), esterase inespecífica, adenosina trifosfatase (ATPase) pH 9,4/ 4,3/ 4,6, fosfatases ácida e alcalina, desidrogenase succínica, citocromo C-oxidase, *Sirius red* e adenilato deaminase. Cada coloração continha a descrição das principais particularidades encontradas (Tabela 14).

O diagnóstico de AME baseava-se no achado de grupos de fibras musculares atroficas, arredondadas ou não, intercaladas com grupos de fibras hipertróficas,

representadas principalmente pelas fibras tipo 1, podendo haver a presença de fibras anguladas atroficas (Figuras 2 a 5).

O padrão de desinervação esteve presente em 92,8% de todas as biópsias (Tabela 13). Os resultados detalhados são apresentados nos Anexos 7, 8, 9 e 10.

No tipo I, houve padrão de desinervação em 6 das 8 biópsias (75%). Dos 14 pacientes com clínica do tipo II, 11 biópsias (78,5%) eram compatíveis com desinervação. Observou-se padrão miopático em 1 paciente (caso 17), que teve seu exame realizado com 16 meses de vida. Padrão misto foi registrado em 2 biópsias.

Todas as biópsias musculares dos pacientes com AME tipo III demonstraram-se compatíveis com desinervação.

Tabela 13 - Diagnósticos anatomopatológicos finais estipulados em cada paciente

	AME tipo I (n = 9)	AME tipo II (n = 14)	AME tipo IIIa (n = 12)	AME tipo IIIb (n = 8)	Total (n = 43)
Desinervação	6	11	12	8	37
Mista	2	2			4
Miopatia		1			1
Músculo em estágio final	1				1

AME: atrofia muscular espinhal

Tabela 14 - Resultados anatomopatológicos nos pacientes com AME

	AME Tipo I (n = 9)	AME Tipo II (n = 14)	AME Tipo IIIa (n = 12)	AME Tipo IIIb (n = 8)
<b>Coloração HE e Gomori Modificado</b>				
Proliferação de tecido conjuntivo	5	7	2	2
<b>Infiltração de tecido adiposo</b>	7	7	5	3
<b>Varição do diâmetro das fibras</b>		2	1	
Grandes aglomerados de fibras atroficas	7	5	7	5
Pequenos aglomerados de fibras atroficas	2	2	2	3
Fibras anguladas atroficas	4	5	7	6
Fibras redondas atroficas dispersas	6	12	10	5
Fibras hipertróficas dispersas	6	9	8	8
Núcleos centrais	3	2	2	4
<b>Grumos nucleares</b>	2	5	2	4
Necrose	3	2	1	3
Fagocitose	3	2		1
Massas sarcoplasmáticas		1		
Fibras basofílicas			1	
Fibras hipercontráteis	1	1	1	2
<b>Coloração NADH</b>				
<b>Fibras anguladas atroficas</b>	3	4	6	4
Saca-bocados	1	1	1	3
Enrodilhamentos	1			1
Aumento focal de NBT reduzido		2	1	4
Turbilhões		2	1	2
<b>Anéis</b>		1		1
Esterase inespecífica				
Fibras anguladas atroficas	5	8	5	4
Aumento de atividade no interstício		1		
<b>ATPases pH 9,4/ 4,3/ 4,6</b>				
Agrupamentos	5	3	4	6
Predomínio de fibras tipo I			3	2
Predomínio de fibras tipo II	1	3	2	
Hipertrofia de fibras tipo I	8	8	5	6
Hipertrofia de fibras tipo II	4	7	7	2
Atrofia de fibras tipo I	8	10	10	8
Atrofia de fibras tipo II	7	13	8	6
<b>Fosfatase ácida</b>				
Aumento focal de fibras	5	5	6	6
Fibras positivas	5	6	5	5
Aumento no interstício		1		
<b>Fosfatase alcalina</b>				
Fibras positivas	7	5	5	1
Aumento no interstício		1	1	
Aumento nos nervos			1	
<b>Oil red</b>			1	
<b>Desidrogenase succínica</b>				
<b>Acúmulo subsarcolemal</b>				3
<b>Sirius red</b>	2	4	2	3
<b>Citocromo C-oxidase</b>			1	3
<b>Adenilato deaminase</b>	1	1	4	

AME: atrofia muscular espinhal; HE: Hematoxilina – Eosina, NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo tetrazólio reductase.

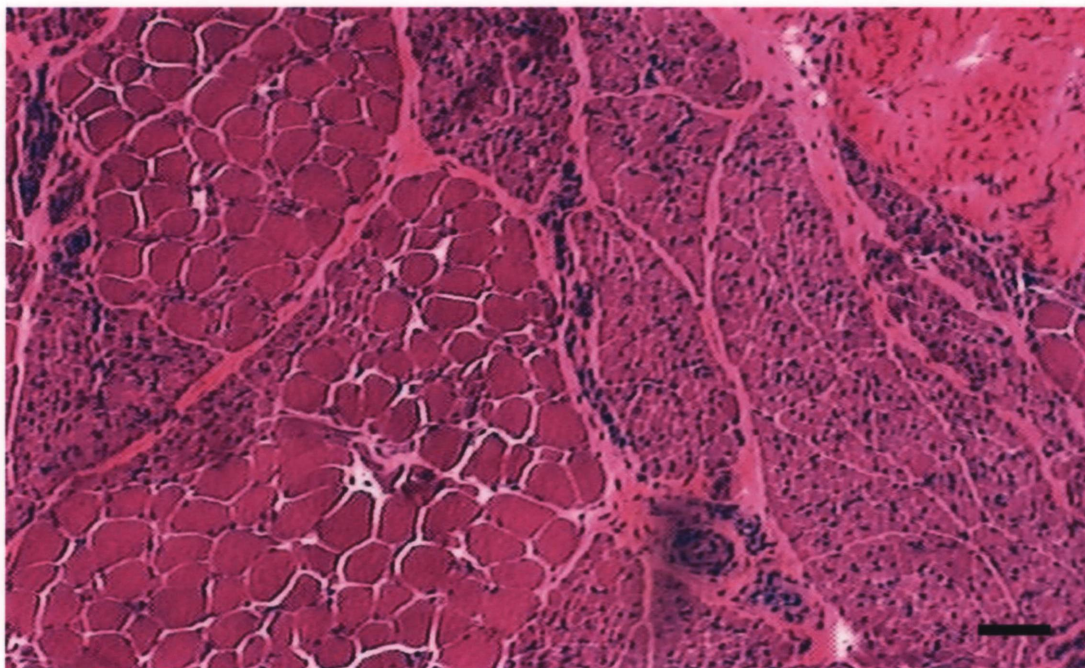


Figura 2 - Fascículos de fibras atróficas ao lado de fascículos de fibras hipertróficas. Hematoxilina-Eosina, barra = 50 $\mu$ m (caso 7).

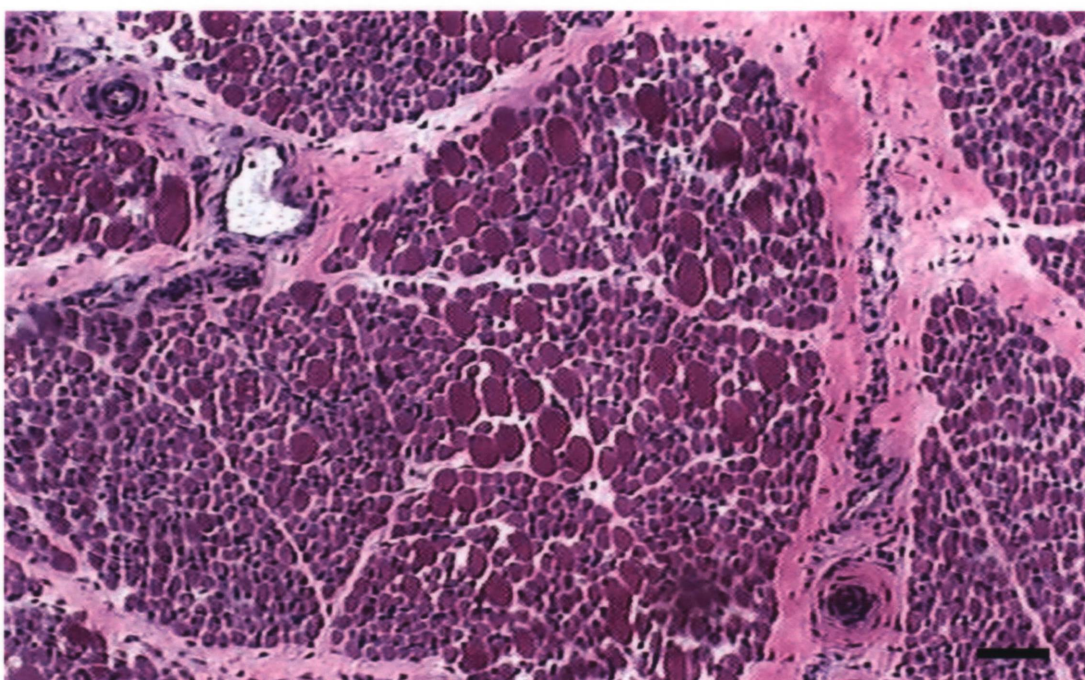


Figura 3 - Fibras musculares hipertróficas entremeadas entre fibras atróficas arredondadas. Hematoxilina-Eosina, barra = 50 $\mu$ m. (caso 8).

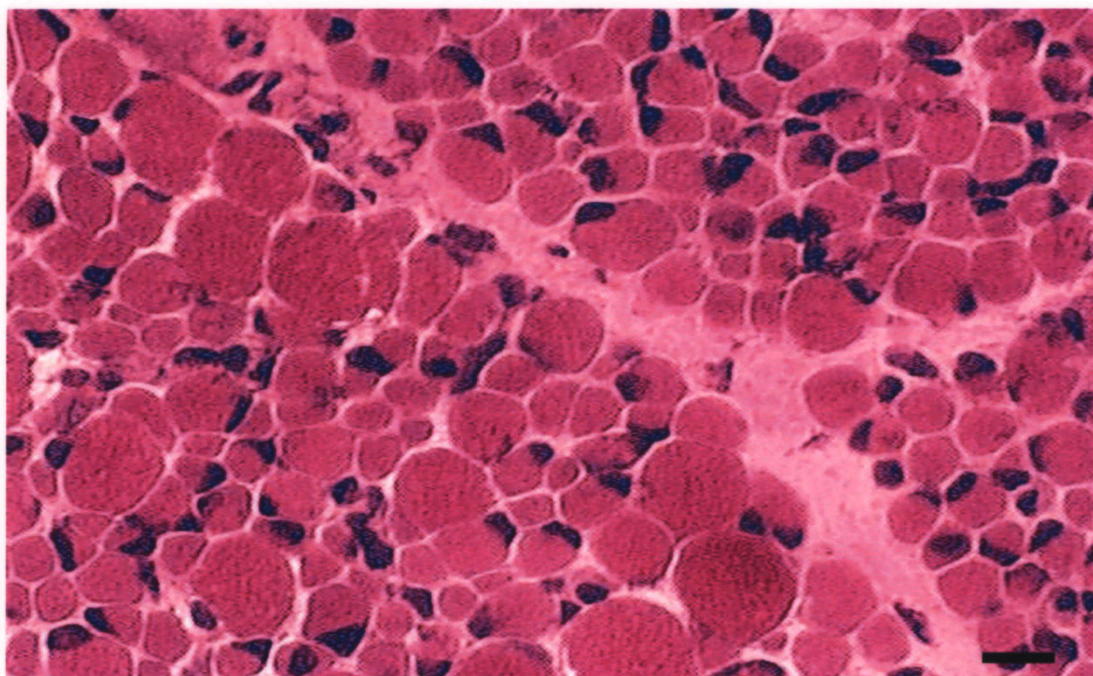


Figura 4 - Fibras musculares hipertróficas entremeadas entre fibras atróficas arredondadas. Hematoxilina-Eosina, barra = 50 $\mu$ m. (caso 7).

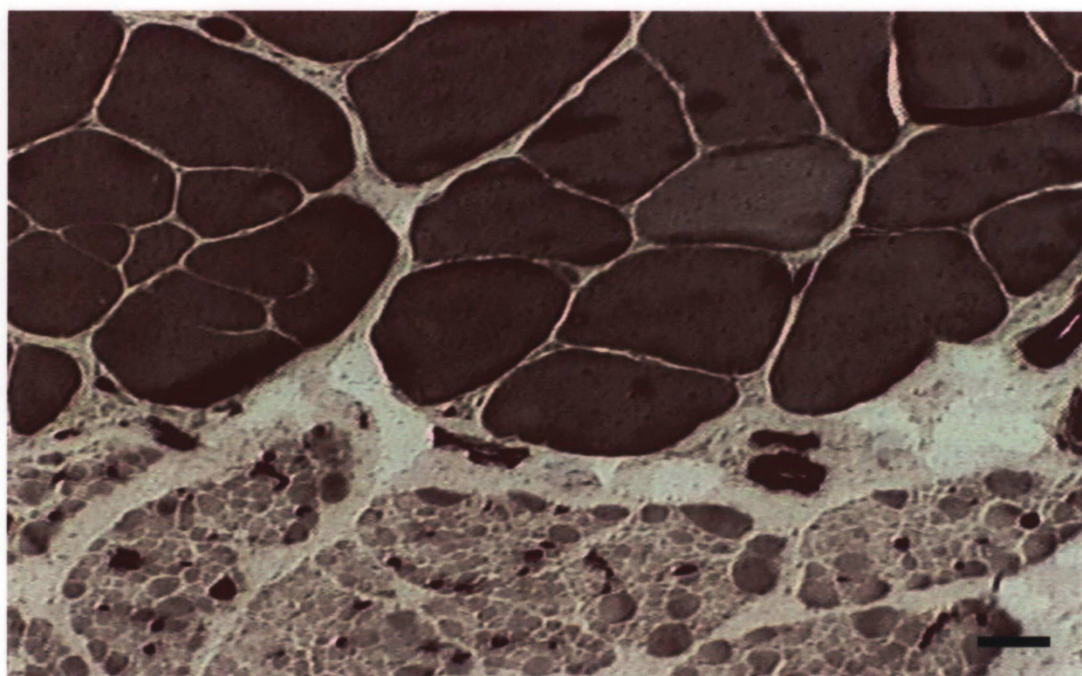


Figura 5 - Hipertrofia de fibras tipo 2, fibras em segmentação, atrofia de fascículos de fibras, agrupamentos de fibras tipo 1 e 2. ATPase pH 9,4, barra = 50 $\mu$ m (caso 7)

## 5.8 GRUPO DE CONTROLE

Oito pacientes com outras morbidades tiveram seu DNA extraído pelo mesmo método, para controle. As patologias compreendiam esclerose lateral amiotrófica, distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, miopatia nemalínica, distrofia muscular congênita, miopatia por corpos de inclusão e distrofia muscular tipo cinturas, comprovadas pelo exame clínico, dados laboratoriais, achados de EMG e biópsia muscular.

## 5.9 MÉTODOS

### 5.9.1 Extração de DNA da Biópsia Muscular

Foram utilizados 1000  $\mu\text{L}$  da solução de lise celular, 20  $\mu\text{L}$  de proteinase K e pelo menos 40 mg de tecido, com incubação em estufa durante pelo menos 48 horas.

Adicionava-se 3 mL de fenol saturado ao material, agitava-se a mistura e na seqüência ela era centrifugada a 2 500 rpm, durante 10 minutos. Dois níveis se formavam. A porção inferior era retirada e desprezada e, na superior, adicionavam-se 3 ml de clorofórmio/fenol na proporção 1:1. Novamente o tubo era agitado e centrifugado pelo mesmo tempo e velocidade.

Novamente se descartava a porção inferior e somava-se ao sobrenadante 3 mL de álcool isoamílico/ clorofórmio na proporção 1:24. Pela última vez, o material era agitado e centrifugado pelo mesmo tempo e velocidade. Acrescentava-se 6 ml de etanol a 100% e invertia-se o tubo delicadamente, até completa precipitação e visualização do DNA. Este era pipetado e transferido para tubo de 1000  $\mu\text{L}$ , o qual seguia à estufa por aproximadamente 24 horas para evaporação do etanol restante. Adicionava-se 200  $\mu\text{L}$  de tampão de extrato pH 8,0 ao botão de DNA e incubava-se o tubo a 55°C durante 24 horas.

### 5.9.2 Quantificação dos DNAs Extraídos das Biópsias

Realizava-se a leitura do DNA no espectrofotômetro *GeneQuant pro*, da *Amersham Pharmacia Biotech*, o qual fornecia dados de concentração e pureza do DNA, admitindo-se como ideal a relação DNA/ proteína com valor entre 1,5 e 2,2.

### 5.9.3 Técnica de Amplificação

A concentração final estipulada foi de 0,2mM de cada precursor do DNA (desoxirribonucleosídeos trifosfatos = adenina, guanina, timina, citosina), 0,5U por reação de *Taq* DNAPolimerase, tampão de PCR 1x e 1,5mM de  $MgCl_2$ , seguida dos respectivos oligonucleotídeos (Anexos 11 e 12). Cada tubo continha um éxon a ser pesquisado, não sendo possível empregar a técnica denominada *multiplex*. Acrescentava-se o DNA extraído das biópsias musculares dos pacientes com AME, cuja concentração variava de 0,5 a 2,0 ng/reação, e o *primer*, na concentração de 35pMol/ $\mu$ L (Anexo 12).

A temperatura de anelamento para o éxon 5 foi estabelecida em 50°C, e para ambos os éxons 7 e 8, em 60°C. O termociclador é proveniente da *MJ Research*, modelo *PTC 200 (Peltier Thermal Cycler)*, e uma vez programado, 15 ciclos eram completados. Somente no terceiro ciclo o programa era interrompido transitoriamente, pois é nessa fase que 5U da *Taq* DNAPolimerase deve ser adicionada a cada tubo.

Preparava-se concomitantemente um tubo isento de DNA e outro com DNA de paciente de controle.

#### 5.9.4 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

A próxima etapa consistia na “corrida” do DNA na placa de gel. Misturavam-se 4  $\mu\text{L}$  de corante com 10  $\mu\text{L}$  do DNA a ser pesquisado (resultante da reação em cadeia da polimerase), dispendo cada preparação em poços diferentes, cuidadosamente, para se evitar contaminação. O último espaço era preenchido com 4  $\mu\text{L}$  de marcador de 10 pb (para facilitar a localização do éxon 5) ou de 100 pb (para os éxons 7 e 8).

#### 5.9.5 Coloração com Nitrato de Prata

A “corrida” durava em média 90 minutos, numa voltagem de 200V. Depois da sua retirada, acrescentava-se à placa solução de ácido nítrico a 1%, deixando-a por 3 minutos. Em seguida, submergia-se a placa em nitrato de prata a 10%, dispendo-a no agitador durante 30 minutos.

#### 5.9.6 Revelação

Adicionavam-se 200 ml de solução de carbonato de sódio (pré-aquecida) com 92  $\mu\text{L}$  de formaldeído, o que permitia a visualização das bandas procuradas.

O éxon 5 era identificado em 76 pb, o éxon 7 em 210 pb e o éxon 8 em 180 pb, conforme descrito nas revisões consultadas (LEFEBRVE, 1995; SOMERVILLE, 1997).

### 5.9.7 Fixação

Estabelecidas as deleções, interrompia-se a reação, retirando-se a solução e adicionando-se ácido acético. Para preservação da placa, banhava-se a mesma em solução de glicerol a 5%, colocando-se o gel corado entre duas folhas transparentes, vedando-se as extremidades com fita adesiva (Figuras 6 e 7).

As fórmulas das soluções empregadas na PCR encontram-se expostas no Anexo 13.

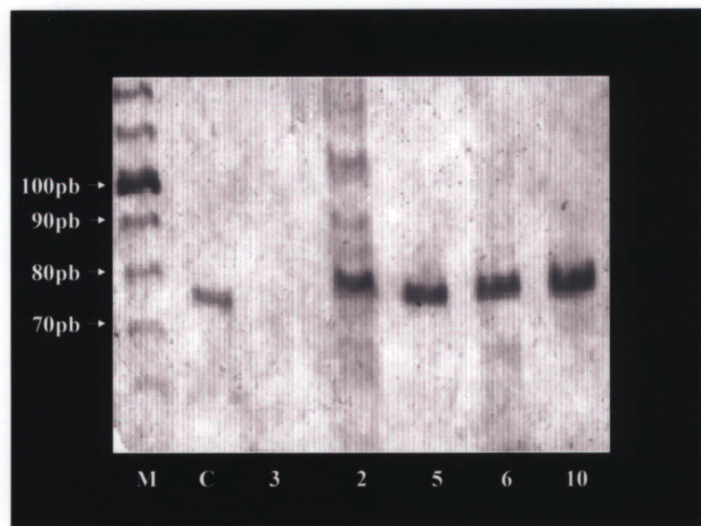


Figura 6 - PCR para pesquisa do NAIP (éxon 5). M: marcador, C: controle negativo. Há deleção do NAIP no paciente 3.

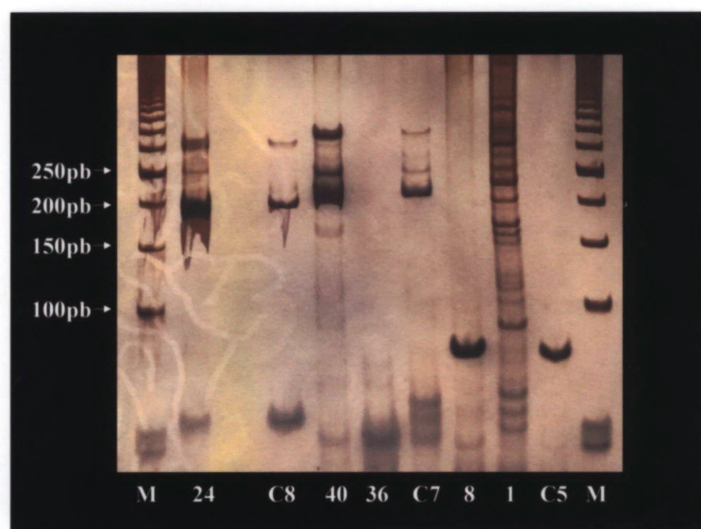


Figura 7 - PCR para pesquisa do NAIP (éxon 5) e do SMN (éxons 7 e 8). M: marcador; caso 24 apresenta éxon 8 normal; C8: controle negativo para o éxon 8; caso 40 apresenta éxon 7 normal; caso 36 apresenta deleção do éxon 7; C7: controle negativo para o éxon 7; caso 8 com éxon 5 normal; caso 1 com deleção do éxon 5; C5: controle negativo para o éxon 5.

## 6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Efetou-se a avaliação dos dados por análise descritiva, expressa em média, mediana, valor mínimo, valor máximo e desvio-padrão sempre que desejável e apropriado.

A distribuição das variáveis foi verificada pelos testes de Kolmogorof-Smirnof e de Lilliefors e por análise de histograma, de maneira a afirmar ou negar a distribuição gaussiana. Os testes não paramétricos foram aplicados no caso de rejeição de hipótese de normalidade, e consistiam no teste do “Qui quadrado com a correção de Yates”, para amostras independentes e relacionadas, e no teste exato de Fisher, a fim de se testar a hipótese nula de que a distribuição de uma variável descontínua é a mesma em duas (ou mais) amostras independentes, tendo em vista o tamanho delas. O teste de Fisher foi escolhido pelos números baixos encontrados nas tabelas de contingência e em razão de fornecer o valor exato de “p” (SWINSCOW, 1997).

A hipótese de nulidade foi rejeitada sempre que o valor calculado pelo teste estatístico fosse igual ou menor do que 5%.

A análise estatística foi feita com o conjunto estatístico StatSoft, Inc., 2003 (STATISTICA – data analysis software system).

## 7 RESULTADOS

### 7.1 ANÁLISE DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR

#### 7.1.1 NAIP

A deleção do éxon 5 (Figura 6) foi demonstrável respectivamente em 55% dos 9 pacientes com AME tipo I, sempre acompanhados da deleção dos éxons 7 e 8 (Tabela 15). A deleção do NAIP foi constatada em 21,4% dos 14 dos pacientes com AME tipo II, e em 25% dos 20 pacientes com AME tipo III. Não ocorreu diferença estatística significativa entre a ocorrência de deleção do éxon 5 e o tipo de AME. Entretanto, a deleção do NAIP mostrou-se estatisticamente relevante ( $p < 0,05$ ) na ocorrência de diminuição da força muscular distal dos membros superiores (Tabela 16).

#### 7.1.2 SMN

A deleção do SMN (fosse do éxon 7, do éxon 8, ou de ambos) ocorreu nos 43 casos (Tabela 15). Os éxons 7 e 8 estiveram deletados concomitantemente em 100% dos pacientes com AME tipos I e II, enquanto no tipo III a deleção de ambos, simultaneamente, correspondeu a 85% dos 20 casos.

Nos pacientes com AME tipo III, houve deleção do éxon 7 em 90% dos 20 pacientes e do éxon 8 em 95% casos. A presença de fibras anguladas atroficas dispersas e de fibras redondas atroficas dispersas tiveram relação com a deleção do éxon 8 ( $p < 0,05$ ).

Somando-se os três tipos de AME, a deleção dos éxons 7 e 8, ao mesmo tempo, ocorreu em 93% dos pacientes (Tabela 15).

Tabela 15 - Relação dos dados clínicos e exames complementares com o diagnóstico molecular

AME tipo I	Idade início (m)	Idade última consulta (m)	Sexo (M/F)	Tempo de seguimento (m)	Escala Vignos (valor)	EMG (padrão)	Biópsia muscular (padrão)	NAIP (D/N) Éxon 5	SMN (D/N)	
									Éxon 7	Éxon 8
1	1	2	M	6	NR	-	Desin	D	D	D
2	2	108	F	1	9	Mio	Mista	N	D	D
3	4	9	F	1	NR	Desin	Desin	D	D	D
4	1	2	F	1	NR	Mio	Mista	D	D	D
5	2	2	M	1	NR	Desin	EF	N	D	D
6	8	4	M	3	NR	Desin	Desin	N	D	D
7	1	60	M	6	9	Desin	Desin	D	D	D
8	1	AI	M	2	NR	Desin	Desin	N	D	D
9	2	82	M	1	9	-	Desin	D	D	D
AME tipo II										
10	24	82	F	1	8	Mio	Mista	N	D	D
11	16	AI	F	1	NR	-	Desin	N	D	D
12	17	22	M	3	NR	Mio	Desin	N	D	D
13	4	48	F	1	9	Desin	Desin	N	D	D
14	1	12	F	4	NR	Desin	Desin	N	D	D
15	12	19	F	1	NR	-	Desin	N	D	D
16	17	AI	F	4	NR	Desin	Desin	N	D	D
17	16	72	F	16	9	Desin	Mio	N	D	D
18	1	60	F	5	9	Desin	Desin	D	D	D
19	5	24	M	41	9	Desin	Desin	N	D	D
20	1	12	F	27	NR	Desin	Desin	D	D	D
21	6	24	M	19	8	Desin	Desin	N	D	D
22	7	12	M	65	NR	Desin	Desin	N	D	D
23	8	38	M	14	9	-	Mista	D	D	D
AME tipo IIIa										
24	24	96	F	72	4	-	Desin	N	D	N
25	11	180	M	1	4	Desin	Desin	N	D	D
26	16	AI	F	96	NR	Desin	Desin	N	D	D
27	18	120	F	1	9	Desin	Desin	D	D	D
28	1	132	F	24	3	Desin	Desin	N	D	D
29	1	36	F	44	3	Desin	Desin	N	D	D
30	12	132	M	36	3	Desin	Desin	N	D	D
31	1	96	F	1	9	Desin	Desin	N	D	D
32	12	AI	M	24	NR	-	Desin	N	D	D
33	24	156	F	38	7	Desin	Desin	D	N	D
34	36	72	F	12	2	Desin	Desin	N	D	D
35	1	AI	F	39	NR	Desin	Desin	N	D	D
AME tipo IIIb										
36	204	600	M	1	2	Desin	Desin	D	D	D
37	48	312	F	60	3	Desin	Desin	D	D	D
38	48	72	M	1	3	Desin	Desin	N	D	D
39	180	324	M	1	2	Desin	Desin	N	D	D
40	156	AI	M	24	9	Desin	Desin	N	N	D
41	1	84	M	1	7	Desin	Desin	N	D	D
42	144	AI	F	24	3	Desin	Desin	N	D	D
43	156	300	M	60	3	Desin	Desin	D	D	D

AME: atrofia muscular espinhal; m: meses; M: masculino; F: feminino; EMG: eletroneuromiografia; AI: ausência de informação; NR: não realizado; Desin: desinervação; Mio: miopatia; D: deleção; N: normal; EF: músculo em estágio final.

## 7.2 ANÁLISE ENTRE DIAGNÓSTICO MOLECULAR E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Todas as manifestações clínicas previamente pesquisadas foram relacionadas com as deleções encontradas e não revelaram diferença estatística significativa, exceto pela diminuição da força muscular distal dos membros superiores, que se revelou estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando associada à deleção do éxon 5 (NAIP) (Tabela 16).

Tabela 16 - Relação entre o diagnóstico molecular, dados demográficos e aspectos clínicos

Parâmetros	Deleção do éxon 5	Deleção do éxon 7	Deleção do éxon 8
Sexo masculino (n=20/Total=43)	NS (n=6)	NS (n=19)	NS (n=20)
Sexo feminino (n=23/Total=43)	NS (n=7)	NS (n=22)	NS (n=22)
Intercorrências gestacionais (n=9/Total=35)	NS (n=3)	NS (n=9)	NS (n=9)
Prematuridade (n=3/Total=35)	NS (n=0)	NS (n=3)	NS (n=3)
Hipotonia neonatal (n=8/Total=35)	NS (n=4)	NS (n=8)	NS (n=8)
Choro neonatal débil (n=4/Total=35)	NS (n=0)	NS (n=4)	NS (n=4)
Sucção neonatal débil (n=5/Total=35)	NS (n=1)	NS (n=5)	NS (n=5)
Sustentação cefálica (n=33/Total=34)	NS (n=8)	NS (n=32)	NS (n=32)
Sentar-se sozinho (n=30/Total=33)	NS (n=8)	NS (n=39)	NS (n=39)
Ficar em pé com apoio (n=24/ Total=33)	NS (n=5)	NS (n=33)	NS (n=33)
Caminhar (n=17/Total=31)	NS (n=5)	NS (n=16)	NS (n=16)
Familiares com AME (n=3/Total=35)	NS (n=0)	NS (n=3)	NS (n=2)
Consangüinidade entre os pais (n=1/Total=35)	NS (n=0)	NS (n=1)	NS (n=1)
Familiares com outras DNM (n=6/Total=35)	NS (n=4)	NS (n=6)	NS (n=6)
Reflexo aquileu diminuído/ ausente (n=29/Total=36)	NS (n=11)	NS (n=35)	NS (n=35)
Reflexo patelar diminuído/ ausente (n=29/Total=36)	NS (n=11)	NS (n=35)	NS (n=35)
Reflexo bicipital diminuído/ ausente (n=29/Total=36)	NS (n=11)	NS (n=34)	NS (n=34)
Reflexo tricipital diminuído/ ausente (n=29/Total=36)	NS (n=11)	NS (n=34)	NS (n=34)
Reflexo estilorrádial diminuído/ ausente (n=29/Total=35)	NS (n=11)	NS (n=34)	NS (n=34)
Reflexo cutâneo-plantar em extensão (n=3/Total=36)	NS (n=1)	NS (n=3)	NS (n=3)
<b>Força muscular distal diminuída de MS* (n=31/Total=37)</b>	<b>p = 0,05 (n=7)</b>	NS (n=30)	NS (n=30)
Força muscular proximal diminuída de MS (n=29/Total=36)	NS (n=7)	NS (n=28)	NS (n=28)
Força muscular distal diminuída de MI (n=29/Total=36)	NS (n=8)	NS (n=28)	NS (n=28)
Força muscular proximal diminuída de MI (n=30/Total=36)	NS (n=7)	NS (n=29)	NS (n=29)
Fasciculação de língua (n=6/Total=32)	NS (n=6)	NS (n=6)	NS (n=6)

n número de casos; AME: atrofia muscular espinhal, DNM: doenças neuromusculares, MS: membros superiores, MI: membros inferiores; NS: não significativo; \* = estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) (Teste exato de Fisher)

### 7.3 ANÁLISE ENTRE DIAGNÓSTICO MOLECULAR E DOSAGENS ENZIMÁTICAS

As dosagens enzimáticas da CK, LDH, TGO e TGP foram relacionadas com o diagnóstico molecular estabelecido, sem associação estatística significativa entre eles (Tabela 17).

Tabela 17 - Relação entre o diagnóstico molecular e as dosagens enzimáticas aumentadas

Parâmetros	Deleção do éxon 5	Deleção do éxon 7	Deleção do éxon 8
Creatinofosfoquinase (n=8/Total=31)	NS (n=3)	NS (n=6)	NS (n=8)
Desidrogenase láctica (n=5/Total=28)	NS (n=1)	NS (n=4)	NS (n=4)
Aldolase (n=9/Total=28)	NS (n=6)	NS (n=7)	NS (n=9)
Transaminase glutâmica oxalacética (n=4/Total=31)	NS (n=2)	NS (n=4)	NS (n=4)
Transaminase glutâmica pirúvica (n=2/Total=29)	NS (n=0)	NS (n=2)	NS (n=2)

NS: não significante. (Teste exato de Fisher)

### 7.4 ANÁLISE ENTRE DIAGNÓSTICO MOLECULAR E EMG

Os resultados de EMG também foram relacionados com as deleções constatadas, mas sem diferença estatística significativa em cada tipo de AME (Tabela 18).

Tabela 18 - Relação entre o diagnóstico molecular e os resultados da eletroneuromiografia

Parâmetros	Deleção do éxon 5	Deleção do éxon 7	Deleção do éxon 8
Desinervação (n=32/Total=36)	(n=9) NS	(n=30) NS	(n=32) NS
Miopatia (n=4/Total=36)	(n=1) NS	(n=4) NS	(n=4) NS

NS: não significante. (Teste exato de Fisher)

## 7.5 ANÁLISE ENTRE DIAGNÓSTICO MOLECULAR E BIÓPSIAS MUSCULARES

Os resultados anatomopatológicos foram analisados de acordo com as deleções encontradas. A presença de núcleos internos mostrou relação estatisticamente significativa quando associada à deleção do NAIP ( $p < 0,05$ ).

A deleção do éxon 8 revelou-se estatisticamente significativa na presença de fibras anguladas atroficas dispersas ( $p < 0,05$ ) e de fibras redondas atroficas dispersas ( $p < 0,05$ ).

Os outros achados não demonstraram relevância estatística significativa com os diagnósticos moleculares encontrados (Tabela 19).

Tabela 19 - Relação entre o diagnóstico molecular e os resultados da biópsia muscular

Parâmetros	Deleção do éxon 5	Deleção do éxon 7	Deleção do éxon 8
Desinervação (n=37/Total=43)	NS (n=11)	NS (n=35)	NS (n=36)
Miopatia (n=1/Total=43)	NS (n=0)	NS (n=1)	NS (n=1)
Mista (n=4/Total=43)	NS (n=2)	NS (n=4)	NS (n=4)

NS: não significativa. (Teste exato de Fisher)

A relação entre os achados de biópsia muscular e o diagnóstico molecular, de maneira mais detalhada, encontra-se expressa a seguir, com os dados que foram estatisticamente significativos (Tabela 20).

Tabela 20 - Relação entre os achados de biópsia muscular com o diagnóstico molecular

Parâmetros	Deleção do éxon 5	Deleção do éxon 7	Deleção do éxon 8
Coloração HE e Gomori Modificado			
Proliferação de tecido conjuntivo (n=16/Total=43)	NS (31,2%)	NS (100%)	NS (100%)
Infiltração de tecido adiposo (n=20/Total=43)	NS (20%)	NS (100%)	NS (100%)
Variação do diâmetro das fibras (n=42/Total=43)	NS (30,9%)	NS (95,2%)	NS (97,6%)
Grandes aglomerados de fibras atroficas (n=28/Total=43)	NS (35,7%)	NS (96,4%)	NS (100%)
Pequenos aglomerados de fibras atroficas (n=8/Total=43)	NS (50%)	NS (100%)	NS (100%)
Fibras anguladas atroficas dispersas* (n=22/Total=43)	NS (31,8%)	NS (95,4%)	<b>p = 0,04 (95,4%)</b>
Fibras redondas atroficas dispersas* (n=36/Total=43)	NS (27,7%)	NS (97,2%)	<b>p = 0,01(97,2%)</b>
Fibras hipertróficas dispersas (n=33/Total=43)	NS (30,3%)	NS (93,9%)	NS (96,9%)
Núcleos centrais* (n=11/Total=43)	<b>p = 0,02 (45,4%)</b>	NS (100%)	NS (100%)
Grumos nucleares (n=13/Total=43)	NS (38,4%)	NS (100%)	NS (100%)
Necrose (n=9/Total=43)	NS (55,5%)	NS (100%)	NS (100%)
Fagocitose (n=6/Total=43)	NS (50%)	NS (100%)	NS (100%)
Divisões e segmentações (n=8/Total=43)	NS (37,5%)	NS (100%)	NS (100%)
Agregados tubulares (n=1/Total=43)	NS (0%)	NS (100%)	NS (100%)
Massas sarcoplasmáticas (n=1/Total=43)	NS (0%)	NS (100%)	NS (100%)
Fibras basofílicas (n=1/Total=43)	NS (0%)	NS (100%)	NS (100%)
Fibras hipercontráteis (n=4/Total=43)	NS (40%)	NS (100%)	NS (100%)
Coloração NADH			
Fibras em anel (n=1/Total=43)	NS (0%)	NS (100%)	NS (100%)
Fibras angulares escuras atroficas (n=17/Total=43)	NS (35,2%)	NS (94,1%)	NS (100%)
Saca-bocados (n=6/Total=43)	NS (33,3%)	NS (100%)	NS (100%)
Alvos (n=5/Total=43)	NS (20%)	NS (100%)	NS (100%)
Aumento focal do NBT reduzido na fibra (n=9/Total=43)	NS (55,5%)	NS (100%)	NS (100%)
Enrodilhamentos (n=2/Total=43)	NS (50%)	NS (100%)	NS (100%)
Turbilhões (n=4/Total=43)	NS (25%)	NS (100%)	NS (100%)
Esterase inespecífica			
Fibras anguladas atroficas (n=22/Total=42)	NS (36,3%)	NS (95,4%)	NS (100%)
Placas motoras aumentadas (n=10/Total=42)	NS (40%)	NS (100%)	NS (100%)
ATPases pH 9,4/ 4,3/ 4,6			
Agrupamentos (n=19/Total=42)	NS (31,5%)	NS (100%)	NS (100%)
Predomínio de fibras tipo I (n=5/Total=42)	NS (60%)	NS (100%)	NS (100%)
Predomínio de fibras tipo II (n=7/Total=42)	NS (28,5%)	NS (100%)	NS (100%)
Hipertrofia de fibras tipo I (n=28/Total=42)	NS (39,2%)	NS (96,4%)	NS (100%)
Hipertrofia de fibras tipo II (n=20/Total=42)	NS (30%)	NS (95%)	NS (100%)
Atrofia de fibras tipo I (n=37/Total=42)	NS (35,1%)	NS (94,5%)	NS (100%)
Atrofia de fibras tipo II (n=35/Total=42)	NS (34,2%)	NS (94,2%)	NS (100%)
Deficiência de fibras do tipo I (n=2/Total=42)	NS (0%)	NS (100%)	NS (100%)
Deficiência de fibras do tipo II (n=4/Total=42)	NS (75%)	NS (100%)	NS (100%)
Miofosforilase (n=2/Total=42)	NS (0%)	NS (100%)	NS (100%)
Fosfatase ácida			
Aumento focal de fibras (n=23/Total=43)	NS (39,1%)	NS (95,6%)	NS (100%)
Fibras positivas (n=21/Total=43)	NS (38,0%)	NS (95,2%)	NS (100%)
Aumento em fagócitos, MN e reação inflamatória (n=2/Total=43)	NS (50%)	NS (100%)	NS (100%)
Aumento no interstício (n=2/Total=43)	NS (50%)	NS (100%)	NS (100%)
Fosfatase alcalina			
Fibras positivas (n=19/Total=43)	NS (36,8%)	NS (100%)	NS (100%)
Aumento no interstício (n=3/Total=43)	NS (66,6%)	NS (100%)	NS (100%)
Aumento em nervos (n=1/Total=43)	NS (100%)	NS (100%)	NS (100%)
Oil red O – Aumento gotículas fibras tipo I (n=1/Total=43)	NS (100%)	NS (100%)	NS (100%)
Cresil Violeta – Metacromasia de nervos (n=1/Total=43)	NS (100%)	NS (100%)	NS (100%)
Desidrogenase succínica			
Acúmulo subsarcolemal (n=4/Total=43)	NS (50%)	NS (100%)	NS (100%)
Aumento do número dos grânulos (n=1/Total=43)	NS (0%)	NS (100%)	NS (100%)
Aumento do volume dos grânulos (n=1/Total=43)	NS (100%)	NS (100%)	NS (100%)
Citocromo C-oxidase – Acúmulo subsarcolemal (n=4/Total=38)	NS (50%)	NS (100%)	NS (100%)
Citocromo C-oxidase – Fibras (n=10/Total=38)	NS (30%)	NS (90%)	NS (100%)
Sirius red (n=11/Total=38)	NS (18,1%)	NS (100%)	NS (100%)
Adenilato deaminase (n=8/Total=33)	NS (37,5%)	NS (87,5%)	NS (100%)

\* = estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ); NS = não significante; n: número de casos com alterações patológicas; MN: mononucleares; HE: Hematoxilina – Eosina; NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo tetrazólio redutase. (Teste exato de Fisher)

## 7.6 GRUPO DE CONTROLE

O grupo de controle era formado por pacientes cujos diagnósticos são mencionados a seguir (Tabela 21). Nenhum caso de controle demonstrou deleção dos éxons estudados.

**Tabela 21 - Grupo de controle e seus diagnósticos**

<b>Biópsia</b>	<b>Diagnóstico</b>
1	Distrofia muscular congênita
2	Esclerose lateral amiotrófica
3	Miopatia nemalínica
4	Esclerodermia
5	Distrofia muscular de Duchenne
6	Distrofia muscular de cinturas
7	Miopatia por corpos de inclusão
8	Distrofia muscular de Becker

## 8 DISCUSSÃO

### 8.1 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Na última década, tornou-se claro que o diagnóstico molecular da AME foi o avanço mais importante para a confirmação da doença, além de proporcionar uma determinação fenotípica mais precisa.

Todavia, permanece a dúvida sobre o papel desempenhado pelo NAIP e pelo SMN na AME, existindo divergências entre os relatos encontrados na literatura quanto aos índices de deleção desses genes e a sua relação com os sinais da AME (LEWIN, 1995; JABLONKA, 2000; ECHANIZ-LAGUNA, 2002).

#### 8.1.1 NAIP

Os índices de deleção do NAIP nos pacientes com doença de Werdnig-Hoffmann variam de 45% a 67% dos casos (LEWIN, 1995). No trabalho atual, a deleção do NAIP ocorreu em pouco mais da metade dos casos, um valor aproximado ao detectado por CUSCÓ, em 2001, que descreveu deleção do éxon 5 em 45% dos pacientes com AME tipo I (CUSCÓ, 2001). Tais variações nos percentuais de deleção são freqüentes, e podem chegar a 100% dos pacientes com AME tipo I, como referido por AL-RAJEH (1999), em trabalho realizado na Arábia Saudita (AL-RAJEH, 1999).

NOVELLI (1997) afirma que a deleção do éxon 5 aumenta em cinco vezes a chance de o paciente ser portador da doença de Werdnig-Hoffmann, e de que o sexo feminino seja o mais predisposto a essa situação (NOVELLI, 1997). Na presente pesquisa, contudo, esta associação esteve presente na metade dos casos de AME tipo I com deleção do NAIP, não havendo relação que corroborasse a predominância do sexo feminino.

TALBOT (1999), GAMBARDELLA (1998), ZERRES (1997) e ORRELL (2001) relatam que nos casos de AME tipo II e III esses índices de deleção do NAIP raramente ultrapassam 20% (TALBOT, 1999; GAMBARDELLA, 1998; ZERRES, 1997; ORRELL, 2001). Na presente pesquisa também houve deleção do éxon 5 nos pacientes com AME tipo II, mas numa proporção bem menor que a detectada nos pacientes com doença de Werdnig-Hoffmann. Os pacientes com AME tipo III apresentaram índice discretamente superior aos pacientes com AME tipo II. Entretanto, STEWART (1998), com trabalho realizado na Inglaterra, constatou índices de deleção do NAIP superiores aos encontrados no presente trabalho (44% dos seus pacientes com AME tipo II e III), assim como AL-RAJEH (1999) (42,8% dos seus pacientes com AME tipo II e III) (STEWART, 1998; AL-RAJEH, 1999).

No Brasil, há somente o trabalho publicado por KIM (1999), cujo estudo constatou índices de deleção do NAIP muito inferiores se comparados à pesquisa atual, totalizando 35% dos casos de AME tipo I, 16,6% dos casos de AME tipo II e 2,3% daqueles com AME tipo III (KIM, 1999).

Os pacientes apresentando AME do tipo I, com deleção do éxon 5, também são muito mais propensos para deleção simultânea do SMN (AKUTSU, 2002; BURGHEES, 1999). Assim como o atual trabalho, KIM (1999) não observou deleção do NAIP sem que houvesse deleção concomitante do SMN (KIM, 1999).

A função do NAIP não é completamente conhecida, a não ser o fato de que esta proteína é transportada nas raízes anteriores da medula espinhal (BURGHES, 1999). Desta maneira, muitos defendem a teoria de que ela sirva somente como cofator da doença, não contribuindo tanto para estipular o fenótipo, pois nos indivíduos saudáveis ela pode estar deletada em 1% a 2% dos casos (TALBOT, 1999; CAMPBELL, 1997).

Uma das explicações para a patogênese da AME é que a deleção do NAIP propicie a uma persistência inapropriada da apoptose dos neurônios motores, o qual é um fenômeno fisiológico no organismo em desenvolvimento (NOVELLI, 1997).

### 8.1.2 SMN

ORRELL (2001) e WILMSHURST (2002) referem que a pesquisa do SMN demonstra deleção em todos os pacientes com doença de Werdnig-Hoffmann, fato que foi comprovado no atual estudo. No entanto, KIM (1999) constatou deleção dos éxons 7 e 8 em 75% dos seus pacientes com AME tipo I (ORRELL, 2001; WILMSHURST, 2002).

Os pacientes com AME tipo II também costumam apresentar deleção dos éxons 7 e 8 na grande maioria dos casos, podendo chegar a 100%, como foi constatado por AL-RAJEH (1999) (AL-RAJEH, 1999). Esses índices de deleção também foram observados nesta pesquisa.

Nos pacientes com AME tipo III, a deleção de ambos os éxons, simultaneamente, ocorreu em grande parte dos casos da atual pesquisa. KIM (1999) relatou esse fato em 47,6% dos seus pacientes com doença de Kugelberg-Welander. Não há dados descritos na literatura que façam distinção entre os índices de deleção do SMN nos casos de AME tipo IIIa ou IIIb (KIM, 1999).

STEWART (1998) e SOMERVILLE (1997) referem que, quando os três tipos de AME são associados, o índice de deleção dos éxons 7 e 8 (SMN1) alcança até 98,7% dos pacientes com essa doença, dado semelhante ao obtido na atual pesquisa (STEWART, 1998; SOMERVILLE, 1997). KIM (1999), no entanto, realizou pesquisa similar no Brasil e encontrou deleção do SMN (éxon 7, éxon 8 ou ambos) em 80% das famílias estudadas (KIM, 1999).

Todos os pacientes do presente trabalho demonstraram deleção de pelo menos um dos éxons do SMN, com índice de deleção do éxon 7 discretamente inferior ao do éxon 8. Na literatura, essa proporção é um pouco diferente desta pesquisa. BRAHE, em 1995, descreve a deleção do éxon 7 em 98,6% dos casos, valor um pouco superior se comparado ao éxon 8, cuja deleção chega a alcançar o valor de 93%, segundo LEFEBVRE (1995) (BRAHE, 1995; LEFEBVRE, 1995).

SHAWKY (2001), no entanto, constatou deleção do éxon 7 em apenas 55% dos casos, todos com deleção simultânea do éxon 8 (SHAWKI, 2001). LEFEBVRE (1995) salienta que 5% dos casos demonstram deleção do éxon 8 com éxon 7 normal, o que corrobora os achados deste estudo (LEFEBVRE, 1995).

O SMN1 é o principal gene causador da doença, apresentando-se com deleção ou mutação em 95% dos casos de AME tipo I, II e III. A AME tipo IV não apresenta deleção/mutação desse gene (ZERRES, 1997; ORRELL, 2001). Também está descrita deleção homozigota do SMN2, mas em menor proporção (SRIVASTAVA, 2001; ECHANIZ-LAGUNA, 2002).

Sabe-se que o SMN é ubíquo no organismo humano, mas que se concentra principalmente nos cornos anteriores da medula espinhal. Ainda não se sabe por que a doença envolve somente essa localização, e em particular, como, mesmo com seus níveis reduzidos, outros tipos celulares e outros tecidos não são afetados. Estudos recentes sugerem a participação do SMN na formação de “encadeossomos” (*spliceosome*) no citoplasma e na regeneração destes no núcleo (ORRELL, 2001).

Os éxons 7 e 8 possuem a seqüência de oligonucleotídeos determinantes da doença, e são as deleções homólogas ou mutações do SMN1 que resultam no fenótipo da AME, de maneira que os níveis de expressão do SMN são conduzidos pelo SMN2, ou seja, quanto maior a expressão do SMN2, menor a gravidade da doença (ORRELL, 2001). A deleção homozigota do SMN2 também pode acarretar na AME, mas ela é descrita com menor freqüência (36% dos casos). Além disso, sua ocorrência na população normal é ao redor de 5% (ECHANIZ-LAGUNA, 2002; SRIVASTAVA, 2002).

Até o presente momento, cogita-se que o SMN seja responsável principalmente por duas funções: ele é necessário para o encadeamento do pré-RNA mensageiro (RNAm) no núcleo e também está envolvido na linha de montagem das ribonucleoproteínas nucleares de pequeno tamanho (SnRNPs) no citoplasma (ORRELL, 2001).

BURGHES (1999) descreve a forte relação da deleção concomitante do SMN ao NAIP, fato que foi observado em todos os pacientes com diagnóstico de AME tipos

I e II da atual pesquisa (BURGHES, 1999). Esse fato justifica a teoria de que, para se estabelecer o diagnóstico de AME, basta pesquisa isolada do SMN, uma vez que o NAIP não contribui muito para o prognóstico da AME (TALBOT, 1999; CAMPBELL, 1997). Além do mais, deve-se lembrar que, nos indivíduos normais, ela pode estar deletada em 1% a 2% dos casos (TALBOT, 1999, CAMPBELL, 1997).

## 8.2 ASPECTOS CLÍNICOS

TALBOT (1999) afirma que não há relação da doença com o gênero do paciente, fato que foi constatado neste trabalho, em que pouco mais da metade dos casos estudados pertenciam ao sexo feminino (TALBOT, 1999). RUDNIK-SCHÖNEBORN (1994), entretanto, realizou trabalho onde houve predominância do sexo masculino (RUDNIK-SCHÖNEBORN, 1994). NOVELLI (1997) preconiza que o sexo feminino seja 5 vezes mais propenso para desenvolver a doença de Werdnig-Hoffmann se houver deleção associada do NAIP, o que não foi observado na presente pesquisa, pois somente metade dos casos com deleção do éxon 5 pertenciam ao sexo feminino (NOVELLI, 1997).

Infelizmente não foi possível registrar a idade de óbito desses pacientes, certamente devido ao fato de que eles eram encaminhados ao Hospital de Clínicas basicamente para se efetuar o diagnóstico de AME através de exames complementares convencionais indisponíveis pelo serviço público em outros lugares e até em cidades mais próximas. O tempo de acompanhamento desses pacientes variou de 1 mês a 96 meses e, apesar de o óbito ser esperado geralmente até um ano de vida nos pacientes com doença de Werdnig-Hoffmann, não houve registro do mesmo no presente estudo.

A idade de início nos pacientes com AME tipo I teve média semelhante aos dados fornecidos por PEARN (1973), citado por BUNDEY, (1992), cujo estudo confirmou que 95% dos casos têm início dos sinais com idade inferior a 4 meses (BUNDEY, 1992; BRAHE, 1995). AKUTSU (2002) estudou 10 pacientes com AME

tipo I no Japão e constatou idade de início dos sinais abaixo de 4 meses em 4 casos, e aos 4 meses de idade em 4 casos também, corroborando os achados da pesquisa atual (AKUTSU, 2002).

GOMEZ (1994) e CAMPBELL (1997) preconizam que o início da clínica de AME tipo II e III ocorre com maior frequência acima dos 6 meses de vida, o que foi constatado na atual pesquisa (GOMEZ, 1994; CAMPBELL, 1997). Deve ser lembrado que a classificação de ZERRES (1997) propõe que, para que a AME seja considerada tipo IIIa, a idade de início deve ser inferior a 3 anos, e AME tipo IIIb, superior a 3 anos (ZERRES, 1997).

BUNDEY (1992), ASBURY (1992) e ZERRES (1997) alegam que um terço dos pacientes com AME tipo I já demonstra sinais da doença ainda na vida intra-uterina ou logo após o nascimento (BUNDEY, 1992; ASBURY, 1992; ZERRES, 1997). No presente estudo, as queixas de hipocinesia fetal foram provenientes principalmente do grupo com AME I, fato também observado por KIM (1999) e DEVRIENDT (1996), cujo trabalho descreve a relação entre a hipocinesia fetal e a gravidade da AME, principalmente se associada à deleção do NAIP (KIM, 1999; DEVRIENDT, 1996). Hipotonia neonatal foi relatada em pequena porcentagem do estudo, presente na sua grande maioria nos pacientes com doença de Werdnig-Hoffmann.

Não houve intercorrência obstétrica e/ou neonatal que justificasse a clínica e evolução que cada paciente apresentou na atual pesquisa. Dentre os fatos ocorridos, foram citados: hipertensão arterial materna, prematuridade, sangramento vaginal durante a gestação, hipoglicemia e exossangüineotransfusão. Até o presente momento, não há trabalho na literatura que constate complicações ginecobstétricas relacionadas à AME no feto.

Nenhum desses pacientes demonstrou qualquer outro comprometimento do sistema nervoso central, a não ser a presença de reflexo cutâneo-plantar em extensão em alguns casos, todos abaixo de 36 meses. Nessa faixa etária, a sua ocorrência é tolerável na ausência de outros sinais piramidais, uma vez que tal sinal pode

representar reflexo de retirada e ser mal interpretado pelo examinador (SANVITO, 1996).

No presente estudo, houve pouco relato de história de familiares com AME, assim como consangüinidade entre os pais. KIM (1999) identificou casos familiares de AME em 28% dos seus pacientes e consangüinidade em 20% deles (KIM, 1999).

Com referência ao exame físico, os reflexos tendinosos profundos estavam ausentes em mais da metade dos 43 casos da atual pesquisa e diminuídos no restante dos pacientes. GOMEZ (1994) afirma que praticamente todos os pacientes com AME, independente do tipo, apresentam os reflexos aquileus abolidos ao completar 2 anos de vida (GOMEZ, 1994).

DUBOWITZ (1985), BUNDEY (1992) e BURGHEES (1999) afirmam que a presença de reflexos tendinosos normais pode ocorrer nos três tipos de AME em 5% a 7% dos casos. Os reflexos também podem estar aumentados em 2%, sem comprometimento sensorial, intelectual ou outro envolvimento do SNC (DUBOWITZ, 1985; BUNDEY, 1992; BURGHEES, 1999).

WILSON, citado por BUNDEY (1992) descreve o achado de fasciculações na língua em 5% a 10% dos casos nos três tipos de AME, valor muito próximo ao encontrado no estudo atual (BUNDEY, 1992).

A AME caracteriza-se principalmente por fraqueza muscular proximal e predominantemente de membros inferiores (GOMEZ, 1994; TALBOT, 1999). No estudo, a força muscular acabou sendo o único item que foi relevante quando associado à deleção do éxon 5 (NAIP), todavia com localização distal e nos membros superiores. A deleção desse gene ocorre com maior frequência nos casos de AME tipo I, que são justamente os de pior prognóstico, podendo sugerir que o acometimento distal de membros superiores seja relevante, neste estudo, secundário ao comprometimento do NAIP em associação à deleção do SMN.

HEDGE (2001) publicou trabalho pesquisando o envolvimento do NAIP e do SMN com a forma de AME que acomete a porção distal dos membros superiores, mas não obteve relação entre o diagnóstico molecular e essa forma clínica (HEDGE, 2001).

### 8.3 DOSAGENS ENZIMÁTICAS

No presente estudo, o aumento da enzima CK foi mais evidente nos pacientes com AME tipo III, corroborando as pesquisas de GOMEZ (1994), que afirma que, quanto maior a duração da doença, maior a tendência de se obterem níveis enzimáticos elevados (GOMEZ, 1994). Mesmo com esses valores aumentados, porém, eles não são compatíveis aos índices de CK descritos nas distrofias musculares de Becker e Duchenne (BUNDEY, 1992).

A segunda enzima descrita com valores mais elevados que o normal neste estudo foi a aldolase, contudo não há dados na literatura que valorizem este achado.

### 8.4 ELETRONEUROMIOGRAFIA

A interpretação dos resultados da EMG pode ser equivocada por algumas vezes, dependendo do examinador, principalmente quando o exame é realizado em crianças, pois a falta de cooperação e entendimento delas ocorre com grande frequência, acarretando desde exames aparentemente normais até mesmo com padrões miopáticos. BUNDEY (1992) e BOLTON (1996) já afirmavam que alguns pacientes poderiam desenvolver padrão misto, isto é, padrão neurogênico e miopático e, nestas situações, as alterações sugestivas para o diagnóstico de AME surgiriam somente com a evolução da doença e com a devida cooperação do paciente (BUNDEY, 1992; BOLTON, 1996).

Na AME, a substituição do tecido muscular por tecido fibroso e adiposo proporciona falhas na reinervação das formas agudas da doença, com diminuição da atividade de inserção, e os PAUM encontram-se ausentes na contração voluntária (BOLTON, 1996; BARISIC, 1998).

Nas formas mais crônicas de AME, a atividade elétrica espontânea na forma de fibrilação ocorre com menor frequência, podendo inclusive demonstrar-se normal em alguns casos de acometimento focal de AME (BOLTON, 1996).

A grande maioria dos pacientes do estudo atual, no entanto, foi compatível com o padrão de desinervação, principalmente naqueles pacientes com AME tipo III. BARISIC (1998) realizou estudo em 14 crianças com AME e descreveu diminuição da velocidade de condução nervosa motora e da amplitude dos PAUM, principalmente nos casos de AME tipo I e II, defendendo a teoria de que tais achados, se associados à deleção do NAIP e do SMN, propiciam clínica mais grave da doença (BARISIC, 1998). O padrão de desinervação também foi predominante em estudo realizado por KRAJEWSKA (2002), em 117 crianças com AME (KRAJEWSKA, 2002).

RENAULT (1996) preconiza que a EMG é um teste diagnóstico crucial no período neonatal, uma vez que as alterações na biópsia muscular nessa faixa etária podem se demonstrar errôneas (RENAULT, 1996). Entretanto, a EMG realizada em 4 pacientes da atual pesquisa demonstrou padrão miopático. Seus exames foram realizados com idade inferior a 24 meses de vida, o que pode ter influenciado no resultado final da EMG, já que sua interpretação depende muito da experiência do examinador e da cooperação da criança. BOLTON (1996) já afirmava que alguns pacientes apresentam baixa amplitude ao exame, com alguns componentes de alta frequência, padrão esse que poderia ser interpretado como sendo “miopático” (BOLTON, 1996).

## 8.5 BIÓPSIA MUSCULAR

Na AME, a biópsia muscular e a EMG costumam estar relacionadas em 93% dos casos (DAVID, 1994), índice semelhante ao encontrado no presente estudo. A biópsia muscular nos casos de AME demonstra, com grande frequência, grupos de fibras atroficas, arredondadas, intercaladas com grupos de fibras hipertróficas,

representadas principalmente pelas fibras tipo 1. RENAULT (1996), entretanto, relata casos da doença de Werdnig-Hoffmann sem a formação desses agrupamentos, enfatizando nessas situações a importância do emprego da EMG associado ao diagnóstico molecular (RENAULT, 1996).

OMRAN (1998) também descreve a ausência do padrão típico de desinervação nas biópsias musculares dos pacientes com a doença de Werdnig-Hoffmann, referindo predomínio de fibras do tipo 2 e sem hipertrofia de fibras do tipo 1 (OMRAN, 1998).

Nas formas crônicas da doença, as fibras atróficas tendem a formar pequenos grupos, com formato mais variável, podendo haver a ocorrência de fibras anguladas atróficas (DUBOWITZ, 1985; BUNDEY, 1992). Na presente pesquisa, os achados de fibras angulares atróficas e de fibras redondas atróficas dispersas foram relevantes quando elas estavam associadas com a deleção do éxon 8. A presença de núcleos internos, apesar de não ser característica nos casos de AME, mostrou-se significativa quando associada à deleção do NAIP. DUBOWITZ (1985) referia a possibilidade de encontrar essas alterações intrínsecas (núcleos internos, degeneração e divisões) nos casos de AME, predominantemente nas fibras hipertróficas tipo 2 (DUBOWITZ, 1985).

Nas amostras pesquisadas, a biópsia muscular esteve condizente com desinervação na grande maioria dos casos, assim como a EMG. Mesmo com o emprego desses exames complementares, BLACK, em 1974, citado por BUNDEY, 1992, já havia confirmado certas dificuldades diagnósticas no emprego desses métodos convencionais, uma vez que alguns pacientes podem desenvolver padrão misto (miopatia associada a características neurogênicas) (BUDEY, 1992). Esse fato pode ser constatado em alguns pacientes estudados nesta pesquisa (com AME tipo I e AME tipo II). Suas biópsias musculares demonstravam padrão misto, com maior predominância de desinervação, achado que, associado à clínica, contribuiu para a sugestão diagnóstica de AME na época.

A idade precoce da realização de tais exames complementares certamente pode interferir na precisão diagnóstica, e a falta de acompanhamento satisfatório dos

pacientes prejudica a observação da evolução da doença, assim como a confirmação diagnóstica dos mesmos. Indubitavelmente, o estudo molecular, nesses casos, poupa o tempo dispensado nas situações de incerteza, assim como diminui o risco de diagnósticos equivocados.

Não há dúvidas de que, neste estudo, o ideal seria a pesquisa do SMN e do NAIP antes da EMG e da biópsia muscular, pelo fato de que ambas são bem mais invasivas do que a realização do diagnóstico molecular.

A partir da elaboração desta pesquisa no Serviço de Doenças Neuromusculares, este exame tornou-se parte da rotina na investigação desses pacientes, proporcionando chances de uma abordagem mais adequada no futuro.

## 9 CONCLUSÕES

Em uma revisão sumária dos objetivos deste estudo, os seguintes propósitos foram abrangidos:

1. Introduzir o diagnóstico molecular na investigação de atrofia muscular espinhal por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase.
2. Comparar os resultados do diagnóstico molecular obtido nas amostras com os dados clínicos e os exames complementares dos respectivos pacientes.

Com tais objetivos, o presente estudo apresenta as seguintes conclusões:

1. Há estreita relação entre o diagnóstico clínico e o diagnóstico molecular.
2. O gene da proteína de sobrevivência do neurônio motor serve de referência para a pesquisa molecular, já que a sua deleção ocorreu em todos os casos (éxon 7, éxon 8 ou ambos).
3. A pesquisa do gene da proteína inibidora da apoptose neuronal (éxon 5) não contribui para a determinação do fenótipo, mas induz fraqueza muscular distal dos membros superiores e presença de núcleos internos na biópsia muscular.
4. As fibras angulares atroficas e as fibras redondas atroficas dispersas na biópsia muscular estão relacionadas com a deleção do éxon 8.

## REFERÊNCIAS

AERBAJINAI W, ISHIHARA T, ARAHATA K, TSUKAHARA H. Increased expression level of the splicing variant of SIP1 in motor neuron diseases. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34: 699-707.

AKUTSU T, NISHIO H, SUMINO K et al. Molecular genetics of spinal muscular atrophy: contribution of the NAIP gene to clinical severity. *Kobe J Med Sci* 2002; 48: 25-31.

AL-RAJEH S, MAJUMDAR R, AWADA A, AL-JUMAH M. Application of DNA-based tests for diagnosis of spinal muscular atrophy in Saudi Arabia. *East Mediterr Health J* 1999; 5: 1225-1229.

ASBURY AK, MCKHANN G, McDINALD WI. Inherited motor neuron diseases. In: *Diseases of the nervous system. Clinical Neurobiology*. 2<sup>nd</sup> Ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1992 .

BARISIC N, SERTIC J, BILLI C et al. Molecular analysis and electromyoneurographic abnormalities in Croatian children with proximal spinal muscular atrophies. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36:667-669.

BOLTON CF. Spinal muscular atrophies of childhood and adolescence. In: BOLTON CF; JONES HR JR; HARPER CM JR. *Pediatric Clinical Electromyography*. Philadelphia, Lippincott- Raven Publishers, 3: 105-122, 1996.

BRAHE C, SERVIDEI S, ZAPPATA S, RICCI E, TONALI P, NERI G. Genetic homogeneity between childhood-onset and adult-onset autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Lancet* 1995; 346: 741-742.

BUNDEY S. Spinal muscular atrophies (SMAs). *Genetics and Neurology*, 2<sup>nd</sup> Ed. New York: Churchill Livingstone, 1992.

BURGHES A, BRAHE C, COBBEN JM. Workshop Report. 59<sup>th</sup> EMG International Workshop: Spinal muscular atrophy: recent progress and revised diagnostic criteria, 17 –19 April 1998, Soestduinen, The Netherlands. *Neuromusc Disord* 1999; 9: 272 –278.

BURGHES A. Meeting Report. International SMA Consortium Meeting, 26 – 28 June 1992, Bonn, Germany. *Neuromusc Disord* 1992; 2: 423 –428.

BURGHES AHM. When is a deletion not a deletion? When it is converted. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 9 –15.

BÜRGLLEN L, AMIEL J, VIOLLET L et al. Survival motor neuron gene deletion in the arthrogyrosis multiplex congenita – Spinal muscular atrophy association. *J Clin Invest* 1996; 98: 1130-1132.

CAMPBELL SM, FIEDLER PN, PERSING DH. Nucleic acid amplification techniques in clinical diagnostics. In: ROSE NR, DE MACARIO EC. 4<sup>th</sup> Ed. Manual of clinical laboratory immunology. Washington DC, American Society for Microbiology. 5: p 27-36, 1992.

CAMPBELL L, POTTER A, IGNATIUS J, DUBOWITZ V, DAVIES K. Genomic variation and gene conversion in spinal muscular atrophy: implications for disease process and clinical phenotype. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 40-50.

CARPENTER S, KARPATI G. Denervation. In: ————. Pathology of skeletal muscle. 2<sup>nd</sup> Ed. New York: Oxford University Press, 2001. p. 630-647.

CORCIA P, KHORIS J, COURATIER P et al. SMN1 gene study in three families in which ALS and spinal muscular atrophy co-exist. *Neurol* 2002; 59: 1464-1466.

CUSCÓ I, BARCELÓ MJ, DEL RIO E et al. Characterization of SMN hybrid genes in Spanish SMA patients: de novo, homozygous and compound heterozygous cases. *Hum Genet* 2001; 108: 222-229.

CUSCÓ I, BARCELO MJ, BAIGET M, TIZZANO EF. Implementation of SMA carrier testing in genetic laboratories: comparison of two methods for quantifying the SMN1 gene. *Hum Mutat* 2002; 20: 452-459.

DAVID WS, JONES HR JR. Electromyography and biopsy correlation with suggested protocol for evaluation of the floppy infant. *Muscle Nerve* 1994; 17:424-430.

DEVRIENDT K, LAMMENS M, SCHOLLEN E et al. Clinical and molecular genetic features of congenital spinal muscular atrophy. *Ann Neurol* 1996; 40: 731-738.

DUBOWITZ LMS, DUBOWITZ V. Spinal muscular atrophy (SMA). In. *Muscle Biopsy: A Practical Approach*. 2<sup>nd</sup> Ed. Philadelphia; Saunders, 1985. p.254-258.

DUBOWITZ V, DANIELS RJ, DAVIES KE. Olivopontocerebellar hypoplasia with anterior horn cell involvement (SMA) does not localize to chromosome 5q. *Neuromusc Disord* 1995; 5: 25-29.

ECHANIZ-LAGUNA A, GUIRAUD-CHAUMEL C, TRANCHANT C et al. Homozygous exon 7 deletion of the SMN centromeric gene (SMN2): a potential susceptibility factor for adult-onset lower motor neuron disease. *J Neurol* 2002; 249: 290-293.

EISENSTEIN BI. The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N Engl J Med* 1990; 322: 178-183.

FRANKENBURG WK. Denver developmental screening test. *J Ped* 1967; 71: 181-191.

GALEA V, FEHLINGS D, KIRSCH S, McCOMAS A. Depletion and sizes of motor units in spinal muscular atrophy. *Muscle Nerve* 2001; 24: 1168-1172.

GAMBARDELLA A, MAZZEI R, TOSCANO A et al. Spinal muscular atrophy due to an isolated deletion of exon 8 of the telomeric survival motor neuron gene. *Ann Neur* 1998; 44: 836-839.

GOMEZ MR. Motor neuron diseases in children. In: ENGEL AG, FRANZINI-ARMSTRONG C. 2<sup>nd</sup> Ed. *Myology*. New York, McGraw-Hill, Inc. 70: 1837-1853, 1994.

HAUSMANOWA-PETRUSEWICZ I. Phenotype and genotype correlation in childhood spinal muscular atrophy. *Neurol Neurochir Pol* 2001; 35: 29-35.

JABLONKA S, ROSSOLL W, SCHRANK B, SENDTNER M. The role of SMN in spinal muscular atrophy. *J Neurol* 2000; 1: 137-142.

KIM CA; PASSOS-BUENO MR; MARIE SK et al. Clinical and molecular analysis of spinal muscular atrophy in Brazilian patients. *Genet and Molec Biol* 1999; 22: 487-492.

KRAJEWSKA G, HAUSMANOWA-PETRUSEWICZ I. Abnormal nerve conduction velocity as a marker of immaturity in childhood muscle spinal atrophy. *Folia Neuropathol* 2002; 40:67-74.

HEGDE MR, CHONG B, STEVENSON C, LAING NG, KHADILKAR S, LOVE DR. Clinical & genetic analysis of four patients with distal upper spinal muscular atrophy. *Indian J Med Res* 2001; 114: 141-147.

LAMBERT EH. Electromyograph and electric stimulation of peripheral nerves and muscle. In: *Clinical examinations in neurology by members of department of neurology and the department of Physiology and Biophysics, Mayo Clinic*. 5<sup>th</sup> Ed. Philadelphia; Saunders, 1981. p. 300-334.

LEFEBVRE S, BÜRGLER L, REBOULLET S et al. Identification and Characterization of a Spinal Muscular Atrophy – Determining gene. *Cell* 1995; 80: 155-165.

LEWIN B. Genes for SMA: Multum In Parvo. *Cell* 1995; 80: 1-5.

McANDREW PE, PARSONS DW, SIMARD LR et al. Identification of Proximal Spinal Muscular Atrophy Carriers and Patients by Analysis of SMN<sup>T</sup> and SMN<sup>C</sup> gene copy number. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 1411-1422.

MELKI J, ABDELHAK S, SHELTH P et al. Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. *Nature* 1990; 344: 767-768.

MELKI J, SHETH P, ABDELHAK S. Mapping of acute ( type I) spinal muscular atrophy to chromosome 5q12-q14. *Lancet* 1990; 336: 271-273.

MERLINI L, ESTOURNET-MATHIAUD B, IANNACCONE S. 90<sup>th</sup> ENMC International Workshop: European spinal muscular atrophy randomised trial (EuroSMART) 9-10 February 2001, Naarden, The Netherlands. *Neuromusc Disord* 2002; 12: 201-210.

MONANI UR, COOVERT DD, BURGHEES AH. Animal models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2451-2457.

NOVELLI G, SEMPRINI S, CAPON F, DALLAPICCOLA B. A possible role of NAIP gene deletions in sex-related spinal muscular atrophy phenotype variation. *Neurogenetics* 1997; 1:29-30.

OMRAN H, KETELSEN UP, HEINEN F et al. Axonal neuropathy and predominance of type II myofibers in infantile spinal muscular atrophy. *J Child Neurol* 1998; 13: 327-331.

ORRELL R, FIGLEWICZ DA. Clinical implications of the genetics of ALS and other motor neuron diseases. *Neurology* 2001; 57: 5-17.

RUDNIK-SCHÖNEBORN S, ROHRIG D, MORGAN G, WIRTH B, ZERRES K. Autosomal recessive proximal spinal muscular atrophy in 101 sibs out of 48 families: clinical picture, influence of gender, and genetic implications. *Am J Med Genet* 1994; 51: 70-76.

PELLIZZONI L, CHARROUX B, DREYFUSS G. SMN mutants of spinal muscular atrophy patients are defective in binding to snRNP proteins. *Proc Natl Sci* 1999; 96: 11167-11172.

RENAULT F, CHARTIER JP, HARPEY JP. Contribution of the electromyogram in the diagnosis of infantile spinal muscular atrophy in the neonatal period. *Arch Pediatr* 1996; 3:319-323.

ROY N, MAHADEVAN MS, McLEAN M et al. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 1995; 80: 167-178.

RUDNIK-SCHÖNEBORN S, FORKERT R, HAHNEN E, WIRTH B, ZERRES K. Clinical spectrum and diagnostic criteria of infantile spinal muscular atrophy: further delineation on the basis of SMN gene deletion findings. *Neuropediatrics* 1996; 27: 8-15.

SANVITO WL. Reflexos. In: —————. *Propedêutica neurológica básica*. 5 ed. Atheneu, 1996. p. 47-57.

SHAWKY RM, ABD-EL-ALEEM K, RIFAAT MM, MOUSTAFA A. Molecular diagnosis of spinal muscular atrophy in Egyptians. *East Mediterr Health J* 2001; 7: 229-237.

SOMERVILLE MJ, HUNTER AGW, AUBRY HL, KORNELUK RG, MacKENZIE AE, SURH LC. Clinical application of the molecular diagnosis of spinal muscular atrophy: deletions of neuronal apoptosis inhibitor protein and survival motor neuron genes. *Am J Med Genet* 1997; 69: 159-165.

SRIVASTAVA S, MUKHERJEE M, PANIGRAHI I, SHANKER PANDEY G, PRADHAN S, MITTAL B. SMN2-deletion in childhood-onset spinal muscular atrophy. *Am J Med Genet* 2001; 101:198-202.

STEWART H, WALLACE A, GAUGHRAN J, MOUNTFORD R, KINGSTON H. Molecular diagnosis of spinal muscular atrophy. *Arch Dis Child* 1998; 78: 531-535.

STRACHAN, READ T, READ AP. *Genética molecular humana*. 2 ed. São Paulo: Artmed, 1999.

SWINSCOW TDV. *Statistics at square one*. 9<sup>th</sup> Ed. BMJ Publishing Group, 1997.

TALBOT K. Spinal muscular atrophy. *J Inher Metab Dis* 1999; 22: 545-554.

THOMAS NH, DUBOWITZ V. The natural history of type I ( severe) spinal Muscular atrophy. *Neuromusc Disord* 1994; 4; 497-502.

TSAI CH, JONG YJ, HU CJ et al. Molecular analysis of SMN, NAIP and P44 gene of SMA patients and their families. *J Neurol Scien* 2001; 190: 35-40.

VRBOVÁ G, MELKI J. 103<sup>rd</sup> ENMC International Workshop: Designing rational therapy of SMA based on the understanding of its pathophysiology, 18-20 January 2002, Naarden, The Netherlands. *Neuromusc Disord* 2003; 13: 173-178.

VYAS S, BECHADE C, RIVEAU B, DOWNWARD J, TRILLER A. Involvement of survival motor neuron (SMN) protein in cell death. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 2751-2764.

WANG J, DREYFUSS G. Characterization of functional domains of the SMN protein *in vivo*. *J Biol Chem* 2001; 276: 45387-45393.

WILMSHURST JM, REYNOLDS L, VAN TOORN R, LEISEGANG F, HENDERSON R. Spinal muscular atrophy in black South Africans: concordant with the universal SMN1 genotype. *Clin Genet* 2002; 62: 165-168.

WIRTH B, SCHIMIDT T, HAHNEN E et al. De novo rearrangements founds in 2% of index patients with spinal muscular atrophy: mutational mechanisms, parenteral origin, mutation rate, and implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 1102-1111.

ZERRES K, WIRTH B, RUDNIK-SCHÖNEBORN S. Spinal Muscular Atrophy – clinical and genetic correlations. *Neuromusc Disord* 1997; 7: 202-207.

ZERRES K; RUDNIK-SCHÖNEBORN R. 93<sup>rd</sup> ENMC international workshop: non - 5q- spinal muscular atrophies ( SMA) – clinical picture ( 6-8 April 2001, Naarden, The Netherlands). *Neuromusc Disord* 2003; 13: 179-183.

**APÊNDICE E ANEXOS**

APÊNDICE - PROTOCOLO DE PESQUISA PARA A REVISÃO  
DE PRONTUÁRIOS DOS PACIENTES.

## Apêndice - Protocolo de pesquisa para a revisão de prontuários dos pacientes.

### PROTOCOLO

<b>1. Identificação</b>		<b>5. História Mórbita Atual</b>	
Nome		Idade de início da doença	
Data de nascimento		Idade da última consulta	
Data de óbito		Tempo de seguimento	
Número de prontuário		Escala de Vignos	
Número de biópsia muscular		Dores musculares	
Número da eletromiografia		Câimbras	
Sexo		<b>6. História Mórbita Familiar</b>	
Cor		Familiares com AME	
Tipo de AME		Familiares com doenças neuromusculares	
<b>2. Antecedentes ginecobstétricos</b>		Consanguinidade entre os pais	
Intercorrências		<b>7. Exame físico</b>	
Idade gestacional		a) Reflexos profundos	
Tônus muscular ao nascimento		Aquileu	
Choro ao nascimento		Patelar	
Sucção ao nascimento		Estilorradial	
<b>3. Desenvolvimento motor alcançado</b>		Bicipital	
Jamais sentou		Tricipital	
Sentou, mas não ficou em pé		b) Reflexos superficiais	
Ficou em pé, mas não andou		Cutâneo-abdominal	
Caminhou		Cutâneo-plantar	
<b>4. Desenvolvimento psicomotor</b>		c) Força muscular	
Desaparecimento do Moro		Membros superiores proximal	
Desaparecimento de preensão palmar		Membros superiores distal	
Desaparecimento de reflexo tônico cervical assimétrico		Membros inferiores proximal	
Firma a cabeça		Membros inferiores distal	
Sorriso social		d) Nervos cranianos	
Vira a cabeça em direção a ruído		e) Fasciculações de língua	
Acompanha objeto em movimento		f) Alterações sensitivas	
Alcança e segura objetos		<b>8. Exames complementares</b>	
Senta-se com apoio		CK	
Transfere objetos de uma mão para outra		LDH	
Engatinha		TGO	
Mantém-se em pé apoiada		TGP	
Estranha as pessoas		Aldolase	
Anda apoiada			
Fala duas palavras			
Sobe escadas			
Controle esfinteriano			

AME: atrofia muscular espinhal; CK: creatinoquinase; TGO: transaminase oxalacética; TGP: transaminase pirúvica; LDH: desidrogenase láctica.

**ANEXO 1 - RESULTADOS DAS DOSAGENS ENZIMÁTICAS EM CADA PACIENTE.**

**Anexo 1 - Resultados das dosagens enzimáticas em cada paciente.**

	CK	LDH	Aldolase	TGO	TGP
<b>AME tipo I</b>					
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	1,19	0	0	0
4	NR	0	NR	0	0
5	0	0	0	0	0
6	NR	NR	NR	NR	NR
7	NR	NR	1,5	0	0
8	0	0	NR	1,13	1,4
9	0	-9	1,9	0	0
<b>AME tipo II</b>					
10	0	0	0	0	0
11	NR	NR	NR	NR	NR
12	1,18	1,16	1,71	1,88	2
13	NR	NR	NR	0	NR
14	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0
19	0	1,1	NR	0	0
20	0	0	NR	0	0
21	0	0	0	0	0
22	1,1	NR	0	NR	NR
23	NR	NR	1,7	0	0
<b>AME tipo IIIa</b>					
24	0	2	0	0	0
25	0	0	0	0	0
26	NR	NR	NR	NR	NR
27	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0
30	0	0	NR	0	0
31	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0
33	4,11	NR	2,58	NR	NR
34	NR	NR	NR	NR	NR
35	NR	NR	NR	NR	NR
<b>AME tipo IIIb</b>					
36	1,4	0	1,35	1,6	NR
37	1,4	0	1,35	1,6	NR
38	4,2	0	2,18	0	0
39	2	NR	NR	NR	NR
40	5	1,3	2	0	0
41	NR	NR	NR	NR	NR
42	NR	NR	NR	NR	NR
43	0	0	0	0	0

AME: Atrofia muscular espinhal; CK: creatinoquinase; TGO: transaminase oxalacética; TGP: transaminase pirúvica; LDH: desidrogenase láctica; NR: não realizado.

**ANEXO 2 - ESTUDO DA CONDUÇÃO NERVOSA MOTORA  
(CNM) EM 16 PACIENTES COM AME.**



Estudo da CNM	Pacientes															
	7	8	18	19	20	21	23	28	29	31	32	33	34	41	42	43
<b>Nervo Fibular direito</b>																
Latência distal (ms)	3,12	3,84	4,2	-	4,2	3,84	3,36	3,6	3,2	3,66	3,48	7,7	5,7	-	3,44	4,98
Latência proximal (ms)	4,52	7,44	7,0	-	8,2	6,4	3,72	7,0	7,56	6,96	5,64	3,5	3,4	-	7,48	10,3
Amplitude distal (μV)	670	2400	2000	-	3000	3500	2770	2000	16000	4200	2800	4000	4000	-	11700	19300
Amplitude proximal (μV)	620	2500	1600	-	2000	4000	2470	2000	14000	4030	2530	4000	4000	-	11600	11800
Velocidade (m/s)	42,9	47,2	67	-	53,0	48,0	167	52,9	55,0	59,1	58	52,9	43,1	-	58,16	54,0
Duração distal (ms)	6,0	7,7	6,0	-	9,0	6,72	8,4	6,0	8,92	11,0	9,11	12,0	12,0	-	8,4	13,0
Duração proximal (ms)	6,0	7,7	8,0	-	9,0	7,68	11,8	6,0	9,6	11,0	9,77	12,0	12,0	-	8,6	15,1
Distância (cm)	6,0	17	19,0	-	21,5	12,0	6,0	18,0	24,0	19,0	15,0	22,0	10,0	-	23,0	28,5
Onda F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50,0
<b>Nervo Fibular esquerdo</b>																
Latência distal (ms)	-	-	-	4,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,9	-	-
Latência proximal (ms)	-	-	-	9,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,3	-	-
Amplitude distal (μV)	-	-	-	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4000	-	-
Amplitude proximal (μV)	-	-	-	230	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4000	-	-
Velocidade (m/s)	-	-	-	44,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	48,0	-	-
Duração distal (ms)	-	-	-	4,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,5	-	-
Duração proximal (ms)	-	-	-	4,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,0	-	-
Distância (cm)	-	-	-	11,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24,0	-	-
Onda F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Nervo Tibial posterior direito</b>																
Latência distal (ms)	-	4,12	-	-	-	3,12	-	-	3,0	3,72	3,9	-	-	-	3,2	5,4
Latência proximal (ms)	-	9,4	-	-	-	6,72	-	-	8,0	8,94	6,72	-	-	-	9,16	15,1
Amplitude distal (μV)	-	3500	-	-	-	1500	-	-	16000	8800	14400	-	-	-	16100	22700
Amplitude proximal (μV)	-	3000	-	-	-	1800	-	-	14000	7800	14300	-	-	-	10300	22200
Velocidade (m/s)	-	41,7	-	-	-	53,0	-	-	58,2	51,7	70,9	-	-	-	51,17	46,4
Duração distal (ms)	-	9,0	-	-	-	3,44	-	-	9,2	11,0	11,2	-	-	-	9,2	16,4
Duração proximal (ms)	-	9,0	-	-	-	5,92	-	-	8,8	11,0	11,7	-	-	-	10,0	20,4
Distância (cm)	-	22,0	-	-	-	15,0	-	-	30,0	27,0	20,0	-	-	-	30,5	45,0
Onda F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	56,3
Reflexo H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30,8
<b>Nervo Tibial posterior esquerdo</b>																
Latência distal (ms)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,08
Latência proximal (ms)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15,0
Amplitude distal (μV)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12400
Amplitude proximal (μV)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8530
Velocidade (m/s)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	45,9
Duração distal (ms)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,0
Duração proximal (ms)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16,5
Distância (cm)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	45,5
Onda F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	54,4
Reflexo H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31,4

CNM condução nervosa motora, AME atrofia muscular espinal

ANEXO 3 - ESTUDO DA CONDUÇÃO NERVOSA SENSITIVA  
(CNS) EM 16 PACIENTES COM AME.



Estudo da CNS	Pacientes															
	7	8	18	19	20	21	23	28	29	31	32	33	34	41	42	43
<b>Nervo Sural direito</b>																
Latência distal (ms)	2,28	-	2,7	-	3,3	-	2,2	2,1	2,0	2,16	2,16	5,0	2,4	-	1,92	3,68
Latência proximal (ms)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,96	-	2,3	-	-	4,36	5,4
Amplitude distal ( $\mu$ V)	5,0	-	15,0	-	20,0	-	26,0	20,0	20,0	25,0	32,0	20,0	15,0	-	50,0	20,7
Amplitude proximal ( $\mu$ V)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17,0	-	-	-	-	12,7	16,0
Velocidade (m/s)	38,0	-	48,0	-	42,0	-	40,9	66,6	70,0	50,0	46,2	56,66	41,66	-	57,37	46,5
Duração distal (ms)	1,56	-	1,8	-	1,5	-	1,48	2,0	1,8	1,98	1,68	2,0	2,0	-	1,32	2,12
Duração proximal (ms)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,86	-	-	-	-	1,24	2,12
Distância (cm)	8,5	-	13,0	-	14,0	-	9,0	14,0	14,0	9,0	10,0	17,0	10,0	-	14,0	8,0
<b>Nervo Sural esquerdo</b>																
Latência distal (ms)	-	-	-	2,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,0	-	3,88
Latência proximal (ms)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,1	-	5,72
Amplitude distal ( $\mu$ V)	-	-	-	15,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60,0	-	19,8
Amplitude proximal ( $\mu$ V)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13,5	-	-	40,0	-	-
Velocidade (m/s)	-	-	-	39,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	72,0	-	43,5
Duração distal (ms)	-	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,2	-	2,4
Duração proximal (ms)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,3	-	2,16
Distância (cm)	-	-	-	9,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,0	-	8,0

CNS: condução nervosa sensitiva, AME: atrofia muscular espinhal

**ANEXO 4 - ESTUDO DA ELETROMIOGRAFIA (EMG)  
EM 16 PACIENTES COM AME.**

#### Anexo 4 - Estudo da eletromiografia (EMG) em 16 pacientes com AME.

	7	8	18	19	20	21	23	28	29	31	32	33	34	41	42	43
Ano de realização do exame	1995	1997	1991	1991	1992	1993	1996	1990	1996	1995	1995	1995	1996	1991	1995	1995
<b>Músculo Tibial anterior direito</b>																
<b>Atividade em repouso:</b>																
Atividade de inserção	↑	↑	-	-	-	↑	N	N	N	↑	N	N	N	-	↑	N
Fibrilações	++	+	-	-	-	+++	0	0	+	++	++	+	+	-	+++	0
Ondas Positivas	++	+	-	-	-	+++	0	0	+	++	+	+	+	-	+++	0
Fasciculações	0	0	-	-	-	0	0	0	+	0	+	0	0	-	0	++
Descargas repetitivas	0	0	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
Descargas miotônicas	0	0	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
<b>Potenciais Unidade Motora:</b>																
Duração (ms)	9,88	12,76	-	-	-	15,2	-	14,0	15,4	16,08	11,32	20,0	17,0	-	12,8	13,94
Amplitude (µV)	900	1470	-	-	-	2000	1230	1000	2200	3600	1800	3000	2000	-	650	3100
Polifásicos curtos	0	0	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
Polifásicos longos	++	+++	-	-	-	++	0	+++	0	+++	+	+++	++	-	++	+
Recrutamento	↓	↓	-	-	-	↓	↓	↓	↓	↓	N	↓	↓	-	↓	↓↓↓
<b>Músculo Tibial anterior esquerdo</b>																
<b>Atividade em repouso:</b>																
Atividade de inserção	-	-	-	N	N	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	N
Fibrilações	-	-	-	++	0	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Ondas Positivas	-	-	-	++	0	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Fasciculações	-	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	0
Descargas repetitivas	-	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	0
Descargas miotônicas	-	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	0
<b>Potenciais Unidade Motora:</b>																
Duração (ms)	-	-	-	9,0	9,0	-	-	-	-	-	-	-	-	15,0	-	12,37
Amplitude (µV)	-	-	-	1000	700	-	-	-	-	-	-	-	-	1000	-	4100
Polifásicos curtos	-	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	0
Polifásicos longos	-	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	+
Recrutamento	-	-	-	N	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	↓↓
<b>Músculo Gastrocnêmio direito</b>																
<b>Atividade em repouso:</b>																
Atividade de inserção	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	N
Fibrilações	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	0
Ondas Positivas	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0
Fasciculações	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	0
Descargas repetitivas	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0
Descargas miotônicas	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0

Estudo da EMG	Pacientes															
	7	8	18	19	20	21	23	28	29	31	32	33	34	41	42	43
<b>Potenciais Unidade</b>																
<b>Motora:</b>																
Duração (ms)	-	-	-	-	-	-	-	-	17,0	-	-	-	-	-	-	11,15
Amplitude ( $\mu$ V)	-	-	-	-	-	-	-	-	2400	-	-	-	-	-	-	2000
Polifásicos curtos	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0
Polifásicos longos	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	+
Recrutamento	-	-	-	-	-	-	-	-	↓↓	-	-	-	-	-	-	↓
<b>Músculo Gastrocnêmio esquerdo</b>																
<b>Atividade em repouso:</b>																
Atividade de inserção	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fibrilações	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ondas Positivas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fasciculações	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Descargas repetitivas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Descargas miotônicas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Potenciais Unidade</b>																
<b>Motora:</b>																
Duração (ms)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amplitude ( $\mu$ V)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Polifásicos curtos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Polifásicos longos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Recrutamento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Músculo Quadríceps direito</b>																
<b>Atividade em repouso:</b>																
Atividade de inserção	↑	↑	-	-	-	↑	N	N	N	↑	N	N	N	-	↑	N
Fibrilações	++	++	-	-	-	+++	0	0	0	+	+	+	++	-	++	0
Ondas Positivas	+	++	-	-	-	+++	0	0	0	+	0	+	+	-	++	0
Fasciculações	0	0	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	++
Descargas repetitivas	0	0	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
Descargas miotônicas	0	0	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
<b>Potenciais Unidade</b>																
<b>Motora:</b>																
Duração (ms)	12,76	13,94	13,0	-	-	-	-	13,0	17,0	14,4	11,44	23,0	14,0	-	13,06	14,31
Amplitude ( $\mu$ V)	1000	1530	1000	-	-	-	-	1000	720	5600	1330	2500	1700	-	570	3300
Polifásicos curtos	0	0	0	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	-	0	0
Polifásicos longos	++	+++	+++	-	-	-	-	+++	0	+++	0	+++	++	-	++	0
Recrutamento	↓	↓	↓	-	-	-	-	↓	↓↓	↓	N	↓	↓	-	↓	↓↓

Estudo da EMG	Pacientes															
	7	8	18	19	20	21	23	28	29	31	32	33	34	41	42	43
<b>Músculo Quadríceps esquerdo</b>																
<b>Atividade em repouso:</b>																
Atividade de inserção	-	-	-	N	N	-	-	-	-	-	-	N	-	N	-	N
Fibrilações	-	-	-	++	0	-	-	-	-	-	-	++	-	+	-	0
Ondas Positivas	-	-	-	++	0	-	-	-	-	-	-	+	-	0	-	0
Fasciculações	-	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	0	-	+	-	0
Descargas repetitivas	-	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	0	-	0	-	0
Descargas miotônicas	-	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	0	-	0	-	0
<b>Potenciais Unidade Motora:</b>																
Duração (ms)	-	-	-	12,0	13,0	-	-	-	-	-	-	25,0	-	17,0	-	12,37
Amplitude (µV)	-	-	-	600	500	-	-	-	-	-	-	3000	-	1000	-	4100
Polifásicos curtos	-	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	0	-	0	-	0
Polifásicos longos	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-	+	-	+++	-	+
Recrutamento	-	-	-	↓	↓	-	-	-	-	-	-	↓	-	↓	-	↓↓
<b>Músculo Bíceps direito</b>																
<b>Atividade em repouso:</b>																
Atividade de inserção	↑	↑	0	-	-	↑	N	N	N	↑	N	N	N	-	↑	N
Fibrilações	+++	++	0	-	-	+++	0	+	0	+++	0	+	0	-	+++	0
Ondas Positivas	0	++	0	-	-	+++	0	+	0	+++	0	+	0	-	++	0
Fasciculações	0	0	0	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
Descargas repetitivas	0	0	0	-	-	0	0	0	0	0	+	0	0	-	0	0
Descargas miotônicas	0	0	0	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
<b>Potenciais Unidade Motora:</b>																
Duração (ms)	11,74	12,24	15,0	-	-	14,6	-	10,0	15,0	15,28	10,68	20,0	13,0	-	11,92	12,75
Amplitude (µV)	1300	770	3000	-	-	1000	670	500	860	3800	2000	3000	1500	-	570	1500
Polifásicos curtos	0	0	0	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
Polifásicos longos	+++	+++	+++	-	-	++	0	++	0	+++	0	+++	++	-	++	0
Recrutamento	↓	↓	N	-	-	↓	↓	N	↓	↓	N	↓	↓	-	↓	↓
<b>Músculo Bíceps esquerdo</b>																
<b>Atividade em repouso:</b>																
Atividade de inserção	-	-	-	N	N	-	-	-	-	-	-	-	N	↑	-	N
Fibrilações	-	-	-	++	0	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	0
Ondas Positivas	-	-	-	++	0	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	0
Fasciculações	-	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	0	++	-	0
Descargas repetitivas	-	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	0	0	-	0
Descargas miotônicas	-	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	0	0	-	0



Estudo da EMG	Pacientes															
	7	8	18	19	20	21	23	28	29	31	32	33	34	41	42	43
<b>Músculo 1° interósseo direito</b>																
<b>Atividade em repouso:</b>																
Atividade de inserção		↑	-	-	-	-	-	-	-	↑	N	-	-	-	↑	N
Fibrilações	-	++	-	-	-	-	-	-	-	+	0	-	-	-	++	0
Ondas Positivas	-	++	-	-	-	-	-	-	-	+	0	-	-	-	++	0
Fasciculações	-	0	-	-	-	-	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0
Descargas repetitivas	-	0	-	-	-	-	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0
Descargas miotônicas	-	0	-	-	-	-	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0
<b>Potenciais Unidade Motora:</b>																
Duração (ms)	-	12,56	-	-	-	-	-	-	-	13,36	9,14	-	-	-	8,76	10,42
Amplitude (μV)	-	1200	-	-	-	-	-	-	-	4200	1400	-	-	-	500	2200
Polifásicos curtos	-	0	-	-	-	-	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0
Polifásicos longos	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	++	0	-	-	-	+	0
Recrutamento	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	↓	N	-	-	-	↓	N
<b>Músculo 1° interósseo esquerdo</b>																
<b>Atividade em repouso:</b>																
Atividade de inserção	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	N
Fibrilações	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	0
Ondas Positivas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	0
Fasciculações	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	0
Descargas repetitivas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	0
Descargas miotônicas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	0
<b>Potenciais Unidade Motora:</b>																
Duração (ms)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,0	-	10,96
Amplitude (μV)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2000	-	1200
Polifásicos curtos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	0
Polifásicos longos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	0
Recrutamento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	N
<b>Músculo Deltóide direito</b>																
<b>Atividade em repouso:</b>																
Atividade de inserção	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	N	-	-	-
Fibrilações	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	0	-	-	-
Ondas Positivas	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	0	-	-	-
Fasciculações	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	0	-	-	-
Descargas repetitivas	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	0	-	-	-
Descargas miotônicas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-





Estudo da EMG	Pacientes															
	7	8	18	19	20	21	23	28	29	31	32	33	34	41	42	43
<b>Potenciais Unidade</b>																
<b>Motora:</b>																
Duração (ms)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amplitude ( $\mu$ V)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Polifásicos curtos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Polifásicos longos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Recrutamento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Músculo Abdutor curto do polegar direito</b>																
<b>Atividade em repouso:</b>																
Atividade de inserção	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-
Fibrilações	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-
Ondas Positivas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-
Fasciculações	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Descargas repetitivas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Descargas miotônicas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-
<b>Potenciais Unidade</b>																
<b>Motora:</b>																
Duração (ms)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18,0	-	-	-	-
Amplitude ( $\mu$ V)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2500	-	-	-	-
Polifásicos curtos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Polifásicos longos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
Recrutamento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	-
<b>Músculo Abdutor curto do polegar esquerdo</b>																
<b>Atividade em repouso:</b>																
Atividade de inserção	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fibrilações	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ondas Positivas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fasciculações	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Descargas repetitivas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Descargas miotônicas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Potenciais Unidade</b>																
<b>Motora:</b>																
Duração (ms)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amplitude ( $\mu$ V)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Polifásicos curtos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Polifásicos longos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Recrutamento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

EMG eletromiografia, AME atrofia muscular espinhal

## ANEXO 5 - TÉCNICA EMPREGADA NA REALIZAÇÃO DAS BIÓPSIAS MUSCULARES

**Anexo 5 - Técnica empregada na realização das biópsias musculares.**

1. Tricotomia da região
2. Antissepsia da pele com polvedine degermante, depois éter e álcool iodado
3. Anestesia local com xilocaína a 1% para crianças e a 2% para os adultos, sem vasoconstritor, atingindo-se apenas a pele e o tecido celular subcutâneo, sem infiltrar o músculo.
4. Incisão da pele e do tecido celular subcutâneo afastando-se a fáscia muscular.
5. Retirada de um fragmento de músculo de aproximadamente 1,0cm x 0,5cm x 0,5cm.
6. Embebição do fragmento muscular em gaze com soro fisiológico logo após a retirada e transporte ao laboratório.
7. Hemostasia do músculo.
8. Fechamento da fáscia com fio categute e sutura da pele com fio de algodão.
9. Curativo compressivo.

**ANEXO 6 - RESULTADOS ANATOMOPATOLÓGICOS  
NOS PACIENTES COM AME DO TIPO I.**

**Anexo 6 - Resultados anatomopatológicos nos pacientes com AME do tipo I.**

	Biópsia								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Coloração HE e Gomori Modificado									
<b>Músculo Estudado</b>	G	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
Proliferação de tecido conjuntivo	++	+++	N	+	+++	N	+	N	N
<b>Infiltração de tecido adiposo</b>	++	++	+	++	+++	+	N	+	N
Variação do diâmetro das fibras	N	0	0	0	0	N	N	N	N
Grandes aglomerados de fibras atroficas	++	++	+++	N	0	+++	+++	+++	+++
Pequenos aglomerados de fibras atroficas	N	++	N	N	0	N	++	N	N
Fibras anguladas atroficas	++	N	N	++	0	N	++	+	N
Fibras redondas atroficas dispersas	++	++	N	++	0	+	++	++	N
Fibras hipertroficas dispersas	N	++	+++	+	0	N	++	++	+
Núcleos centrais	+	++	N	+	0	N	N	N	N
<b>Grupos nucleares</b>	+++	N	N	+	0	N	N	N	N
Necrose	N	+	N	N	0	N	+	N	+
Fagocitose	N	+	N	N	0	N	+	N	+
Fibras hipercontráteis	N	+	N	N	0	N	N	N	N
Coloração NADH									
<b>Fibras anguladas atroficas</b>	+++	+	N	N	0	N	+++	N	N
Saca-bocados	N	N	N	N	0	N	N	+	N
Enrodlhamentos	N	N	+	N	0	N	N	N	N
Esterase inespecifica									
<b>Fibras anguladas atroficas</b>	+++	+	+	N	0	N	+++	+	N
ATPases pH 9,4/ 4,3/ 4,6									
Agrupamentos	+	N	++	N	0	++	+++	++	N
Predomínio de fibras tipo II	+	N	N	N	0	N	N	N	N
Hipertrofia de fibras tipo I	+	+	+	+	0	+	+	+	+
Hipertrofia de fibras tipo II	N	+	N	+	0	N	+	N	+
Atrofia de fibras tipo I	+	+	+	+	0	+	+	+	+
Atrofia de fibras tipo II	+	+	N	+	0	+	+	+	+
Fosfatase ácida									
<b>Aumento focal de fibras</b>	++	++	N	N	0	+	++	N	++
Fibras positivas	+	++	+	N	0	+	++	N	N
Fosfatase alcalina									
Fibras positivas	+	+	++	N	0	+	++	++	+
Sirus red	0	+++	+	N	0	N	N	N	0
<b>Adenilato deaminase</b>	0	N	N	0	0	+	N	N	0

0 = não realizado; N = normal, + = discreto ou raro, ++ = ocasional ou moderado, +++ = grave, frequente ou abundante. G = gastrocnêmio, Q = quadriceps, B = bíceps braquial

**ANEXO 7 - RESULTADOS ANATOMOPATOLÓGICOS  
NOS PACIENTES COM AME DO TIPO II.**

**Anexo 7 - Resultados anatomopatológicos nos pacientes com AME do tipo II.****Biópsia**

	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
<b>Coloração HE e Gomori Modificado</b>														
Músculo Estudado	G	Q	B	Q	Q	Q	Q	Q	B	Q	Q	Q	Q	B
Proliferação de tecido conjuntivo	+++	N	N	N	N	+	N	++	++	+	N	N	+++	+
Infiltração de tecido adiposo	++	N	N	N	N	++	N	++	+++	+++	N	++	+++	N
Variação do diâmetro das fibras	N	N	N	N	+	N	++	N	N	0	N	0	N	0
Grandes aglomerados de fibras atroficas	N	N	N	N	N	+++	N	N	N	++	N	+++	+++	+++
Pequenos aglomerados de fibras atroficas	++	N	N	N	N	N	N	++	N	N	N	N	N	N
Fibras anguladas atroficas	N	N	N	+	++	++	N	N	+	N	N	N	++	N
Fibras redondas atroficas dispersas	++	N	++	+	++	++	++	++	++	++	N	+++	++	+++
Fibras hipertroficas dispersas	++	N	++	N	N	++	++	+	+	+	N	+	++	N
Núcleos centrais	++	N	N	N	N	N	N	N	+	N	N	N	N	N
Grupos nucleares	N	N	N	N	+	++	N	N	+	+++	N	N	+++	N
Necrose	+	N	N	N	N	N	N	N	+	N	N	N	N	N
Fagocitose	+	N	N	N	N	N	N	N	+	N	N	N	N	N
Massas sarcoplasmáticas	N	N	N	N	+	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Fibras hipercontráteis	+	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<b>Coloração NADH</b>														
Fibras anguladas atroficas	+	N	N	N	+	N	N	N	++	N	N	N	+	N
Saca-bocados	N	N	N	N	N	+	N	N	N	N	N	N	N	N
Aumento focal de NBT reduzido	N	N	N	N	N	N	N	+	N	N	++	N	N	N
Turbilhões	N	N	N	N	N	N	N	N	+	N	N	N	N	+
Anéis	N	N	N	N	+	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<b>Esterase inespecifica</b>														
Fibras anguladas atroficas	+	N	+	N	++	+++	N	N	+++	N	+	N	+	+
Aumento de atividade no interstício	N	N	N	N	N	N	N	+	N	N	N	N	N	N
<b>ATPases pH 9,4/ 4,3/ 4,6</b>														
Agrupamentos	N	N	++	N	N	+++	N	N	N	N	N	N	++	N
Predomínio de fibras tipo II	N	N	+	N	N	N	N	+	N	N	N	N	N	+
Hipertrofia de fibras tipo I	+	N	+	N	N	N	+	+	+	+	N	+	+	N
Hipertrofia de fibras tipo II	+	N	+	N	N	+	+	+	+	N	N	N	+	N
Atrofia de fibras tipo I	+	N	+	N	N	++	+	+	++	+	++	+	N	+
Atrofia de fibras tipo II	+	N	+	++	++	++	+	+	+	+	+	+	++	+
<b>Fosfatase ácida</b>														
Aumento focal de fibras	++	N	++	N	+	N	N	N	++	N	+	N	N	N
Fibras positivas	++	N	N	N	N	N	N	N	++	++	N	+	+	+
Aumento no interstício	N	N	N	N	+	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<b>Fosfatase alcalina</b>														
Fibras positivas	+	N	N	N	N	N	N	N	.	.	N	N	+	+
Aumento no interstício	N	N	N	N	N	N	N	N	.	N	N	N	N	N
Sirius red	+++	N	+	N	N	0	N	N	.	N	N	N	+++	N
Adenilato deaminase	N	N	N	N	N	0	0	0	N	++	N	N	N	N

0 = não realizado, N = normal, + = discreto ou raro, ++ = ocasional ou moderado, +++ = grave, frequente ou abundante. G = gastrocnêmio, Q = quadríceps, B = bíceps braquial

**ANEXO 8 - RESULTADOS ANATOMOPATOLÓGICOS  
NOS PACIENTES COM AME DO TIPO IIIa.**

**Anexo 8 - Resultados anatomopatológicos nos pacientes com AME do tipo IIIa.****Biópsia**

	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
<b>Coloração HE e Gomori Modificado</b>												
Músculo Estudado	Q	Q	B	G	Q	Q	Q	Q	G	B	Q	Q
Proliferação de tecido conjuntivo	N	+	N	N	N	++	N	N	N	N	N	N
Infiltração de tecido adiposo	N	++	N	N	N	++	++	++	+++	N	N	N
Variação do diâmetro das fibras	0	0	0	N	0	N	N	++	N	0	N	N
Grandes aglomerados de fibras atroficas	N	N	N	+++	N	++	+++	+	+++	+++	+++	N
Pequenos aglomerados de fibras atroficas	N	N	N	++	N	N	N	+	N	N	N	N
Fibras anguladas atroficas	+	++	N	++	+	N	N	+++	N	N	++	++
Fibras redondas atroficas dispersas	+	++	N	++	+	++	++	0	+++	++	++	++
Fibras hipertróficas dispersas	+	++	++	+	N	++	+	N	N	+	++	N
Núcleos centrais	N	++	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
Grupos nucleares	N	++	N	N	N	+	N	N	N	N	N	N
Necrose	N	N	N	N	N	N	N	N	+	N	N	N
Fibras basofílicas	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
Fibras hipercontráteis	N	N	N	N	+	N	N	N	N	N	N	N
<b>Coloração NADH</b>												
Fibras anguladas atroficas	N	+	+	+	N	+	N	+	N	N	N	+
Saca-bocados	N	N	N	N	+	N	N	N	N	N	N	N
Aumento focal de NBT reduzido	N	++	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Turbilhões	N	N	N	N	++	N	N	N	N	N	N	N
<b>Esterase inespecífica</b>												
Fibras anguladas atroficas	0	++	+++	+	+	N	N	+	N	N	N	N
<b>ATPases pH 9,4/ 4,3/ 4,6</b>												
Agrupamentos	0	N	N	++	+	N	N	+++	N	N	+	N
Predomínio de fibras tipo I	0	++	+	N	+	N	N	N	N	N	N	N
Predomínio de fibras tipo II	0	N	N	+	N	N	+	N	N	N	N	N
Hipertrofia de fibras tipo I	0	+++	+++	N	N	N	N	+	N	+	++	N
Hipertrofia de fibras tipo II	0	N	+	N	+	++	+	+	N	+	+	N
Atrofia de fibras tipo I	0	+++	+++	+	+	N	+	+	+	++	+	+++
Atrofia de fibras tipo II	0	N	+	+	+	N	+	+	+++	+	+	N
<b>Fosfatase ácida</b>												
Aumento focal de fibras	N	++	+	N	+	N	+	++	N	N	+	N
Fibras positivas	N	N	+	N	+	N	N	+	N	N	+	+
<b>Fosfatase alcalina</b>												
Fibras positivas	N	N	+	N	+	N	N	+	N	N	+	+
Aumento no interstício	N	N	+	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Aumento nos nervos	N	N	+	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<b>Oil red</b>												
Citocromo C-oxidase	0	0	N	N	N	N	·	N	0	N	N	N
Sirius red	0	0	N	N	+	N	·	N	0	N	N	+
Adenilato deaminase	0	0	0	N	+	N	·	N	0	+	+	N

0 = não realizado; N = normal; + = discreto ou raro, ++ = ocasional ou moderado, +++ = grave, frequente ou abundante, G = gastrocnêmio, Q = quadríceps, B = bíceps braquial

**ANEXO 9 - RESULTADOS ANATOMOPATOLÓGICOS  
NOS PACIENTES COM AME DO TIPO IIIb.**

**Anexo 9 - Resultados anatomopatológicos nos pacientes com AME do tipo IIIb.**

<b>Biópsia</b>								
	<b>36</b>	<b>37</b>	<b>38</b>	<b>39</b>	<b>40</b>	<b>41</b>	<b>42</b>	<b>43</b>
<b>Coloração HE e Gomori Modificado</b>								
Músculo Estudado	B	Q	Q	B	B	Q	Q	B
Proliferação de tecido conjuntivo	N	N	+	N	N	N	+++	N
Infiltração de tecido adiposo	N	N	+	N	N	+	+++	N
Grandes aglomerados de fibras atroficas	+	+	N	N	N	+++	+++	+++
Pequenos aglomerados de fibras atroficas	+	+	+++	N	N	N	N	N
Fibras anguladas atroficas	++	++	++	++	++	++	N	N
Fibras redondas atroficas dispersas	++	++	++	N	N	++	N	+++
Fibras hipertróficas dispersas	++	++	++	+	+	++	+++	+++
Núcleos centrais	+	+	++	+	N	N	N	N
Grumos nucleares	+++	+++	+	+	N	N	N	N
Necrose	+	+	+	N	N	N	N	N
Fagocitose	N	N	+	N	N	N	N	N
Fibras hipercontráteis	+	+	N	N	N	N	N	N
<b>Coloração NADH</b>								
Fibras anguladas atroficas	+	+	++	N	+++	N	N	N
Saca-bocados	+	+	N	+	N	N	N	N
Aumento focal de NBT reduzido	+	+	N	N	N	+	N	++
Turbilhões	N	N	+	N	N	N	+	N
Enrodilhamentos	N	N	+	N	N	N	N	N
Anéis	N	N	N	N	N	N	N	+++
<b>Esterase inespecifica</b>								
Fibras anguladas atroficas	+	+	++	N	+++	N	N	N
<b>ATPases pH 9,4/ 4,3/ 4,6</b>								
Agrupamentos	++	++	++	++	N	++	++	N
Predomínio de fibras tipo I	+	+	N	N	N	N	N	N
Hipertrofia de fibras tipo I	+	+	+	N	N	+	+	+
Hipertrofia de fibras tipo II	N	N	+	+	N	N	N	N
Atrofia de fibras tipo I	+	+	+	+	+	+	+	+
Atrofia de fibras tipo II	+	+	+	N	++	++	N	+
<b>Fosfatase ácida</b>								
Aumento focal de fibras	+	+	N	+	++	+	N	+++
Fibras positivas	+	+	N	N	++	++	+	N
<b>Fosfatase alcalina</b>								
Fibras positivas	N	N	N	N	N	++	N	N
<b>Desidrogenase succínica</b>								
Acúmulo subsarcolemal	+	+	N	N	N	+	N	N
<b>Citocromo C-oxidase</b>								
Sirius red	N	N	+	+	N	N	++	N

0 = não realizado; N = normal, + = discreto ou raro, ++ = ocasional ou moderado, +++ = grave, freqüente ou abundante, G = gastrocnêmio, Q = quadriceps, B = bíceps braquial

**ANEXO 10 - OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS PARA A PESQUISA  
DO NAIP E DO SMN (SOMERVILLE, 1997; LEFEBVRE, 1995).**

**Anexo 10 - Oligonucleotídeos utilizados para a pesquisa do NAIP e do SMN  
(SOMERVILLE, 1997; LEFEBVRE, 1995)**

NAIP	<i>Éxon 5 forward</i>	5' CCG CTG GGT TTT ACT TCA CTG 3'
	<i>Éxon 5 reverse</i>	5' CCG GCA CCA AAG AGG ATT AG 3'
SMN	<i>Éxon 7 forward</i>	5' AGA CTA TCA ACT TAA TTT CTG ATC A 3'
	<i>Éxon 7 reverse</i>	5' TAA GGA ATG TGA GCA CCT TCC TTC 3'
	<i>Éxon 8 forward</i>	5' GTA ATA ACC AAA TGC AAT GTG AA 3'
	<i>Éxon 8 reverse</i>	5' CTA CAA CAC CCT TCT CAC AG 3'

NAIP: proteína inibidora da apoptose neuronal; SMN: proteína de sobrevivência do neurônio motor;  
A: adenina; C: citosina; G: guanina; T: timina

**ANEXO 11 - QUANTIDADE CALCULADA PARA CADA  
ÉXON A SER EMPREGADA NA PCR.**

**Anexo 11 - Quantidade calculada para cada éxon a ser empregada na PCR.**

NAIP	Éxon 5 <i>forward</i>	35pMoles
	Éxon 5 <i>reverse</i>	35pMoles
SMN	Éxon 7 <i>forward</i>	35pMoles
	Éxon 7 <i>reverse</i>	35pMoles
	Éxon 8 <i>forward</i>	35pMoles
	Éxon 8 <i>reverse</i>	35pMoles

NAIP: proteína inibidora da apoptose neuronal; SMN: proteína de sobrevivência do neurônio motor; A: adenina; C: citosina; G: guanina; T: timina

**ANEXO 12 - ACHADOS DE CONCENTRAÇÃO E PUREZA DAS RESPECTIVAS  
AMOSTRAS SUSCETÍVEIS AO DIAGNÓSTICO MOLECULAR.**

**Anexo 12 - Achados de concentração e pureza das respectivas amostras suscetíveis ao diagnóstico molecular.**

Biópsia	Concentração (pMoles/ $\mu$ L)	Razão entre as concentrações*
1	121	1.65
2	1286	1.41
3	682	1.77
4	155	1.96
5	267	1.78
6	1062	1.54
7	425	1.61
8	662	1.73
9	805	1.83
10	290	1.88
11	2373	1.57
12	103	1.87
13	711	1.76
14	720	2.02
15	20	2.0
16	1385	1.43
17	1866	1.65
18	180	2.16
19	469	1.95
20	241	1.94
21	421	1.49
22	535	1.8
23	151	1.77
24	230	1.79
25	39	2.16
26	211	1.91
27	180	2.1
28	328	1.47
29	648	1.82
30	453	1.97
31	306	1.93
32	210	1.69
33	66	1.88
34	581	1.91
35	821	1.69
36	43	2.0
37	1012	1.56
38	397	1.9
39	486	2.0
40	301	2.2
41	226	1.96
42	356	1.77
43	1084	1.46

Razão entre as concentrações = DO 260/ DO 280 ( DO = densidade ótica)

ANEXO 13 - FÓRMULAS DAS SOLUÇÕES DA PCR.

**Anexo 13 - Fórmulas das soluções da PCR.****TE para diluição do DNA ( Tris- EDTA)**

- Tris HCl pH 7,6 10mM
- EDTA ( ácido etilenodiaminotetracético) 1mM

**Tris HCl solução estoque pH 7,6**

- Tris 1M
- Ajuste de pH com HCl

**EDTA solução estoque pH 8,0**

- EDTA 0,5M
- Ajuste de pH com NaOH 10N

**Solução de Nitrato de Prata**

- AgNO<sub>3</sub> 2,02g
- Água destilada 1000ml

**Solução de Carbonato de Sódio ( Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)**

- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 14,8g
- Água destilada 500ml

**Solução para o uso do Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>**

- Solução estoque de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 170ml
- Formaldeído 92µl

**Solução para o uso do TBE ( tampão borato) 0,5%**

- TBE 5x 280ml
- Água destilada 1120ml

**Tampão TBE 5x**

- Tris HCl 54g
- Ácido Bórico 27,5g
- EDTA 0,5M ( pH 8,0) 20ml
- Água destilada 1000ml

**Solução de Acrilamida 30%**

- Acrilamida 14,5g
- N,N'metilenobisacrilamida 500mg
- Água destilada 50ml
- TEMED 30µl
- Persulfato de Amônia 250µl

**Gel de Acrilamida a 10%**

- Acrilamida 30% 7,5ml
- Tampão TBE 5x 6ml
- Água destilada 16,5ml
- Persulfato de Amônio 10% 65µl
- TEMED 36µl