Livia Meirelles de Araujo Pasqualin

**Estudo clínico, histológico e molecular de crianças com
distrofia muscular congênita por deficiência de lamina A/C**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Neurologia

Orientador: Prof. Dr. Edmar Zanoteli

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

! reprodução autorizada pelo autor

Pasqualin, Livia Meirelles de Araujo

Estudo clínico, histológico e molecular de crianças com distrofia muscular congênita por deficiência de lamina A/C / Livia Meirelles de Araujo Pasqualin. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Neurologia.

Orientador: Edmar Zanoteli.

Descritores: 1.Distrofias musculares/congênito 2.Hipotonia muscular 3.Membrana nuclear 4.Lamina tipo A/genética 5.Biópsia 6.Genes 7.Criança

USP/FM/DBD-191/13

Dedicatória

A todos os pacientes com doenças neuromusculares,
especialmente à Belinha (*in memoriam*).

Agradecimentos especiais

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edmar Zanoteli, pela amizade construída ao longo desse trabalho, pela confiança, paciência e, principalmente, por compartilhar com tamanha humildade tanto conhecimento. Deixo aqui meu profundo agradecimento e admiração.

À Prof.a Dra. Umbertina Conti Reed, pelo exemplo de dedicação à arte de ensinar, pela grande participação na minha formação e pela sua disponibilidade absoluta e incentivo ao longo dos últimos anos. Só tenho a agradecer por todas as orientações e por me guiar pelas doenças neuromusculares.

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro ao trabalho, projeto da Prof^a Dra Umbertina Conti Reed, sob protocolo 2010/08902-5.

À Prof.a Dra. Ana Beatriz Alvarez Perez, Prof.a Dra. Anamarli Nucci, Prof. Dr. Fernando Kok e Prof.a Dra. Maria Joaquina Marques-Dias, pelas importantes observações e sugestões dadas durante a realização dessa pesquisa.

Aos professores e amigos da Neurologia Infantil, pelos ensinamentos constantes e por me inspirarem na profissão.

Às queridas Eliene Dutra Campos, Elisangela Quedas e Thais Virginia Moura Machado Costa, que sempre prestativas “iluminavam” minhas atividades no laboratório.

À bibliotecária e amiga Mariza Kazue, por me salvar nos momentos mais difíceis, independente da distância.

A todos os amigos e mestres da Neurologia, do Instituto da Criança e do LIM 45, que sempre estiveram ao meu lado, apoiando, torcendo e sempre dispostos a ajudar.

À minha família, especialmente, aos meus pais Sônia e Dionisio, por me transmitirem os valores e a importância do estudo desde cedo, pelo apoio e incentivo e por estimularem o desenvolvimento do pensamento crítico.

Ao Thiago, sem palavras para agradecer pelo apoio e amor incondicionais, pela compreensão, tolerância e pela paciência para “dialogar profundamente” sobre neurologia infantil. Obrigada por estar sempre ao meu lado de bom humor e com pensamento positivo.

*Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende.*

Leonardo da Vinci

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento dessa publicação:

Referências - adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos de periódicos de acordo com *List of Journals indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	02
1.1 Definição.....	02
1.2 Aspectos históricos.....	04
1.3 Classificação.....	09
1.4 Fisiopatogenia.....	13
1.5 Diferentes formas de DMC.....	15
1.5.1 DMC por deficiência de merosina.....	15
1.5.2 DMCs associadas a mutações no gene do colágeno VI.....	16
1.5.3 DMCs causadas por defeitos da glicosilação da α -DG.....	18
1.5.4 DMC por deficiência da proteína relacionada à Fukutina.....	19
1.5.5 DMC Fukuyama.....	20
1.5.6 DMC músculo-óculo-cerebral e síndrome de Walker-Warburg.....	21
1.5.7 DMC com espinha rígida.....	23
1.5.8 Outras formas de DMC.....	24
1.5.9 DMC por deficiência de lamina A/C.....	26
1.6 Justificativa.....	38
2 OBJETIVOS.....	40
3 PACIENTES E MÉTODOS.....	42
3.1 Pacientes.....	42
3.2 Métodos.....	42
3.2.1 Quadro clínico.....	42
3.2.2 Análise histológica.....	43

3.2.3 Análise imunoistoquímica.....	43
3.2.4 Extração de DNA.....	45
3.2.5 PCR (reação em cadeia da polimerase).....	46
3.2.6 Sequenciamento.....	47
4 RESULTADOS.....	49
4.1 Caso 1.....	49
4.2 Caso 2.....	50
4.3 Caso 3.....	52
4.4 Caso 4.....	53
4.5 Pacientes sem mutação no gene <i>LMNA</i> identificada.....	62
5 DISCUSSÃO.....	67
6 CONCLUSÕES.....	77
ANEXOS.....	79
Anexo A - Aprovação da Comissão de Ética.....	79
Anexo B - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	80
8 REFERÊNCIAS.....	85
APÊNDICES	
Apêndice 1 - Artigo submetido à revista <i>BMC Neurology</i> em 06/04/2013	

LISTA DE SIGLAS

α -DG	α -dístroglicana
β -DG	β -dístroglicana
AA	Aminoácido
ATPase	Adenosina trifosfatase
BIPAP	Do inglês, bilevel positive pressure airway
BSA	Do inglês, bovine serum albumin
CCPS	Do inglês, cardiocutaneous progeria syndrome
CDG	Do inglês, congenital disorders of glycosylation
CMD	Do inglês, congenital muscular dystrophy
CPK	Creatinofosfoquinase
CMD1A	Cardiomiopatia dilatada com afecção do sistema de condução
CMT2B1	Charcot-Marie-Tooth autossômica recessiva
DMC	Distrofia muscular congênita
DMC1A	Distrofia muscular congênita por deficiência de merosina
DMC1C	Distrofia muscular congênita relacionada à fukutina
DMCs	Distrofias musculares congênitas
DNA	Do inglês, deoxyribonucleic acid
EDMD	Do inglês, Emery-Dreifuss muscular dystrophy
DMCF	Distrofia muscular congênita tipo Fukuyama
GO	Tricômico de Gomori
HCFMUSP	Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HE	Hematoxilina-eosina
HGPS	Do inglês, Hutchinson-Gilford progeria syndrome
ICMT	Isoprenilcisteína carboximetiltransferase
IHQ	Do inglês, immunohistochemical
LGMD1B	Distrofia de cinturas relacionada ao gene <i>LMNA</i>
LIM	Laboratório de investigação médica
MAD	Do inglês, mandibuloacral dysplasia
MOC	Músculo-óculo-cerebral

MI	Membros inferiores
MRC	Do inglês, medical research council
MS	Membros superiores
NADH	Do inglês, NADH tetrazolium redutase
OMIM	Do inglês, Online Mendelian Inheritance in Man
ORO	Do inglês, oil-red-O
PAS	Ácido periódico de Schiff
PBS	Do inglês, phosphate buffered saline
PCR	Do inglês, polymerase chain reaction
RD	Do inglês, Restrictive Dermopathy
RM	Ressonância magnética
SCM	Músculo esternocleidomastóideo
SDH	Succinato desidrogenase
SNC	Sistema nervoso central
TC	Tomografia computadorizada
WB	Do inglês, Western blotting
WRN	Do inglês, Werner's syndrome
SWW	Síndrome Walker-Warburg
ZMPSTE24	Ste-24-metaloproteinase zinco-dependente

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitro
μM	Micromolar
kDa	KiloDalton
m/s	metros/segundos
Min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Ng	Nanograma
Pmol	Picomolar
U	Unidade de medida

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática das principais proteínas envolvidas nas DMCs	14
Figura 2 - Representação esquemática das proteínas da membrana nuclear interna	29
Figura 3 - Representação esquemática dos domínios funcionais da proteína lamina A e sua relação com as mutações	38
Figura 4 - Característica fenotípica predominante nos pacientes com DMC por deficiência de lamina A/C	57
Figura 5 - Hipotrofia muscular global nos pacientes com DMC por deficiência de lamina A/C	58
Figura 6 - Retrações fibrotendíneas nos pacientes com DMC por deficiência de lamina A/C	58
Figura 7 - Aspectos da biópsia muscular dos pacientes com DMC por deficiência de lamina A/C	59
Figura 8 – Reação de imunofluorescência para emerina, lamina A/C e desmina	60
Figura 9 – Ressonância de músculos cervicais e dos membros do paciente com DMC por deficiência de lamina A/C	60
Figura 10 – Mutações identificadas no gene <i>LMNA</i> em quatro pacientes com DMC	61
Figura 11 - Características fenotípicas dos pacientes sem deficiência proteica específica e sem identificação de mutação no gene <i>LMNA</i>	65
Figura 12 - Aspectos da biópsia muscular dos pacientes sem identificação de mutação no gene <i>LMNA</i>	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - DMCs. Adaptada do <i>GeneTable</i> , Abril/2013.....	12
Tabela 2 - Doenças humanas associadas a mutações no gene <i>LMNA</i>	32
Tabela 3 - Anticorpos utilizados para o diagnóstico IHQ.....	45
Tabela 4 - Sequência de oligonucleotídeos utilizada no estudo.....	46
Tabela 5 - Caracterização clínica e genética dos pacientes com DMC por deficiência de lamina A/C.....	54
Tabela 6 - Caracterização clínica e achados na biópsia muscular dos pacientes com DMC por deficiência de lamina A/C.....	55
Tabela 7 - Características histológicas na biópsia muscular dos pacientes com DMC por deficiência de lamina A/C, avaliadas através das reações hematoxilina-eosina / Tricômico de Gomori.....	56
Tabela 8 - Características histológicas na biópsia muscular dos pacientes com DMC por deficiência de lamina A/C, avaliadas por reações imunoistoquímicas.....	56
Tabela 9 - Caracterização fenotípica dos pacientes sem mutação identificada no gene <i>LMNA</i>	64

RESUMO

Pasqualin LMA. **Estudo clínico, histológico e molecular de crianças com distrofia muscular congênita por deficiência de lamina A/C** [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Introdução: As Distrofias Musculares Congênitas (DMCs) são um grupo clínica e geneticamente heterogêneo de doenças musculares que se manifestam ao nascimento ou no primeiro ano de vida, sendo caracterizadas por hipotonia, fraqueza muscular, retardo do desenvolvimento motor e retrações fibrotendíneas. O músculo esquelético apresenta-se distrófico, mas sem alterações estruturais específicas. Em quase metade dos casos a doença é causada pela deficiência da laminina α -2 (merosina). Outras deficiências proteicas descritas incluem: colágeno VI, selenoproteína N1, várias glicosiltransferases responsáveis pela glicosilação da α -dystroglicana e lamina A/C. Vários genes já foram identificados. **Objetivo:** o objetivo deste estudo foi a caracterização clínica, histológica e molecular das crianças com DMC por deficiência de lamina A/C. **Método:** Foram incluídos 13 pacientes com diagnóstico clínico e histológico de DMC, com expressão muscular normal para distrofina, sarcoglicanas, merosina, colágeno 6 e disferlina. Os pacientes foram reavaliados segundo protocolo clínico e neurológico. As biópsias musculares realizadas previamente foram revisadas e o estudo das mutações no gene da lamina A/C foi realizado através de sequenciamento de toda região codificadora do gene. **Resultados:** Identificamos mutações em 30,7% dos pacientes (quatro casos) com fenótipo clínico de DMC por deficiência de lamina A/C. Todas as mutações encontradas (p.E358K, p.R249W, e p.N39S) ocorreram em heterozigose e *de novo* e já haviam sido descritas na literatura em pacientes com distrofias musculares. Em geral, estes pacientes apresentavam um grave comprometimento motor com o característico aspecto de cabeça caída, com início dos sintomas nos primeiros dois anos de vida. A CPK estava elevada entre 2 a 6 vezes o padrão superior da normalidade. O padrão histológico variou desde um músculo levemente até gravemente distrófico. Curiosamente, no estudo histológico do músculo, um dos pacientes apresentou agregados intracitoplasmáticos. Um outro paciente apresentava associadamente alterações neurogênicas ao estudo eletroneuromiográfico. Em todos os casos observamos complicações respiratórias, cardíacas e distúrbios de deglutição. Houve um caso de morte súbita, provavelmente em decorrência de arritmia cardíaca. **Conclusões:** A correlação genótipo-fenótipo permanece difícil, mas todos os casos apresentaram sinal da cabeça caída, comprometimento respiratório, cardíaco e biópsia muscular distrófica. A ampliação do conhecimento clínico e histológico pode orientar o diagnóstico e direcionar para o estudo molecular adequado, além de permitir o diagnóstico precoce das complicações, tão frequentes na DMC por deficiência de lamina A/C. Os exons 1, 4 e 6 são os mais frequentemente mutados e devem ser pesquisados inicialmente. Esta série de casos contribui também por demonstrar a distribuição universal da doença.

Descritores: 1. Distrofias musculares/congênito; 2. Hipotonia muscular; 3. Membrana nuclear; 4. Lamina tipo A/genética; 5. Biópsia; 6. Genes 7. Criança.

SUMMARY

Pasqualin LMA. **A clinical, histological and molecular study of children with congenital muscular dystrophy related to lamin A/C deficiency** [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013".

Background: The Congenital Muscular Dystrophies (CMD) are a clinically and genetically heterogeneous group of myopathies characterized by muscle hypotonia, delayed motor development and early onset of progressive muscle weakness with dystrophic pattern on muscle biopsy. The clinical course is broadly variable and can comprise the involvement of the brain and eyes. Almost half of the cases is caused by deficiency of laminin- α 2 (merosin). Other protein deficiencies described include: collagen VI, selenoprotein N1, several glycosyltransferases responsible for glycosylation of α -dystroglycan and lamin A/C. Several genes have been identified and the increased knowledge of new clinical and histological forms of CMD can guide diagnosis and direct appropriate molecular studies. *LMNA*-related CMD is often characterized by muscle weakness and a dropped head developed in the early years of life. Regarding lamin A/C deficiency, the immunohistochemical findings can be normal, probably because the protein change is functional only; this makes diagnosis using muscle samples more difficult. **Objectives:** The aim of this study was to characterize the clinical, histological and molecular aspects in patients with CMD related to deficiency of lamin A/C. **Methods:** thirteen children with clinical and histological diagnosis of CMD with normal muscle expression for dystrophin, merosin, collagen 6, sarcoglycans and dysferlin were included in this study. The *LMNA* gene was sequenced after amplification of all coding exons. In addition, the muscle biopsies were revised. **Results:** In 30.7% (four cases) of our patients with typical clinical phenotype of lamin A/C deficiency were detected mutations on *LMNA* gene and all of them presented dropped-head syndrome, restrictive ventilator insufficiency, cardiac changes, increased serum CPK level and myopathic/dystrophic aspect on muscle biopsy. Two of the patients had normal motor development milestones in the first months of life and subsequently developed cervical and limb weakness. The other two patients presented a more severe motor involvement and failure to walk. One patient showed associated peripheral neuropathy. Curiously one case had myofibrillar aggregates on muscle biopsy. All mutations (p.E358K, p.R249W and p.N39S) were heterozygous and *de novo* and had been previously described in patients with muscular dystrophy. **Conclusion:** Genotype/phenotype correlation in CMD remains difficult. However patients with *LMNA* mutation and CMD seems to have a more homogeneous phenotype characterized by dropped head, severe motor disability, and cardiac and pulmonary involvement. Mutations on exons 1, 4 and 6 should be tested first. This case series also contributes for showing the universal distribution of the disease.

Descriptors: 1. Muscular dystrophies/congenital; 2. Muscle hypotonia; 3. Nuclear envelope; 4. Lamin type A/genetics; 5. Biopsy; 6. Genes 7. Child.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definição

As distrofias musculares congênitas (DMCs) incluem um grupo clínica e geneticamente heterogêneo de doenças neuromusculares degenerativas, que se manifestam ao nascimento ou no decorrer do primeiro ano de vida¹⁻⁴. A idade de início é difícil de ser determinada com exatidão, principalmente por ser um dado retrospectivo. Sendo assim, são considerados critérios para o diagnóstico de DMC o início das manifestações clínicas antes dos dois anos de idade e o padrão histológico distrófico na biópsia muscular, sem as alterações estruturais características de outras formas de miopatias congênitas⁵⁻⁸.

Os sintomas iniciais mais comuns são hipotonia muscular, atraso nas aquisições dos marcos do desenvolvimento motor, fraqueza muscular e retrações fibrotendíneas. Além do atraso no desenvolvimento motor, pode haver regressão motora. A fraqueza muscular pode permanecer estável por um curto período de tempo e tornar-se progressiva após, assim como pode progredir mais rapidamente desde o início dos sintomas^{1, 5, 6, 8-11}. Outros distúrbios frequentemente encontrados nas DMCs são dificuldades de deglutição, que comumente acarretam em baixo ganho ponderoestatural e desnutrição; insuficiência respiratória por ineficácia da musculatura respiratória; escoliose e, em alguns subtipos, comprometimento cardíaco¹²⁻¹⁵. O sistema nervoso central (SNC), olhos e tecido conjuntivo também podem ser afetados.

O envolvimento do SNC é um grande divisor das formas clínicas e varia desde o acometimento da substância branca cerebral até alterações estruturais e retardo mental^{16, 17}. Outros fatores relevantes para a diferenciação entre as diversas formas clínicas são: imobilidade precoce da coluna, descrita também como rigidez espinhal; a hiperelasticidade articular distal e a pseudo-hipertrofia muscular, causada pela substituição das células musculares degeneradas por

fibrose e tecido conjuntivo¹⁸⁻²¹. Os níveis séricos da creatinofosfoquinase (CPK) observados nas DMCs são variáveis, sendo frequentemente elevados^{1, 5, 6, 8-11}.

Concomitantemente aos achados clínicos descritos, a biópsia muscular dos pacientes com DMC demonstra o padrão distrófico inespecífico, que pode ser encontrado em diferentes formas de distrofia muscular. As alterações que definem o padrão distrófico são: variabilidade do calibre das fibras musculares, proliferação do tecido conjuntivo endomisial e perimisial, o aumento do número de núcleos internalizados, a presença variável de necrose com reação macrofágica e a ausência de alterações estruturais^{4, 5}. De acordo com a intensidade dos achados histopatológicos, a distrofia muscular é graduada em leve, moderada ou grave. Outro fator relevante na graduação da distrofia é a localização do músculo biopsiado, pois algumas formas têm acometimento preferencial de um grupamento muscular. Associada à avaliação clínica, a ressonância do músculo, por ser pouco invasiva e facilmente realizada em crianças, auxilia na escolha do melhor local a ser biopsiado e, recentemente, passou a ser um importante instrumento na investigação diagnóstica^{22, 23}, na caracterização das diversas formas de DMC e para guiar o estudo molecular de acordo com o grupamento muscular comprometido^{22, 24}.

Dessa forma, uma vez que há suspeita clínica e a biópsia muscular demonstra padrão distrófico inespecífico, o estudo imunoistoquímico do músculo deverá ser realizado. Uma bateria de anticorpos é utilizada e, particularmente, esta análise permite verificar a merosina, o colágeno VI e a alfa-distroglicana, servindo também como orientação para o estudo molecular^{2, 25}.

Nas últimas duas décadas, com o grande progresso do estudo molecular e a descoberta de múltiplos genes, o conceito de DMC evoluiu de um diagnóstico clínico e histológico para um grupo mais inclusivo de subtipos definidos por genes.

1.2 Aspectos históricos

Os primeiros relatos de DMC foram feitos por Batten em 1903 e 1904^{26, 27}. Na ocasião utilizou o termo “miopatia tipo infantil” para se referir a esse grupo de doenças e, no estudo patológico, identificou-o como “miosite fibrosa”. A denominação DMC foi proposta por Howard em 1908²⁸.

Até os princípios da década de 1990, poucos conhecimentos existiam a respeito da classificação das diversas formas de DMC. O termo era utilizado para um grupo heterogêneo de doenças que, em comum, apresentavam fraqueza muscular precocemente. Havia muita dificuldade na distinção com outras formas de doenças neuromusculares da infância^{3, 10, 29}. No decorrer do século XX, fenótipos clínicos peculiares foram descritos e as diferenças entre as formas de apresentação clínica da doença foram muito estudadas, o que levou a considerarmos que o século XX foi o dos avanços clínicos das DMCs¹⁰.

Ullrich, em 1930, descreveu uma forma grave de DMC que cursava com hiperelasticidade articular distal, retrações fibrotendíneas proximais e escoliose³⁰.

O envolvimento conjunto do SNC e da musculatura esquelética num fenótipo clínico grave, frequente no Japão, foi reconhecido em 1960 por Fukuyama, tendo sido posteriormente denominado DMC tipo Fukuyama³¹.

Em 1971, Dubowitz descreveu a “síndrome da espinha rígida”, caracterizada por dificuldade em fletir a espinha, escoliose progressiva, atrofia muscular importante e retrações fibrotendíneas³².

Em 1977, Santavuori reconheceu uma nova forma da doença, com envolvimento cerebral e ocular, que denominou músculo-óculo-cerebral (MOC), inicialmente restrita à população finlandesa³³.

Em 1986, a síndrome de Walker-Warburg (SWW), que também cursava com anomalias cerebrais e oculares, foi descrita³⁴.

Além dessas formas graves, existiam as formas puras de DMC, também ditas clássicas, sem envolvimento do SNC, que cursavam com comprometimentos variáveis.

De 1990 até 1993, outro padrão característico surgiu, com grave envolvimento da substância branca cerebral e inteligência normal. Inicialmente foi chamada de “forma ocidental” de DMC, para diferenciar da anteriormente descrita e frequente no Japão^{35, 36}. Em 1994, Tome et al, por análise imunoistoquímica (IHQ) nos tecidos da biópsia muscular, identificaram a deficiência de laminina alfa-2 (merosina) na matriz extracelular de tais pacientes com distrofia muscular congênita e alterações da substância branca cerebral³⁷. Essa forma foi descrita como DMC1A, também chamada de DMC merosina negativa ou por deficiência de merosina. O gene responsável pela laminina alfa-2 já era conhecido e mutações foram identificadas pela primeira vez em 1995, por Helbling-Leclerc et al³⁸.

Entretanto, a era molecular já havia se iniciado em 1993, quando Toda et al reconheceram o locus do gene da DMC tipo Fukuyama no cromossomo 9q³⁹. Em 1998, Kobayashi et al identificaram o gene *FKTN* responsável pela DMC tipo Fukuyama, que codifica a proteína fukutina⁴⁰.

Também em 1998, Moghadaszadeh associou o locus da forma de DMC com espinha rígida ao cromossomo 1p35-36⁴¹.

Ao mesmo tempo, Muntoni et al descreveram uma nova forma de DMC em pacientes dos Emirados Árabes, que apresentavam pseudo-hipertrofia muscular, falência respiratória precoce e insuficiência diafragmática. Neste caso, havia deficiência de laminina alfa-2 que foi considerada fenômeno secundário, pois foram excluídas alterações no gene *LAMA2*, 6q22-q23, responsável pela deficiência primária da laminina alfa-2⁴².

Em 1998, Hayashi descreveu três casos de pacientes com DMC associados à deficiência da integrina alfa-7 na IHQ, com laminina alfa-2 normal. Um paciente apresentava deficiência intelectual, sem alterações do SNC, e os outros dois, torcicolo congênito^{43, 44}. Desde então não foram descritos novos casos de DMC com deficiência da integrina alfa-7.

Em 1999, a doença músculo-óculo-cerebral foi associada ao cromossomo 1p32-p34 num estudo em oito famílias, sendo sete finlandesas e uma turca, demonstrando que esta forma clínica não é restrita à população finlandesa⁴⁴.

Em 2000, nova análise da mesma família dos Emirados Árabes, que havia sido descrita por Muntoni em 1998, e de mais uma família alemã, demonstrou ligação ao cromossomo 1q42. Os afetados apresentavam o mesmo padrão previamente descrito de comprometimento respiratório e deficiência secundária da laminina alfa-2 e o fenótipo foi chamado de DMC1B^{42, 45}.

Em 2001, no locus 1p35-36 associado com a síndrome da espinha rígida, foi identificado o gene *SEPN1*, que codifica selenoproteína N⁴⁶. Esta foi a primeira descrição de doença humana causada por disfunção dessa proteína do retículo endoplasmático.

Ainda em 2001, Camacho et al identificaram mutações de um dos três genes que codificam as subunidades do colágeno VI (*COL6A2*, 21q22.3) em três crianças com o fenótipo anteriormente descrito por Ullrich⁴⁷. Em 2002 e 2003, Demir et al e Pan et al, respectivamente, descreveram mutações no *COL6A3*, 2q37, e *COL6A1*, 21q22.3, ampliando o espectro da doença^{48, 49}.

Em 2001, houve um grande passo para a compreensão de como ocorrem as formas graves de DMC, com acometimento conjunto do SNC. Brockington et al identificaram no locus 19q13.3 o gene que codifica a proteína relacionada à fukutina, o qual, quando alterado, acarreta expressão reduzida da alfa-distroglicana, fenótipo este descrito como DMC1C⁵⁰. Surgiu então a suspeita

de que os defeitos do gene *FKRP*, que codifica a proteína relacionada à fukutina, impediriam a glicosilação da alfa-distroglicana (alfa-DG), o que seria a base fisiopatológica da DMC1C⁵⁰.

No mesmo ano, Hayashi et al corroboram a teoria de que a fukutina, deficitária na DMC tipo Fukuyama, atua na glicosilação e que, se alterada, induz uma ruptura da membrana da superfície extracelular da fibra muscular e cardíaca, também atuando no tecido cerebral e influenciando o desenvolvimento do SNC⁵¹.

Em prosseguimento, Yoshida et al demonstraram que o gene *POMGnT1*, responsável pela doença músculo-óculo-cerebral também codifica uma glicosiltransferase, a proteína O-manose-1,2-Beta-N-acetilglucosaminatranferase, envolvida na O-manosil-glicosilação da alfa-DG, que parece ser o mecanismo implicado na gênese dos defeitos de migração neuronal⁵².

Tais resultados reforçaram a importância da alfa-DG para o desenvolvimento e funcionamento do músculo e do tecido cerebral, e definiram um novo grupo de DMC, as alfa-distroglicanopatias ou defeitos da glicosilação da alfa distroglicana⁵³. No ano seguinte, a síndrome de Walker-Warburg foi associada a mutações no gene *POMT1*, sendo descrita como mais uma das alfa-distroglicanopatias⁵⁴.

Em 2003, mais uma forma de DMC ligada a alterações do SNC, com deficiência intelectual grave, foi associada à mutação no gene que codifica a glicosiltransferase *LARGE*, sendo denominada DMC1D⁵⁵.

Em 2005, mutações no gene *POMT2*, que codifica a proteína O-manosiltransferase-2, foram também associadas à síndrome de Walker-Warburg⁵⁶.

Os avanços da era molecular foram rápidos e surpreendentes. Em 2004 Muntoni e Voit fizeram uma importante revisão comemorativa intitulada “DMC em 2004: um século de progressos empolgantes”¹⁰ e, neste período, houve inúmeros encontros internacionais para debates a respeito das novas formas da doença e a classificação das DMCs^{5, 57-60}.

E as descobertas continuaram. Em 2008, Quijano-Roy et al relataram uma nova forma de DMC numa série de 15 pacientes com fenótipo de fraqueza cervical proeminente, conhecido como sinal da cabeça caída⁶¹. Foram identificadas mutações no gene *LMNA*, que codifica a proteína lamina A/C, pertencente ao envelope nuclear⁶¹. As mutações neste gene haviam sido descritas anteriormente na Distrofia Muscular de Emery-Dreifuss e na Distrofia Muscular tipo Cinturas, além de outras doenças com fenótipo heterogêneo, não neuromusculares⁶²⁻⁶⁵.

Pelas dificuldades de diagnóstico, a DMC é possivelmente subdiagnosticada⁶⁶⁻⁶⁸. A real incidência não é bem conhecida, tanto devido à dificuldade do estudo molecular na diferenciação dos subtipos como pela heterogeneidade da classificação utilizada no passado. Inicialmente, os estudos epidemiológicos foram realizados de forma isolada; por exemplo, em 1996, no Nordeste da Itália, a incidência de todas as formas de DMC foi estimada 1:21500, com prevalência de 1:125000⁶⁹. Em 2002, na Suécia Ocidental, a incidência de DMC foi 1:16000⁷⁰.

A frequência dos subtipos também varia nas diferentes populações, por exemplo, no Japão a DMC tipo Fukuyama, causada pela mutação com efeito fundador no gene *FKTN*, é a mais comum (cerca de 50% dos casos), seguida pela DMC por deficiência do colágeno VI⁷¹. Em outros países, mutações no *FKTN* são raras. No Brasil, a DMC por deficiência de merosina corresponde a 30-40% dos casos⁷², assim como é a mais frequente no Norte da Inglaterra (0,6/100000), seguida pela deficiência do colágeno VI⁶⁸. Na Austrália, em 2008, um estudo associando IHQ, *western blotting* e teste molecular identificou distroglicanopatias em 25% dos casos, deficiência de colágeno em 12% e

deficiência primária de merosina em 8%⁶⁶. No Reino Unido, um trabalho retrospectivo selecionou 116 crianças encaminhadas entre 2001 e 2008 com suspeita de DMC e identificou a deficiência do colágeno VI em 21% dos casos, seguida pela distroglicanopatia (15%) e pela deficiência de merosina (10%)⁷³.

1.3 Classificação

A partir de 1994, especialmente depois de 2001, houve grande evolução na análise histopatológica do músculo, na identificação de proteínas específicas envolvidas no processo da contração muscular, bem como na análise molecular. Todos esses conhecimentos permitiram o desenvolvimento da classificação atual. Classificações utilizadas anteriormente, que se baseavam nos fenótipos clínicos, estão em desuso pois há ampla variabilidade genotípica de algumas formas de DMC. Da mesma forma, a mesma mutação pode acarretar doenças com padrões clínicos diferentes⁷⁴.

A classificação moderna baseia-se no gene responsável pela doença e é organizada de acordo com a localização na célula da proteína deficiente, a qual foi codificada pelo gene respectivo. Sendo assim, pode afetar proteínas estruturais da matriz extracelular (deficiência de laminina alfa-2 e deficiência do colágeno VI), a glicosilação da alfa-distroglicana (síndrome de Walker-Warburg, doença músculo-óculo-cerebral, DMC tipo Fukuyama, DMC1C, DMC1D), proteínas do retículo endoplasmático (deficiência de selenoproteína N, anteriormente chamada de síndrome de espinha rígida) e proteínas do envelope nuclear (deficiência da lamina A/C). Essa classificação é periodicamente revisada pela *World Muscle Society* e a versão atualizada é disponibilizada eletronicamente nos endereços <http://www.muscle.genetab.fr> e <http://194.167.35.195/>.

A revisão mais recente da classificação das DMCs está sumarizada na tabela abaixo (Tabela1)^{10, 61, 75-78}. Num estudo coorte, a identificação da

mutação causadora da DMC foi possível em 25-50% dos casos⁶⁶, o que comprova que muitas novas formas de DMC ainda não foram identificadas.

Muitos casos ainda não se enquadram nos subtipos conhecidos e são descritos isoladamente¹⁰. Formas raras descritas são: a DMC por deficiência da integrina alfa-7, relatada em apenas três indivíduos⁴³; a DMC por deficiência da integrina alfa-9, que cursa com hiperelasticidade na articulação metacarpo-falangiana, descrita na população Franco-Canadense de Quebec em 2006⁷⁹; e DMC relacionada ao gene *SYNE1*, que codifica a nesprina-1, proteína do envelope nuclear, que cursa com polegares aduzidos, retardo mental, hipoplasia cerebelar e catarata⁸⁰.

Com o advento do diagnóstico molecular, a sobreposição de algumas formas clínicas de doenças neuromusculares tornou-se evidente e o conceito de distrofia muscular congênita está se expandindo. Por exemplo, foram descritos pacientes com mutações no gene da dinamina 2 (*DNM2*), tradicionalmente responsáveis pela miopatia centronuclear autossômica dominante, que na fase inicial das manifestações clínicas apresentavam biópsia muscular distrófica, com poucos núcleos centrais e, na evolução, mostraram biópsia característica de miopatia centronuclear⁸¹.

Da mesma forma, no caso de outro paciente, inicialmente diagnosticado com distrofia tipo cinturas, decorrente da mutação no gene da teletonina (LGMD2G), foi sugerido tratar-se de uma nova forma de DMC. O paciente apresentou atraso nas aquisições motoras no primeiro ano de vida, adquirindo marcha independente aos 16 meses de idade, e desde os dois anos apresentava marcha com báscula de quadril. Aos quatro anos de idade notou-se dificuldade para subir degraus, hiperelasticidade distal e nível de CPK de 633 UI/L; a biópsia muscular, realizada com essa idade, demonstrou atrofia de fibras tipo 1 e IHQ normal para todas as proteínas testadas. Devido a evoluir com escápula alada, hipertrofia de panturrilhas e fraqueza muscular característica de cinturas, foi testada a teletonina na IHQ, que resultou ausente, sendo então identificada uma mutação no gene *TCap*, e sugerido que o caso

representaria uma nova forma de DMC, estreitando ainda mais os limites entre a distrofia de cinturas e as DMCs⁸².

Dentro desse contexto verifica-se que, até recentemente, a maioria das proteínas conhecidas responsáveis pela doença ou estavam envolvidas nos processos de glicosilação ou eram componentes estruturais da matriz extracelular. A identificação de diversos outros genes não só expandiu o espectro das formas conhecidas, como também trouxe progressos na identificação de DMCs associadas à deficiência de proteínas do envoltório nuclear, e, até mesmo, com evidência de alterações mitocondriais, por exemplo, na DMC relacionada ao gene *CHKB*^{61, 83}.

Tabela 1 - Distrofias musculares congênitas. Adaptada do Gene Table, Abril/2013.

Localização da proteína	DMC	Herança	Gene	Localização	Proteína Codificada
Matriz Extracelular	Deficiência de laminina alfa-2 ou merosina	AR ¹	<i>LAMA2</i>	6q22-q23	Laminina alfa-2
		AR	?	1q42	Laminina alfa-2
	Ullrich / Deficiência de colágeno VI	AR	<i>COL6A1</i>	21q.22.3	Colágeno 6 tipo 1 α
		AR	<i>COL6A2</i>	21q.22.3	Colágeno 6 tipo 2 α
		AD	<i>COL6A2</i>	21q.22.3	Colágeno 6 tipo 2 α
	Bethlem / Deficiência de colágeno VI	AD/AR	<i>COL6A3</i>	2q37	Colágeno 6 tipo 3 α
Defeitos da glicosilação	MDC1C	AR	<i>FKRP</i>	19q13.33	Relacionada Fukutina
	MDC1D	AR	<i>LARGE</i>	22q12.3-q13.1	Glicosiltransferase <i>like</i>
	Fukuyama	AR	<i>FKTM</i>	9q31-q33	Fukutina
		AR	<i>FKTM</i>	9q31-q33	Fukutina
	Walker-Warburg	AR	<i>POMT1</i>	9q34.1	O-Manosiltransferase 1
		AR	<i>POMT2</i>	14q24.3	O-Manosiltransferase 2
		AR	<i>FKRP</i>	19q13.33	Relacionada Fukutina
		AR	<i>POMGNT1</i>	1p34.1	β 1-2 N-acetilglucosamiltransferase
		AR	<i>LARGE</i>	22q12.3-q13.1	Glicosiltransferase <i>like</i>
		AR	<i>ISPD</i>	7p21.2	<i>Isoprenoid synthase domain containing</i>
		AR	<i>GTDC2</i>	3p22.1	<i>Glycosyltransferase-like domain containing 2</i>
		AR	<i>POMGNT1</i>	1p34.1	β 1-2 N-acetilglucosamiltransferase
	Músculo-óculo-cerebral	AR	<i>FKRP</i>	19q13.33	Relacionada Fukutina
		AR	<i>POMT2</i>	14q24.3	O-Manosiltransferase 2
	Com epilepsia grave	AR	<i>DPM2</i>	9q34.13	<i>Polipeptideo 2 dolicol-fosfato manosiltransferase, subunidade regulatória</i>
Retículo endoplasmático	Espinha rígida	AR	<i>SEPN1</i>	1p36.13	Selenoproteína N1
		AR	<i>FHL1</i>	Xq26.3	<i>Four and a half LIM domain 1</i>
Envelope nuclear	Relacionada ao gene LMNA	De novo	<i>LMNA</i>	1q21.2-q21.3	Lamina A/C
Mitocondrial	Tipo megalocitico	AR	<i>CHKB</i>	22q13	Colina kinase β

¹ autossômico recessivo² autossômico dominante

1.4 Fisiopatogenia

Boa parte das DMCs origina-se de defeitos em diferentes proteínas relacionadas com a manutenção da estabilidade mecânica da membrana da fibra muscular, o sarcolema. Esta estabilidade é provida por uma série de ligações em cadeia, desde a unidade contrátil do músculo até a lâmina basal e matriz extracelular⁸⁴ (Figura 1).

O primeiro elo desta cadeia é a proteína distrofina, próxima ao lado interno do sarcolema, que por meio de um terminal se liga a F-actina e de outro à β -distroglicana (β -DG), que é uma proteína transmembrana. A β -distroglicana ancora-se à α -distroglicana (α -DG), justaposta ao lado externo do sarcolema, a qual para efetivar suas ligações com os componentes da matriz extracelular precisa ser glicosilada, sofrendo então ação das enzimas denominadas glicosiltransferases⁸⁵.

A α -DG, depois de glicosilada, liga-se às diferentes proteínas da matriz extracelular, das quais a mais abundante é a laminina α -2 (merosina). Esta, por sua vez, estabelece ligações indiretas com a rede de miofibrilas formada pelas três unidades do colágeno VI. A laminina α -2 tem também outra ligação que contribui para ancorar a membrana da fibra muscular, já que se liga à integrina α 7- β 1, que é uma proteína transmembrana^{84, 85}.

As formas mais frequentes de DMCs resultam de mutações nos genes que codificam parte destas proteínas causando um defeito na estabilidade mecânica da fibra e, secundariamente, por meio de uma série de mecanismos fisiopatogênicos complexos, acarretam em degeneração da fibra muscular⁸⁶.

As mutações nos genes que codificam cada uma das seis glicosiltransferases até o momento identificadas levam a um grupo de DMCs conhecidas como α -distroglicanopatias ou defeitos de glicosilação da α -DG; já as mutações no gene que codifica a laminina α -2 levam à DMC tipo 1A ou DMC

com deficiência de merosina; as mutações nos genes que codificam cada uma das três subunidades do colágeno VI levam à DMC tipo Ullrich ou DMC tipo Bethlem. Finalmente, bem mais raramente, as mutações no gene da integrina α -7⁴³ levam à DMC com deficiência de integrina α -7. Há formas de distrofia muscular e de DMC, cuja etiopatogenia relaciona-se ao déficit de proteínas da membrana nuclear, que não estão diretamente relacionadas com a estabilidade do sarcolema ou com funções citoplasmáticas. Entre essas temos a deficiência da lamina A, codificada pelo gene *LMNA*, que juntamente com as laminas B e C, são as maiores proteínas do envelope nuclear. São homólogas aos filamentos intermediários, responsáveis pela estabilidade mecânica do núcleo e pelo transporte transmembrana. Devido à similaridade das moléculas das laminas A e C, divergentes apenas por um terminal carboxila, surgiu o termo Lamina A/C⁸⁷.

Figura 1 - Representação esquemática das principais proteínas envolvidas nas distrofias musculares congênitas, suas localizações e interações: laminina α -2, integrina α -7, colágeno VI, α -dístroglicana, glicosiltransferases POMT1, POMT2, POGnT1, Fukutina, FKRP e LARGE; e selenoproteína-N. Adaptada de Reed, 2009a⁶.

1.5 Diferentes formas de DMC

1.5.1 DMC por deficiência de merosina (DMC1A)

Trata-se da forma mais encontrada de DMC na maioria das casuísticas dos países europeus, e, no Brasil, corresponde a 30-40% do total dos casos, sendo rara no Japão^{10, 72}. Os pacientes com a forma clássica apresentam fenótipo homogeneamente grave, caracterizado por intensa hipotonia neonatal, acentuado atraso nas aquisições motoras, dificuldades alimentares e respiratórias. Além da fraqueza muscular, são comuns atrofia muscular, retrações fibrotendíneas, bem como cifoescoliose precoce^{6, 18, 19, 29, 37, 72}. As retrações fibrotendíneas e a atrofia muscular são usualmente progressivas, contribuindo para acentuada limitação motora. A grande maioria dos casos não adquire marcha independente, sendo a habilidade motora máxima a de sentar sem apoio, principalmente nas formas com deficiência completa de merosina. Outros aspectos relevantes incluem: aspecto facial miopático e alongado e palato duro com aspecto ogival. Ainda no período neonatal podem ocorrer dificuldades alimentares e respiratórias^{6, 18, 19, 29, 37, 72}. A cifoescoliose, causando limitação da movimentação espinhal, acentua a insuficiência respiratória, já presente pela atrofia da musculatura intercostal. O nível de CPK encontra-se moderada ou acentuadamente aumentado^{18, 19, 72}.

Os exames de neuroimagem evidenciam alteração difusa da substância branca cerebral característica^{16, 18, 29}, que é atribuída à deficiência da merosina na membrana basal dos vasos sanguíneos cerebrais⁸⁸. A afecção da substância branca cerebral poupa o cerebelo, corpo caloso e cápsula interna⁸⁹. A espectroscopia associada à RM detecta a concentração hídrica elevada na substância branca cerebral, sem correlação entre o grau de comprometimento da substância branca cerebral e o grau de gravidade clínica ou a extensão da deficiência de merosina, parcial ou total¹⁷. Apesar das alterações observadas no sistema nervoso central, a inteligência é normal ou limítrofe^{18, 19, 72}. Cerca de 20-30% dos casos apresentam crises convulsivas, com alterações estruturais

associadas, como displasia cortical focal de predomínio nos lobos temporal e occipital^{25, 90}. O estudo imunoistoquímico (IHQ) da merosina é facilmente efetuado na biópsia muscular utilizando anticorpos comerciais que identificam diferentes fragmentos da merosina (80 e 300kDa)^{29, 72}. Devido a essa facilidade, o diagnóstico molecular não é considerado uma prioridade, ainda mais considerando a homogeneidade do fenótipo e a característica alteração da substância branca cerebral.

A merosina (laminina α -2) é codificada pelo gene *LAMA2*, cujas mutações alteram a estrutura heterotrimérica em três cadeias (α , β e γ) desta família de proteínas da matriz extracelular, comprometendo a ligação entre o citoesqueleto da fibra muscular e a matriz extracelular, o que conduz à degeneração da fibra muscular⁹¹. As mutações podem originar deficiência total^{38, 91} ou parcial da merosina²¹.

1.5.2 DMC associada a mutações no gene do colágeno VI: Ullrich (UCMD) e Bethlem

O diagnóstico das DMCs relacionadas ao colágeno VI ficou por muitos anos no limite entre duas doenças descritas isoladamente, DMC forma de Ullrich e miopatia de Bethlem, no entanto hoje são reconhecidas como extremos de um amplo espectro clínico^{10, 29}. A DMC Ullrich é a segunda forma mais descrita de DMC na Europa, Japão e Austrália^{6, 29, 71}. O fenótipo Ullrich é grave, caracteriza-se por hiperextensibilidade das articulações distais e predomínio proximal das retrações fibrotendíneas (cotovelos, joelhos e quadril)^{47, 48, 92, 93}. Outros achados incluem calcanhar proeminente, hiperidrose, dismorfismo facial e pele áspera, com hiperqueratose folicular e aspecto micropapular^{20, 47, 48, 92, 93}. Durante a primeira década de vida ocorrem deformidades ortopédicas com escoliose significativa, rigidez espinhal e, conseqüentemente, insuficiência respiratória, que podem comprometer a qualidade de vida. Alguns pacientes adquirem a marcha, mas é frequente a

progressão da fraqueza com perda da capacidade para deambular. O envolvimento respiratório é precoce e grave, com necessidade de suporte ventilatório na primeira ou segunda década de vida^{20, 47, 48, 92, 93}. A doença associa-se a mutações nos genes que codificam as três subunidades do colágeno VI: a subunidade $\alpha 1$ do colágeno VI (*COL6A1*), localizado no locus 21q22.3, a subunidade $\alpha 2$ (*COL6A2*) em 21q22.3 e a subunidade $\alpha 3$ (*COL6A3*) em 2q37, esta última podendo apresentar também herança dominante^{29, 47, 48, 92}. Na maioria destes pacientes, há deficiência total ou parcial da expressão do colágeno VI no tecido muscular. Embora haja casos com expressão normal ou reduzida da proteína.

No outro extremo do fenótipo clínico, temos a forma de Bethlem^{29, 47, 93, 94}. Na maioria das vezes, inicia-se na infância entre dois e dez anos de idade. Com curso benigno lentamente progressivo, a doença é caracterizada por múltiplas retrações fibrotendíneas nos dedos, nas articulações interfalangianas, nos cotovelos e aquileus⁹⁴. A maioria dos pacientes possui capacidade para marcha. A progressão do quadro ocorre após a quinta década, quando cerca de 50% dos casos irão necessitar de apoio para marcha. Aspectos cutâneos semelhantes aos observados na DMC tipo Ullrich e cicatrização anormal formando quelóides podem ocorrer. Mais raramente os pacientes manifestam hipotonia congênita com hiperelasticidade articular e, eventualmente, luxação congênita do quadril e torcicolo⁹⁵. A biópsia muscular pode mostrar padrão distrófico inespecífico e a análise IHQ para o colágeno VI é usualmente normal. A ausência ou alteração do colágeno VI em cultura de fibroblastos, associada à história clínica compatível com a doença deve orientar o estudo molecular.

Fenótipos intermediários têm sido descritos, formas leves de Ullrich e graves de Bethlem, reforçando a idéia de sobreposição clínica entre os fenótipos. Inclusive nas formas leves de Ullrich, a falência respiratória e hiperelasticidade distal tão características podem não ocorrer, da mesma forma que esses achados podem ser observados nas formas precoces de Bethlem, o que reforça a existência real de um espectro clínico.

Nas doenças que afetam o colágeno VI, o desempenho intelectual é preservado e não é comum o comprometimento cardíaco⁹⁶. O nível de CPK é normal ou pouco elevado.

Inicialmente, a forma de Ullrich foi descrita como autossômica recessiva, no entanto são frequentes os casos de mutação autossômica dominante *de novo*. Da mesma maneira a forma Bethlem, que é tipicamente autossômica dominante, mas alguns casos de herança autossômica recessiva têm sido descritos⁹⁶.

1.5.3 Distrofias musculares congênitas causadas por defeitos da glicosilação da α -dystroglicana (α -DG)

O reconhecimento de que defeitos da glicosilação da α -DG são a causa das formas mais graves de DMC, tais como DMC tipo Fukuyama (DMCF), músculo-óculo-cerebral (MOC) e síndrome de Walker-Warburg (SWW), ocorreu a partir de 2001^{54, 97}. Os primeiros trabalhos mostraram que em pacientes com DMC tipo MOC e DMC tipo Fukuyama, que têm, respectivamente, deficiência de POMGnT1 e fukutina, ocorriam hipoglicosilação da α -DG, o que impedia a sua ligação com a laminina α -2, a agrina e a neurexina da matriz extracelular. Estes trabalhos mostraram a importância da glicosilação da α -DG para a função muscular e cerebral, sugerindo que POMGnT1, fukutina, e LARGE poderiam ter como função a transferência de açúcares à α -DG, ou seja, agiam como glicosiltransferases^{54, 97}. O reconhecimento da participação de outras duas glicosiltransferases, POMT1 e POMT2, bem como de outra suposta glicosiltransferase, FKR1, na patogênese das DMCs ocorreu em seguida^{50, 56}. Voit e Tome, em 2004, enfatizaram que as DMCs com defeitos da glicosilação mostram uma enorme heterogeneidade clínica, podendo causar desde alterações miopáticas isoladas, na forma de distrofia muscular tipo cinturas, até grave comprometimento do SNC, com defeitos de migração neuronal e

anormalidades oculares na forma clínica de DMC²⁹. Apesar da quantidade da forma glicosilada da α -DG detectada imunoistoquimicamente na biópsia muscular ser um bom indicador para a seleção do teste molecular, esta não permite identificar o subtipo da distroglicanopatia.

Até o momento os defeitos da glicosilação da α -DG podem decorrer de mutações em pelo menos seis genes que codificam glicosiltransferases específicas, POMT1, POMT2, POGnT1; ou supostas, como fukutina, FKRP e LARGE, já que as exatas funções e interações com as glicosiltransferases não são compreendidas. São seis os tipos de DMCs secundárias à hipoglicosilação da α -DG, de herança autossômica recessiva, inseridas nesse grupo. A DMC tipo Fukuyama no Japão (1:100000 nascidos vivos) e a MOC na população Finlandesa (1/50000 nascidos vivos) são responsáveis pelas mutações fundadoras e permanecem com alta prevalência nessas regiões^{40, 98}.

1.5.4 DMC por deficiência da proteína relacionada à Fukutina (FKRP) ou DMC1C

Inicialmente foram descritas sete famílias com DMC grave, sem envolvimento do SNC, que não adquiriram marcha independente e apresentavam características peculiares tais como hipertrofia de coxas e panturrilhas, além de grande elevação da CPK⁵⁰. Esses pacientes evoluíram com comprometimento respiratório e cardíaco na segunda década de vida. Foram identificadas mutações no gene *FKRP*, que codifica uma glicosiltransferase, a proteína relacionada à fukutina, e interage com a fukutina⁵⁰. Esses pacientes apresentavam redução da α -DG na biópsia muscular, sugerindo se tratar de defeito da glicosilação. Outros casos foram descritos associados a retardo mental, cistos cerebelares e alterações da substância branca⁹⁹⁻¹⁰¹. O mesmo gene foi relacionado com uma forma de distrofia muscular de cinturas em pacientes com início dos sintomas nos primeiros dois

anos de vida e evolução semelhante à distrofia muscular de Duchenne, com hipertrofia muscular nos membros inferiores e, em alguns pacientes, hipertrofia da língua. Sendo assim, a DMC1C é alélica da distrofia muscular de cinturas 2I, com início não congênito¹⁰².

O fenótipo clínico mais grave é representado pela SWW pré-natal, com lisencefalia tipo II associada às alterações oculares^{29, 99}. O nível residual da alfa-DG na análise IHQ relaciona-se com a gravidade do caso e o tipo de mutação¹⁰³. Pacientes com a forma de DMC grave mostram componente heterozigoto (com uma mutação *missense* outra *nonsense*) ou mutação *missense* homozigota, com ausência ou redução importante da α -DG na IHQ¹⁰³.

1.5.5 Distrofia muscular congênita Fukuyama (FDMC)

É uma das doenças autossômicas recessivas mais comuns no Japão, com uma incidência de 0.7-1.2/10.000¹⁰⁴. A primeira descrição ocorreu em 1960, caracterizando-se por hipotonia, fraqueza muscular generalizada, retardo mental e crises convulsivas³¹. As crianças podem apresentar diferentes graus de acometimento motor, os primeiros sintomas geralmente são redução da movimentação fetal e asfixia perinatal¹⁰⁵. Existe um amplo espectro fenotípico, desde ausência de sustento cefálico até permanecer em pé com apoio, de qualquer forma, o quadro é sempre limitante devido ao alto índice de epilepsia. A existência de malformações do SNC, como defeitos da migração cortical (micropoligiria, displasia cortical e cerebelar); e oculares, alterações retinianas, degeneração coriorretiniana, miopia, atrofia óptica, cegueira cortical e movimentos oculares anormais são a marca da doença^{104, 106-109}. Hipertrofia das panturrilhas, do músculo quadríceps e da língua são comuns, assim como cardiomiopatia dilatada, que se torna sintomática na segunda década de vida. Nos casos familiares existe maior impacto motor em relação aos casos

esporádicos, poucos pacientes deambulam sem apoio. O fenótipo mais grave sobrepõe-se à SWW e DMC tipo MOC. Em 1993 foi identificado o gene responsável pela doença, *FKTN*, e em 1998 o produto gênico, a proteína fukutina, uma suposta glicosiltransferase que influencia o processo de migração neuronal e a formação da membrana basal^{39, 40}. Em cerca de 87% dos pacientes, a mutação é uma inserção retrotransposon na região não traduzida do gene em homozigose, a qual é reconhecida como uma mutação fundadora introduzida na população japonesa há aproximadamente 100 gerações, proveniente da Coreia^{39, 106}. Nos outros 13%, o defeito genético corresponde a mutações diversas distribuídas ao longo dos 15 exons do gene. A frequência do heterozigoto é de um em cada 88 indivíduos no Japão e é rara fora do país^{40, 110}. No Brasil há um caso descrito em 2002 por Zanoteli et al, num descendente da população japonesa¹¹⁰. Pacientes com mutações em heterozigose composta (um alelo com a mutação com efeito fundador e o outro com mutação de ponto) têm um fenótipo mais grave do que os pacientes homozigotos¹⁰⁹.

1.5.6 DMC Músculo-óculo-cerebral (MOC) e Síndrome de Walker-Warburg (SWW)

Antigamente chamada de tipo finlandês de DMC e também de síndrome MOC³³, é causada por mutações no gene *POMGnT1*, que codifica a proteína *O*-manose β -1,2-*N*-acetilglucosamiltransferase, a qual participa da síntese do *O*-manosilglucan no processo de glicosilação da α -DG^{33, 44, 111-113}. O quadro clínico é semelhante ao da DMC tipo Fukuyama, com alta ocorrência de epilepsia, porém com maior sobrevida e possível aparecimento de espasticidade¹¹¹. As crianças afetadas são em geral macrocefálicas devido a hidrocefalia e apresentam dismorfismos faciais, com hipoplasia do terço médio da face, ponte nasal curta e micrognatia. Assim como descrito na DMC tipo Fukuyama, a MOC cursa com ampla variabilidade no acometimento do SNC e

no quadro cognitivo. Alguns indivíduos adquirem marcha independente e desenvolvem a fala, enquanto outros apresentam grave comprometimento motor e espectro autístico¹¹⁴. O fenótipo clínico mais grave se sobrepõe à SWW, sendo as particularidades clínicas e radiológicas fundamentais ao diagnóstico. As principais alterações oculares observadas incluem: miopia, degeneração retiniana, atrofia óptica, glaucoma e catarata¹¹¹. As malformações corticais são do tipo polimicrogiria/paquigiria/agiria e alterações da substância branca, podendo haver atrofia cerebelar e de tronco cerebral⁵². Embora mutações no gene *POMGnT1* resultem em uma perda completa da atividade da enzima, é discutível se o tipo de mutação relaciona-se com o grau de gravidade do fenótipo clínico. Pode ser observado em um irmão características de MOC, enquanto em outro, SWW¹¹³. Existe um caso único descrito com mutação em homozigose do gene *FKRP* acarretando no fenótipo MOC¹¹⁵. Provavelmente mutações no gene *FKRP* possam acarretar tanto DMC tipo MOC como SWW, a depender da forma que a mutação afeta as glicosiltransferases.

A SWW é a forma mais grave de DMC e cursa com malformações cerebrais e oculares, associadas ao comprometimento muscular^{34, 116, 117}. As crianças acometidas não superam nenhuma etapa do desenvolvimento neuropsicomotor, apresentando curta sobrevida. A lissencefalia tipo II é a malformação cerebral característica desta síndrome, causada por proliferação neuronal excessiva formando complexo tipo cobblestone. Outros achados são heterotopia neuronal, hidrocefalia obstrutiva, agenesia do corpo caloso, fusão dos hemisférios, encefalocele occipital, cistos de Dandy-Walker, hipoplasia ponto cerebelar e dilatação do IV ventrículo^{34, 116, 117}. Alterações oculares afetam a câmara anterior e posterior, com descolamento de retina e cegueira, coloboma ou outras malformações da íris, hipoplasia do nervo óptico, microftalmia, glaucoma infantil ou congênito, catarata e megalocórnea¹¹⁸. Os acometidos com frequência necessitam precocemente de gastrostomia e derivação ventrículo-peritoneal. A heterogeneidade genética deste fenótipo é marcante⁵⁶, sendo o gene da O-manosiltransferase 1 (*POMT1*) o primeiro implicado^{54, 56, 119}. As mutações se acompanham de redução na expressão da

porção glicosilada da α -DG⁵⁴. Posteriormente, em crianças com fenótipo de SWW foram descritas mutações nos genes das glicosiltransferases *FKRP*, fukutina, *POMT2*, *LARGE* e *POMGnT1*^{86, 120}. Recentemente um novo mecanismo fisiopatológico foi identificado para o fenótipo SWW, o gene *ISPD*, que codifica a proteína contendo domínio isoprenóide sintase e é responsável pelo passo inicial da ligação da laminina aos glicanos, afetando a O-manosilação da distroglicana, sem desempenhar atividade glicosiltransferase⁷⁷. Com o auxílio das técnicas de sequenciamento de todo o exoma, novos genes com funções diversas no metabolismo das distroglicanas também foram associados a este fenótipo clínico: o *B3GNT1* (que codifica a β -1,3-N-acetilglucosaminiltransferase 1)¹²¹ e o *GTDC2* (que codifica a proteína 2-contendo domínio glicosiltransferase like)⁷⁸ foram os mais recentes descritos.

Em 2013, uma nova forma clínica de distroglicanopatia que associa defeito de glicosilação congênita (CDG) à DMC foi relatada em três pacientes graves, que apresentaram atraso intenso no desenvolvimento neuropsicomotor, epilepsia refretária, microcefalia progressiva, hipotonia intensa, elevação da CPK e faleceram nos primeiros anos de vida. Na IHQ foi evidenciada deficiência da O-manosilação da distroglicana e, no estudo metabólico, identificada CDG Iu, com defeito na N-manosilação no retículo endoplasmático. Foram identificadas mutações no gene *DPM2*, que codifica a dolico-fosfato-manosiltransferase 2, a subunidade regulatória do complexo dolico-fosfato-manose sintase, que é uma proteína complexa com três subunidades que se interagem e estabilizam (DPM1, DPM2 e DPM3). A dolico-fosfato-manose atua como doadora na manosilação do retículo-endoplasmático⁷⁵.

1.5.7 DMC com espinha rígida

Esta forma de DMC caracteriza-se pela limitação acentuada dos movimentos da coluna vertebral, especialmente para a flexão da coluna tóraco-

lombar e cervical, decorrente das retrações dos músculos extensores da coluna. A limitação da movimentação dos músculos paravertebrais gera escoliose, com progressiva redução da capacidade vital pulmonar e insuficiência respiratória. Retrações fibrotendíneas em cotovelos e aquileus são também observadas^{41, 46, 122}. Em 2001, foi identificado o gene *SEPN1*, que codifica a selenoproteína N1 do retículo endoplasmático, que apresenta atividade enzimática catalizadora nos processos de óxido-redução e também está envolvida no metabolismo do selênio, além de provavelmente atuar no amadurecimento muscular, tráfico intracelular, homeostase do cálcio e no processo de proliferação e regeneração muscular¹²³. A marcha encontra-se preservada na maioria dos casos e existe um padrão seletivo de hipotrofia da musculatura abduutora das coxas, que é visível à inspeção dos pacientes. É comum o relato de hipotonia quando lactente e de atraso nos marcos motores, seguidos por atrofia acentuada da musculatura axial e fraqueza muscular generalizada. Os pacientes são capazes de deambular até fases avançadas da doença¹²⁴. O acometimento da musculatura facial é comum. Geralmente a escoliose acentua-se no final da primeira década de vida, mas algumas crianças já desenvolvem insuficiência respiratória nos primeiros anos de vida. A biópsia muscular dos pacientes com espinha rígida pode demonstrar, além do padrão distrófico, presença de multiminicore, também encontrado na miopatia minicore^{122, 125}. No entanto, a DMC com espinha rígida é o fenótipo mais grave no espectro da doença, sendo marcante o envolvimento respiratório desproporcional à fraqueza muscular, que compromete a sobrevida. O nível sérico da CPK encontra-se usualmente normal. Até o momento, não existem anticorpos comerciais para análise IHQ, devendo o diagnóstico ser confirmado através da análise molecular¹²².

1.5.8 Outras formas de DMC

A DMC por deficiência da integrina α -7 é um subtipo raro, com somente três casos descritos até o momento. Em comum estes pacientes apresentavam

atraso do desenvolvimento motor no primeiro ano de vida. Um paciente evoluiu com deficiência mental sem alterações à RM de encéfalo, enquanto os outros dois tiveram torcicolo congênito. Apesar de apenas um paciente ter padrão distrófico na biópsia muscular estes casos são mantidos na classificação das DMCs (*ITGA7*)⁴³.

Outra forma descrita em 14 pacientes franco-canadenses, provenientes de 11 famílias, em Quebec, é a DMC deficiência da integrina α -9. Os pacientes tinham discreto atraso no desenvolvimento motor e na aquisição da marcha independente, retrações fibrotendíneas proximais e característica hiperelasticidade distal com predomínio nas articulações metacarpofalangeanas em relação às articulações interfalangeanas⁷⁹. Escoliose foi observada na evolução dos pacientes. A deficiência da integrina α -9, localizada na região 3p23-21, sobrepõe-se às formas de DMCs com deficiência do colágeno VI.

Outra proteína do envoltório nuclear também está envolvida nas DMCs. Até o momento foi descrita em dois irmãos e associa-se à mutação no gene *SYNE1*, que codifica a nesprina 1, cursando com polegares aduzidos, atraso intelectual, hipoplasia cerebelar e catarata¹²⁶.

Em 2011, foram descritas mais duas novas formas de DMCs. Uma delas em apenas uma criança, com discreto atraso motor no primeiro ano de vida, que evoluiu com fraqueza muscular de predomínio proximal, CPK elevada (4 x o limite superior da normalidade) e, curiosamente, apresentou aquisições motoras no decorrer da primeira década de vida. Como a biópsia muscular era distrófica e a IHQ normal para merosina, α -DG e colágeno VI, foi realizada imunomarcação para teletonina, que demonstrou deficiência completa da proteína. No sequenciamento do gene *TCAP* foi identificada mutação. Até então, a deficiência de teletonina era associada à distrofia de cinturas tipo 2G⁸².

A outra forma de DMC foi descrita em 15 indivíduos com fraqueza e atrofia muscular progressiva, de início precoce, associadas à deficiência intelectual grave e anormalidades estruturais mitocondriais na biópsia muscular. Foram identificados acúmulo mitocondrial nas fibras periféricas da biópsia muscular e depleção mitocondrial nas fibras centrais. Em alguns afetados houve cardiomiopatia dilatada ou outras afecções cardíacas. Esse quadro foi associado a mutações em homozigose ou heterozigose composta no gene *CHKB*, que codifica a colina kinase β , que constitui o primeiro estágio enzimático na biossíntese da fosfatidilcolina, chamada DMC relacionada ao gene *CHKB* ou tipo megaconial⁸³.

Além desses subtipos, mutações no gene *DNM2*, relacionado à miopatia estrutural centronuclear, com herança autossômica dominante, também têm sido sugeridas como prováveis formas de DMC, embora ainda não haja consenso. Foram descritas duas crianças, com acometimento facial e da musculatura extra-ocular, nível sérico de CPK normais, que inicialmente apresentavam biópsia muscular com padrão distrófico inespecífico e apenas na evolução foram evidenciados os característicos núcleos centrais⁸¹.

1.5.9 DMC por deficiência da Lamina A/C

Em 2008 foi identificado um novo fenótipo de DMC, caracterizado por fraqueza cervical acentuada, associada a mutações no gene *LMNA*, que codifica a lamina A/C⁶¹.

Existem dois tipos principais de laminas, A e B. As laminas B são codificadas pelos genes *LMNB1* (lamina B1) e *LMNB2* (lamina B2 e B3), e atuam no processo de ancoramento da membrana nuclear, na regulação da fosforilação das laminas e na replicação celular¹²⁷.

Já a lamina A é codificada pelo gene *LMNA*, localizado no cromossomo 1q21.1-21.2 e composto por 12 exons, que codificam quatro tipos de laminas: A, AD10, C e C2; através de *splicing* alternativo. As laminas A e C representam os tipos principais^{87, 128}. A maioria das células do organismo humano expressa a lamina A/C.

A Lamina C (65 kDa) difere da lamina A (70 kDa) apenas na região C-terminal, de onde a denominação de lamina A/C surgiu e constitui o componente mais abundante do envelope nuclear⁸⁷. A lamina C copolimeriza com a lamina A, sendo considerada sobreposta e com a mesma função. A lamina A/C forma filamentos intermediários, parte de um sistema de estruturas filamentosas que constituem o citoesqueleto das células e são componentes da membrana nuclear interna, determinando a forma e o tamanho dos núcleos¹²⁷⁻¹²⁹. Como filamento intermediário, apresentam uma organização tripartida: uma haste central em hélice, seguida por domínios globulares nas extremidades, terminal amino e carboxila. Além disso, possui dois sítios com fosforreceptor em cada extremidade da haste central. Diferem de outras laminas pelo fato do seu sinal de localização nuclear estar localizado no início da cauda, para além da extremidade carboxila. As laminas formam dímeros pelo seu domínio central, interagem com proteínas da cromatina e proteínas da membrana nuclear interna através de inúmeros sítios de ligação localizados na sua cauda globular (terminal carboxila)^{65, 87, 127}.

A lamina A, que possui 646 aminoácidos (aa), é primeiramente traduzida como uma pré-lamina, com 664 aa. Para se transformar na lamina A madura, é submetida a quatro etapas no processamento pós-traducional: a farnesilação, a quebra dupla por endoprotease e a carboximetilação. Todas as modificações ocorrem na região C-terminal, chamada CaaX, na qual C é a cisteína, alvo da enzima farnesil transferase, responsável pela farnesilação da pré-lamina A. Após a farnesilação, o tripeptídeo aaX (serina, isoleucina e metionina) é então clivado pela enzima Ste24 metaloproteinase zinco-dependente (ZMPSTE24). Na sequência, o resíduo de cisteína no C-terminal é carboximetilado pela isoprenilcisteína carboximetiltransferase (ICMT) e, uma segunda clivagem de

15 aa na porção farnesilada da pré-lamina A, pela ZMPSTE24, produz a lamina A madura. A primeira clivagem da pré-lamina A é zinco dependente e a segunda parece ser independente do zinco, ambas ocorrendo através da ZMPSTE24. Sendo assim, a lamina A madura possui uma cauda, composta pelos aa 567 a 646. Já a lamina C é idêntica à lamina A até o códon 566, após o que lhe falta parte do exon 10, bem como dos exons 11 e 12¹²⁷⁻¹²⁹.

Um dos elos de ligação da lamina A/C situa-se entre a porção farnesilada no C-terminal da pré-lamina A e componentes de outras proteínas nucleares, que estabelecem ligação entre o núcleo e o citoesqueleto^{84, 87, 130}. Em conjunto, apresentam várias funções, contribuindo para a manutenção da arquitetura nuclear, pelo sistema de ancoramento e posicionamento inclusive dos poros nucleares, assim como pela modulação do processo de transcrição. As principais proteínas nucleares que se relacionam com a lamina A/C são as seguintes:

- a nesprina 1 e 2, que são proteínas grandes do envelope nuclear e do citoesqueleto;
- a emerina, responsável pela ligação da pré-lamina A farnesilada e não farnesilada, que atuam na organização da estrutura do envelope nuclear e constituem um dos mecanismos mais importantes envolvidos nas doenças do tecido músculo esquelético. A deficiência de emerina gera localização inadequada da pré-lamina A;
- os SUN1 e SUN2, responsáveis pela conexão da membrana nuclear interna com o espaço peri-nuclear e com as nesprinas citoplasmáticas, propiciando uma ligação entre o núcleo e o citoplasma. Outra teoria para a ocorrência das doenças neuromusculares é que a porção farnesilada da pré-lamina A também acarreta redução da expressão do SUN1, favorecendo o agrupamento dos núcleos que poderia ser o principal fator patogênico da doença no tecido músculo esquelético;

- a proteína 2 associada à lamina (LAP2), que atua no ancoramento e medeia a interação das laminas com os fatores reguladores do ciclo celular;
- a MAN-1, que também é reguladora das vias do ciclo celular^{87, 127, 128}.

Figura 2 - Representação esquemática das proteínas da membrana nuclear interna. Lamina A/C forma a estrutura da membrana nuclear interna, ligada a outras proteínas, incluindo proteína emerina (amarela), nesprina 1-alfa¹³¹, proteína 2 associada à lamina (LAP2) (azul), e MAN-1 (roxo), envolvidas no fornecimento de resistência mecânica ao núcleo. Além disso, LAP2, emerina, e MAN-1 ligam diretamente a barreira de fatores de auto-integração que podem ligar-se à heterocromatina. Adaptada de McNally & Pytel, 2007¹³²

Inicialmente acreditava-se que mutações afetando domínios funcionais distintos da proteína relacionavam-se a uma forma clínica peculiar, com comprometimento de um único tecido. No entanto, casos descritos com fenótipo sobreposto de acometimento muscular, lipodistróficos e com envolvimento ósseo; colocaram em dúvida essa teoria, visto que devem existir outros fatores atuando, ainda desconhecidos⁶⁵. Atualmente a classificação das laminopatias está se expandindo dentro de um grupo mais heterogêneo, com acometimento de dois ou mais tecidos, numa forma de sobreposição, sendo sugerido um *continuun*^{133, 134}. Já existem casos descritos associando o acometimento muscular, de distrofia muscular de Emery-Dreifuss e distrofia tipo cinturas, com lipodistrofia e baixa estatura¹³⁵.

As demais laminas codificadas pelo gene *LMNA* são a C2, que é idêntica à lamina C, exceto pela sua cabeça N-terminal, codificada por um exon 1C2,

localizado no primeiro intron do gene *LMNA*; e a AD10, que foi descrita apenas em células cancerosas, sendo uma isoforma da lamina A sem o exon 10^{127, 128}.

O gene *LMNA* que codifica a lamina A/C foi descoberto em 1993 e subsequentemente mapeado no cromossomo 1q21.2-q21.3¹³⁶. A descoberta de mutações da emerina e lamina A/C, como causa da Distrofia Muscular de Emery-Dreifuss (EDMD), em 1994 e 1999 respectivamente, chamou a atenção dos pesquisadores para proteínas do envelope nuclear serem fundamentais na função de homeostase dos tecidos¹²⁷. Diversos estudos surgiram para melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos. Várias doenças foram descritas entre 2002 e 2004, associadas ao envelhecimento precoce pelo acúmulo da pré-lamina A, principalmente da porção farnesilada⁶⁵. Essas doenças foram chamadas laminopatias e apresentam amplo fenótipo clínico, cursando com acometimento de múltiplos tecidos, com senescência celular precoce, alterações do tecido adiposo, da pele, dos ossos e do tecido muscular. A prelamina A desempenha papel fundamental na homeostase nuclear e é o principal foco de estudo para a compreensão da patogênese das laminopatias. Quanto ao acometimento neuromuscular, entende-se que ocorra perda da estabilidade da membrana nuclear, fundamental no movimento de contração muscular, devido a inúmeras possibilidades de alterações em diferentes pontos da rede de conexões das proteínas nucleares, que envolvem a lamina A/C. Alguns trabalhos, como o estudo experimental de Cenni et al, em 2005, consideraram a redução da fosforilação na região N-terminal da lamina A como responsável pelas doenças que afetam o músculo, por causar desestruturação do envelope nuclear, o que posteriormente reafirmado por Mitsuhashi et al, em 2010^{137, 138}. A fosforilação seria então fundamental para manter a estabilidade da rede de conexões nucleares.

As laminopatias humanas mais comumente associadas a mutações no gene *LMNA* são: distrofia muscular de Emery-Dreifuss (EDMD, autossômica dominante e recessiva), distrofia muscular de cinturas 1B, cardiomiopatia dilatada (CMD1A, com afecção do sistema de condução), lipodistrofia parcial familiar autossômica dominante (variedade Dunningan), doença Charcot-Marie-

Tooth autossômica recessiva (CMT2B1), displasia mandibuloacral (MAD), síndrome progeria Hutchinson-Gilford (HGPS), diabetes com lipoatrofia, esteatose hepática, pápulas leucomelanodérmicas com cardiomiopatia hipertrófica, síndrome de Werner (WRN), síndrome progeria cardio-cutânea (CCPS) e dermatopatia restritiva (RD)^{65, 139-141} (Tabela 2).

Tabela 2 - Doenças humanas associadas a mutações no gene *LMNA*.

Doença (herança) (símbolo)	Gene	Fenótipo clínico
Doenças que afetam músculo estriado		
Emery-Dreifuss (AD ¹) (EDMD2) OMIM 181350	<i>LMNA</i>	Retrações nos cotovelos e aquileus; rigidez cervical e espinhal; fraqueza muscular lentamente progressiva com hipotrofia inicialmente úmero-peroneal, na evolução escapular e pélvica; e cardiomiopatia
Emery-Dreifuss (AR ²) (EDMD3) OMIM 181350	<i>LMNA</i>	Fenótipo semelhante EDMD2
Cardiomiopatia dilatada 1A (AD) OMIM 115200	<i>LMNA</i>	Cardiomiopatia sem envolvimento da musculatura esquelética ou com envolvimento mínimo
Distrofia de cinturas 1B (AD) OMIM 159001	<i>LMNA</i>	Fraqueza muscular progressiva e hipotrofia predominando nas cinturas escapular e pélvica
DMC OMIM 613205	<i>LMNA</i>	Miopatia difusa que se apresenta no primeiro ano de vida e cardiomiopatia tardia
Síndrome coração-mão tipo Esloveno (AD) OMIM 610140	<i>LMNA</i>	Defeitos de condução átrio-ventricular/miocardiopatia dilatada de início no adulto, braquidactilia, clindactilia, má formações ósseas falangianas, fraqueza muscular proximal discreta, sem retrações
Síndrome Malouf (AD) OMIM 212112	<i>LMNA</i>	Hipogonadismo hipergonadotrópico, falência ovariana precoce, miocardiopatia dilatada, lipodistrofia discreta, alterações esqueléticas e faciais progressivas como micrognatia
Doenças que afetam o nervo periférico		
Charcot-Marie-Tooth 2 B1 (AR) (CMT2B1) OMIM 605588	<i>LMNA</i>	Neuropatia periférica axonal, com fraqueza e atrofia distal, de início ente 4-27 anos
Leucodistrofias		
Leucodistrofia início adulto (AD) OMIM 169500	<i>LMNB1</i>	Leucodistrofia hereditária que afeta substância branca cerebral e particularmente sistema autonômico, cerebelar e piramidal
Lipodistrofias		
Lipodistrofia parcial familiar tipo Dunningan (AD) (FPLD2) OMIM 151660	<i>LMNA</i>	Apresenta-se na adolescência com perda de tecido gorduroso subcutâneo dos membros e tronco com acúmulo no pescoço e face, freqüente associação com resistência à insulina ou diabetes mellitus
Displasia mandibuloacral (AR) (MADA/B) OMIM 248370	<i>LMNA</i>	Retardo no crescimento pós-natal, anormalidades esqueléticas, lipodistrofia parcial e resistência à insulina, pigmentação da pele mosqueada; alopecia em homens, hipertrigliceridemia e sobreposição com Progeria e Dunningan
Síndrome Barraquer-Simons (mutações heterozigotas) OMIM 608709	<i>LMNB2</i>	Fenótipo semelhante à FPLD2; com perda simétrica do tecido subcutâneo, sentido céfalo-caudal, poupando membros inferiores; a maioria são casos esporádicos
Doenças que aceleram o envelhecimento		
Progeria Hutchinson-Gilford (AD) (HGPS) OMIM 176670	<i>LMNA</i>	Normal ao nascimento e no primeiro ano de vida desenvolvem envelhecimento prematuro, alopecia, perda de tecido subcutâneo, retrações articulares progressivas, alterações ósseas, unhas distróficas, perda auditiva, sobreposição dentária, óbito na 2ª década por doença cardiovascular
Werner atípico (AD) (WNR) OMIM 277700	<i>LMNA</i>	Envelhecimento prematuro com início próximo aos 20 anos e curso mais leve em relação à HGPS
Dermopatia letal restritiva (AD) (RD) OMIM 275210	<i>ZMPSTE54</i> ⁴	Síndrome neonatal letal, com parto prematuro, hiperqueratose na epiderme, acinesia fetal, polidrâmnio, hipoplasia pulmonar e retardo do crescimento intra-uterino

¹ Autossômico dominante² Autossômico recessivo³ Gene localizado no Xq28, que codifica a emerina⁴ Gene que codifica a proteína transmembrana que cataliza a clivagem da pré-lamina A

Antes de 2008, os fenótipos miopáticos mais comuns associados à deficiência de lamina A/C até então eram a forma autossômica dominante de distrofia muscular de Emery-Dreifuss e a distrofia muscular de cinturas 1B, sendo a distrofia de Emery-Dreifuss estimada como a terceira mais frequente entre as formas de distrofia ligadas ao sexo, após a distrofia muscular de Duchenne e a distrofia muscular de Becker⁶⁵.

Em 2008, Quijano-Roy et al descreveram 15 casos classificados em dois grupos de acordo com o grau do comprometimento motor⁶¹. O grupo I foi composto por três pacientes com fraqueza generalizada já no primeiro ano de vida, com intercorrências respiratórias, arritmias cardíacas e dificuldades alimentares. Os três casos evoluíram sem aquisições motoras e com atrofia muscular discrepante na região cervical em relação aos demais músculos. Já o grupo II era composto por 12 pacientes que adquiriram marcha independente e posteriormente desenvolveram fraqueza cervical, afetando principalmente os músculos cervicais extensores, de modo que, semiologicamente, observava-se o sinal da cabeça caída ou “dropped head”. Nove pacientes apresentaram biópsia distrófica, com variabilidade no calibre das fibras musculares, aumento do tecido conjuntivo endomisial e sinais de necrose e regeneração muscular. Os demais pacientes demonstraram padrão miopático inespecífico. Foram descritas onze novas mutações em heterozigose no gene *LMNA*, sendo que a mesma mutação acarretou casos com diferentes gravidades clínicas. Oito pacientes evoluíram com distúrbio ventilatório restritivo e quatro com comprometimento cardíaco, caracterizados por arritmias diversas. Houve um caso de morte súbita. Os autores sugeriram que esta seria uma nova forma de Distrofia Muscular Congênita e denominaram-na DMC *LMNA*-relacionada ou por deficiência de Lamina A/C⁶¹.

Desde então, mutações no gene *LMNA* são sugeridas pelo padrão particular de fraqueza muscular, envolvendo predominantemente a musculatura axial, mais acentuada na musculatura extensora cervical, com hipotrofia escápulo-umeral significativa, em alguns casos há comprometimento distal nos membros inferiores, associados a retrações fibrotendíneas precoces, rigidez da

coluna e de leve a moderado aumento da CPK¹⁴²⁻¹⁴⁵. Devido à fraqueza peculiar da musculatura extensora cervical, os pacientes adquirem um fenótipo típico, compensatório, de hiperlordose espinhal toracolumbar.

Após o relato inicial da doença, foram descritos casos isolados na literatura, até o momento são 37 casos de acordo com o banco de dados disponível online www.umd.be (*Universal Mutation Database*)^{61, 143-146}. Sendo assim, mutações no gene *LMNA* ocorrem em crianças com o quadro clínico acima, que apresentam elevação nos níveis de CPK (3-10x o valor de referência), associadas, na maioria das vezes, ao padrão distrófico na biópsia muscular. A análise imunoistoquímica deve ser normal para as proteínas rotineiramente avaliadas nos pacientes com suspeita clínica de DMC, que são: merosina, distrofina, distroglicana, sarcoglicana e colágeno VI⁴. Casos com fenótipo clínico intermediário entre as formas leve e grave propostas por Quijano-Roy et al foram relatados nos últimos anos^{61, 144}.

Em 2012, Menezes et al descreveram um série de cinco casos, que apresentaram nos primeiros dois anos de vida hipotonia e fraqueza da musculatura extensora cervical, sem antecedentes de redução da movimentação fetal¹⁴². Dois pacientes deambularam até 13 e 19 anos de idade, respectivamente, enquanto outros apresentaram fraqueza generalizada, sem aquisições motoras ou com perda das habilidades aos 15 meses, por exemplo perda da capacidade de sentar. A fraqueza muscular mostrava predomínio proximal nos membros em três pacientes, inclusive nos membros inferiores; enquanto nos outros dois casos era generalizada, com evolução lentamente progressiva. Todos os pacientes apresentaram retrações fibrotendíneas em joelhos e quadris durante o seguimento. A retração de cotovelo observada nos pacientes descritos por Quijano-Roy estava ausente nesse novo grupo de doentes até o momento da publicação^{61, 142}. Todos os casos requereram ventilação não invasiva noturna entre três e 14 anos de idade. Apenas um paciente teve evidência de arritmia cardíaca aos nove anos de idade. Um dos pacientes, além de fraqueza muscular, apresentava hiperelasticidade articular

generalizada, hidrocefalia em associação à malformação de Chiari I, agenesia parcial da foixe cerebral e cisto de pituitária anterior¹⁴².

Além dos casos de Menezes et al, já havia sido relatado outro de DMC por deficiência de lamina A/C associada a alterações no sistema nervoso central¹⁴⁵. Tratava-se de uma menina japonesa, filha de pais não consanguíneos, que no primeiro ano de vida já apresentava postura de cabeça caída, adquiriu a marcha aos 13 meses de idade, desde então mantinha-se com dificuldade para levantar-se e subir degraus, sem retrações fibrotendíneas ou rigidez na movimentação espinhal. Durante a investigação, a ressonância de encéfalo evidenciou hipersinais focais na substância branca cerebral. Tais achados já haviam sido associados à distrofia muscular de Emery-Dreifuss, embora pudessem ter ocorrido de forma inespecífica e independente da DMC¹⁴⁵. Desde então, acompanhamento cuidadoso do possível envolvimento do sistema nervoso central tem sido proposto para pacientes com mutações no gene *LMNA*, a fim de esclarecer se existe realmente uma relação de associação.

A ocorrência de morte súbita nas séries descritas e a grande frequência de arritmia cardíaca, na maioria das vezes com apresentação subclínica, tornam imperativo que a DMC por deficiência de lamina A/C seja suspeitada e diagnosticada rapidamente^{61, 142, 143}. Há um paciente reportado na literatura que, embora tivesse sido diagnosticada com doença neuromuscular desde um ano de vida, devido ao quadro de fraqueza muscular generalizada, sinal proeminente de cabeça caída e hipotonia global; somente aos 15 anos de idade apresentou fibrilação atrial com cardiomiopatia restritiva, sendo indicado o uso de marcapasso e o diagnóstico de DMC por deficiência de lamina A/C foi feito aos 17 anos de idade¹⁴³. Como a maioria dos pacientes descritos apresenta baixa idade, é possível que a frequência da arritmia cardíaca aumente no seguimento desses casos^{61, 143-145}.

Embora o achado mais comum na biópsia muscular seja graus variados de distrofia muscular, com variabilidade do calibre das fibras, aumento do tecido conjuntivo endomisial e perimisial, presença de fibras com necrose e

fibras em regeneração, um fator complicador ao diagnóstico precoce dessa forma de DMC são os achados inespecíficos que podem ser observados, inclusive com características não distróficas^{61, 143-145}. Já foi relatado predomínio de fibras tipo I, hipotrofia de fibras tipo I, atrofia de fibras angulares, agrupamento de fibras e infiltrados celulares mononucleares, da mesma forma que já haviam sido observadas tais alterações em outras formas de laminopatias. O grau de comprometimento da biópsia muscular parece não ter relação com a idade de início das manifestações clínicas, com o fenótipo clínico ou com o nível de CPK^{61, 142}.

Em todos os pacientes nos quais a lamina A/C foi analisada por IHQ, esta resultou normal, pois não há marcador seguro que a distinga das demais proteínas do núcleo, nesprina e emerina, por essa técnica^{61, 143-145, 147}.

Um estudo recente utilizando *Western blotting* (WB) em pacientes com diferentes fenótipos clínicos de doença neuromuscular e mutações no gene *LMNA* demonstrou redução dos níveis de lamina A/C em cinco de nove pacientes, o que pareceu ser útil como ferramenta de diagnóstico¹⁴². No entanto, como não foram sequenciados os genes de todos os pacientes submetidos à avaliação por WB, a sensibilidade e a especificidade do teste não foram determinadas. Cerca de metade dos pacientes com mutações no gene *LMNA* não teria sido diagnosticada se o resultado do WB fosse utilizado como o único critério para guiar o sequenciamento do gene¹⁴².

Em alguns pacientes com laminopatias, a ressonância do músculo parece demonstrar um padrão peculiar de envolvimento. O tecido subcutâneo encontra-se difusamente reduzido, com intensa substituição gordurosa dos músculos axiais, das cinturas escapular e pélvica; e dos membros. Há sinal anormal no bíceps, tríceps e musculatura paravertebral torácica, com moderado envolvimento do deltóide, poupando a musculatura distal dos braços. Nos membros inferiores, o acometimento poupa frequentemente os músculos reto femural, adutor magno e psoas, com grande afecção do vasto lateral e intermédio e dos músculos posteriores da coxa; além de grande

comprometimento da cabeça média do gastrocnêmio com relativa preservação da lateral, de forma semelhante aos achados da distrofia muscular de Emery-Dreifuss e LGMD1B; e, na musculatura cervical, há substituição gordurosa intensa¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. Recentemente foram descritos mais dois pacientes com DMC por deficiência de lamina A/C, com característica substituição gordurosa no pescoço e cintura escapular, afetando o glúteo médio e glúteo mínimo; e poupando os músculos subescapular, glúteo máximo, psoas, reto femoral, sartório, grácil e abdominais. Entretanto, ainda há poucas descrições, devido ao pequeno número de casos. Esses achados poderão ser úteis no diferencial com miopatias que se sobrepõem clinicamente, especialmente as miopatias relacionadas ao *COLV*²³.

Diante disso, em pacientes com fenótipo clínico de distrofia muscular congênita, com fraqueza predominante da musculatura cervical extensora, mesmo quando a presença de distrofia na biópsia muscular for extremamente sutil ou ausente, ou ainda, se houver padrão miopático inespecífico, o gene *LMNA* deve ser sequenciado^{61, 143-145}.

Nos 37 casos, de acordo com o banco de dados, são descritas 21 mutações, a maioria em heterozigose *de novo*, e acarretam em substituição *missense* de aminoácido. Nos pais avaliados, as mutações não foram encontradas^{61, 143-145}. A correlação genótipo-fenótipo ainda não está estabelecida, pois casos com gravidades diferentes têm sido descritos com a mesma mutação. Algumas mutações têm sido encontradas com maior frequência, como p.R249W¹⁵¹ e p.E358K (7 casos). Curiosamente, as mesmas mutações relacionadas à DMC também são responsáveis pelos fenótipos EDMD ou LGMD1B^{64, 142}; assim como o mesmo fenótipo clínico pode ser resultante de mutações em domínios funcionais diferentes da proteína¹⁵² (Figura 3).

Figura 3 - Representação esquemática dos domínios funcionais da proteína lamina A e sua relação com as mutações. Adaptada de Scharner et al, 2011¹⁵²

1.6 Justificativa

A distrofia muscular congênita por deficiência de lamina A/C é um importante diagnóstico diferencial dentro do grupo das distrofias musculares com manifestações clínicas precoces. Até o momento os casos descritos apresentam, em comum, a fraqueza cervical proeminente, com predomínio do acometimento da musculatura extensora, o que facilita a suspeita clínica e o direcionamento para o diagnóstico molecular. Como em nosso ambulatório existem alguns pacientes com características clínicas semelhantes às descritas e sem diagnóstico etiológico esclarecido, optamos por estudar esses casos. Também pela possibilidade de ampliar o espectro fenotípico de pacientes com distrofia muscular congênita e mutação no gene *LMNA*, particularmente na população brasileira.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Foram objetivos deste estudo:

- 1) Pesquisar mutações no gene *LMNA* em crianças com fraqueza cervical proeminente e diagnóstico de DMC sem deficiência proteica específica definida.
- 2) Descrever os aspectos clínicos e histológicos musculares dos pacientes com DMC por deficiência de lamina A/C confirmados pelo estudo molecular.
- 3) Caracterizar clínica e histologicamente o grupo de pacientes com fraqueza cervical proeminente e diagnóstico de DMC sem deficiência proteica específica definida, nos quais não foram identificadas mutações no gene *LMNA*.

3 PACIENTES E MÉTODOS

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Pacientes

Foram incluídos neste estudo pacientes com diagnóstico clínico e histológico de DMC, que semiologicamente apresentassem fraqueza cervical proeminente, em acompanhamento médico regular no Setor de Doenças Neuromusculares do Serviço de Neurologia Infantil da Divisão de Clínica Neurológica do HC-FMUSP. Foram coletadas amostras de sangue periférico dos casos índices e de seus familiares após a leitura e assinatura do termo de consentimento informado. O projeto foi analisado e aprovado pelo conselho de ética do Hospital das Clínicas (FMUSP), sob número do protocolo de pesquisa 0251/10.

3.2 Métodos

3.2.1 Quadro clínico

Os pacientes selecionados foram reavaliados segundo protocolo clínico e neurológico, o qual inclui história clínica, com dados gestacionais, perinatais, referentes ao desenvolvimento neuropsicomotor e evolutivos, além da história familiar, exame clínico e neurológico. A força foi graduada de acordo com a classificação MRC, *Medical Research Council*. Foram obtidas informações relativas aos exames subsidiários já realizados, como por exemplo o nível sérico da CPK e aldolase, exames de imagem do sistema nervoso central e muscular, eletroneuromiografia, prova de função pulmonar, polissonografia, ecocardiograma e eletrocardiograma, entre outros.

3.2.2 Análise histológica

Todos os pacientes já possuíam fragmentos musculares estocados a -80°C , já que o diagnóstico de DMC foi feito através de biópsia realizada previamente. As biópsias musculares de todos os pacientes foram revisadas pela autora juntamente com o Prof. Dr. Edmar Zanoteli. As lâminas com os fragmentos musculares submetidas às colorações histológicas básicas de hematoxilina & eosina (HE), tricrômico de Gomori (GO), ácido periódico de Schiff (PAS) e “oil red” O (ORO) foram avaliadas quanto ao aspecto global da morfologia muscular incluindo variabilidade no tamanho das fibras, internalização nuclear, presença de infiltrado conjuntivo-gorduroso, aspectos de degeneração e regeneração das fibras e presença de necrose e inflamação, e depósito de glicogênio e lipídio. Tais aspectos foram quantificados em normais (0), leves (+), moderados (++) e intensos (+++). Nas reações histoquímicas NADH tetrazolium redutase (NADH), succinato desidrogenase (SDH), fosfatases ácidas e alcalinas, e adenosina trifosfatase (ATPase) em diferentes pHs (9.3, 4.6 e 4.3) foram avaliados os aspectos gerais da arquitetura interna das fibras (mini-cores, fibras em mordida de traça, aneladas e lobuladas) e a distribuição dos diferentes tipos de fibras (predominância de fibras do tipo 1 ou 2). As alterações observadas nas fosfatases e ao NADH foram quantificadas da seguinte forma: normais (nls), leves (+), moderadas (++) e intensas (+++).

3.2.3 Análise Imunoistoquímica

Rotineiramente, no laboratório de biópsia muscular do Departamento de Neurologia da FMUSP (LIM15), após a confirmação histológica do diagnóstico de distrofia muscular, foram processadas reações imunoistoquímicas para as proteínas merosina, distrofina (porções C-terminal, N-terminal e domínio central), colágeno VI, sarcoglicanas (alfa- beta-, gama- e delta-), disferlina e

caveolina-3, com o objetivo de identificar formas específicas de distrofias musculares.

Para os casos de deficiência de lamina A/C, confirmados pelo diagnóstico molecular, foram incluídas as análises imunoistoquímicas através de imunofluorescência indireta das proteínas emerina e lamina A/C, com o objetivo de verificar a expressão de proteínas do envoltório nuclear, e das proteínas desmina e miotilina, com o intuito de detectar desarranjos focais da arquitetura interna das fibras e formação de massas/agregados intracitoplasmáticos.

As reações imunoistoquímicas foram realizadas através da técnica de imunoperoxidase. Os fragmentos musculares não fixados foram incubados com solução de bloqueio (0.1% BSA, 10% soro normal, 0.5% Tween em PBS) por 30 min em temperatura ambiente. Então os fragmentos foram incubados com anticorpo primário diluído em tampão de bloqueio por 1-3 horas em temperatura ambiente. Após lavagem em tampão de lavagem (0.1% BSA, 0.5% Tween em PBS), os fragmentos foram incubados com anticorpo secundário por 30 min em temperatura ambiente. As lâminas foram então mantidas em 0.1% de H_2O_2 por 30 min para remover a peroxidase endógena e lavadas em tampão de lavagem novamente. Procedeu-se assim com o método ABC (avidin-biotin-complex) usando kit da Vector® (*Vector Laboratories, Burlingame, CA*). Após efetuada a lavagem das lâminas, aplicou-se diaminobenzidina (DAB) por 2 a 5 min. Depois, a reação foi bloqueada com lavagem em água e, logo após, realizada contra-coloração das lâminas com hematoxilina, desidratação em álcool ascendente, lavagem em xileno e montagem com meio aquoso. As lâminas foram examinadas em microscópio óptico. Como controle interno, fragmentos musculares foram incubados apenas com anticorpo secundário.

Na técnica de imunofluorescência indireta, fragmentos musculares, não fixados, são mantidos por 10 minutos em ar ambiente e em seguida são bloqueados com tampão de bloqueio (2% BSA em PBS, soro normal e 0.2% triton-X 100) por 30 minutos em temperatura ambiente. Os fragmentos são então incubados com anticorpo primário diluído em tampão de bloqueio por 1-3 horas em temperatura ambiente. As lâminas são lavadas com PBS por 3 vezes

(10 minutos cada), e bloqueados novamente com tampão de bloqueio por 20 minutos. Em seguida, os fragmentos são incubados com anticorpo secundário por 1 hora em temperatura ambiente, lavados com PBS por 4 vezes (10 minutos cada), e montados com Vectashild (*Vector Laboratories, Burlingame, CA*). As lâminas foram examinadas em microscópio de fluorescência. Os anticorpos usados para o diagnóstico imunoistoquímico estão listados na Tabela 3.

Tabela 3 - Anticorpos utilizados para o diagnóstico imunoistoquímico.

Anticorpo	Clone	Empresa / código	Título
Distrofina (domínios C, N e central)	Dy4/6D3, Dy8/6C5 e Dy10/12B2	Novocastra/NCL-DYS1, DYS2 e DYS3	1:20
Disferlina	Ham1/7B6	Novocastra/NCL-Hamlet	1:20
Adalina	Ad1/20A6	Novocastra/NCL-a-SARC	1:20
Gama-sarcoglicana	35DAG/21B5	Novocastra/NCL-g-SARC	1:20
Delta-sarcoglicana	deltaSarc3/12C1	Novocastra/NCL-d-SARC	1:20
Beta-sarcoglicana	betaSarc1/5B1	Novocastra/NCL-b-SARC	1:20
Merosina (lamina alfa-2, 300kDa)	Mer3/22B2	Novocastra/NCL-Merosin	1:100
Lamina A/C	636	Novocastra/LAM-A/C	1:100
Emerina	4G5	Novocastra/NCL-Emerin	1:400

3.2.4 Extração de DNA

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, foi coletada uma amostra de 5 a 10 ml de sangue periférico dos pacientes e dos familiares no Laboratório Central do HCFMUSP. Este material foi enviado para o LIM45 (Disciplina de Neurologia Experimental-FMUSP), onde foi realizada a extração de DNA linfocitário usando protocolo descrito por Miller et al (1988)¹⁵³.

3.2.5 PCR (reação em cadeia da polimerase)

Os 12 éxons do gene *LMNA* foram amplificados em termocicladora marca Eppendorf, utilizando-se pares de oligonucleotídeos e protocolos previamente descritos^{63, 154, 155}. As sequências dos oligonucleotídeos utilizados no estudo estão descritas na Tabela 4. Em geral, um volume final de 25 µl com cerca de 100 ng de DNA, 10mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 200 µM dNTP, 1.5 a 2.0 mM MgCl₂, 10 pmol de cada primer e 1 U Taq polimerase, foi submetido a protocolo de PCR ajustado para cada par de oligonucleotídeo usado. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose de 1.5 a 2%, corado com brometo de etídio, e visualizados com luz ultravioleta. Os produtos amplificados foram então purificados utilizando-se kit para purificação de PCR (*GFX™ PCR DNA and gel band purification kit*, GE healthcare), de acordo com as recomendações do fornecedor.

Tabela 4 - Sequência de oligonucleotídeos utilizada no estudo (Copiada do Laboratório Seidman, disponível online no endereço www.dmd.nl/LMNA_primers.html)

Exon	Forward primer / reverse primer	Name
1	CCCAGATCCCGAGGTCCGAC / CCTCTCCACTCCCCGCCA	1f/r
2	CAGACTCCTTCTCTAAATCTAC / CCTAGGTAGAAGAGTGAGTGATC	2f/r
3	CCTTCAAGTTCTTGTGTTCTGTGAC / CCTAGCCCAGCCCAAGTCTGTC	3f/r
4	GGCCTCCCAGGAACTAATTCTG / CTCCTGCCACCATCTGC	4f/r
5	GCTGTAGCAGTGATGCCAAC / CCAAAGCCCTGAGAAGTGAAG	5f/r
6	GCCAGGACTATGTTTAGAGCTTG / GGTCTAGTCAAGGCCAGTTG	6f/r
7	CCCCACTTGGTCTCCCTCTCC / CCCTGATGCAGCTGTATCCCC	7f/r
8	GAGGCCTCAATTGCAGGCAGGC / GAAAAGGACACTTACCCCAGC	8f/r
9	GGAGCGCTGGGGTAAGTGTC / CTCGTCCAGCAAGCAGCCAG	9f/r
10	GTAAGCAGCAGGCCGGACAAAG / CACAGGAATATTCCATGGCATC	10f/r
11	GGAGCCTGCAGGAGCCTGGAGC / GCTGCGGAAGAGAAGGCAGGCTC	11f/r
12	CTTGTCTGAGCCCCAGACTGGAG /	12f
	GGGGTGGCAGCTTCGGGGACAATC / AGGGAAAAGGAAGGGAGGAGAAAT	12F04/R04

3.2.6 Sequenciamento

O sequenciamento dos fragmentos amplificados foi realizado nas duas direções usando os mesmos pares de oligonucleotídeos das reações de PCR, no aparelho 3730 DNA Analyzer da Applied Biosystems (Foster City, CA), no Laboratório de Endocrinologia da FMUSP (LIM25), ou no sequenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare), localizado no laboratório de Alergia e Imunologia Experimental (LIM 56). As sequências obtidas foram analisadas nos programas *Chromas 213* e *Mutation Surveyor Demo V 3.20*. A nomenclatura das mutações seguiu as recomendações publicadas por den Dunnen et al, 2000 ¹⁵⁶.

As mutações encontradas no gene *LMNA* foram comparadas com os bancos de dados disponíveis online nos endereços www.umd.be (*Universal Mutation Database*) e <http://www.hgmd.org> (HGMD - Human Gene Mutation Database)^{146, 155}.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

Foram selecionados 13 pacientes para o estudo do gene *LMNA* com fenótipo clínico de fraqueza cervical proeminente e histológico de DMC, e com acentuada fraqueza cervical, em que a análise IHQ da expressão da merosina, colágeno 6, disferlina, distrofina e sarcoglicanas foi normal na biópsia muscular. Neste grupo houve quatro pacientes do sexo feminino e nove do sexo masculino, com idade variando de 2 a 18 anos (Tabelas 5, 6, 7, 8 e 9). Mutações no gene *LMNA* foram identificadas em quatro casos (30,7%), ocorrendo em heterozigose e já haviam sido descritas previamente como patogênicas em pacientes com distrofia muscular.

4.1 Caso 1

Menino, 9 anos de idade, filho de pais não consanguíneos, sem história familiar de qualquer doença neuromuscular. Não apresentou intercorrência gestacional ou perinatal e movimentação fetal esteve presente a partir do quinto mês de gestação. O paciente apresentou marcos adequados do desenvolvimento motor no decorrer do primeiro ano de vida, mas andou sem apoio somente aos 19 meses de idade. Desde a aquisição da marcha, foi observada dificuldade para levantar-se do chão e para subir escadas. Aos dois anos de idade, os pais notaram fraqueza cervical e dificuldade para manter a cabeça erguida, e o paciente evoluiu com piora motora, principalmente para deambular de forma independente. O quadro de fraqueza muscular generalizada progrediu lentamente, assim como as deformidades, que acarretaram perda da capacidade de deambular aos seis anos de idade (Tabelas 5 e 6) (Figuras 4, 5 e 6). Naquele momento, durante o acompanhamento, foram diagnosticadas insuficiência respiratória restritiva e arritmia sinusal, com raras extrassístoles atriais. Ao exame clínico atual foram observados: hipotrofia e hipotonia muscular global, fraqueza predominante na

porção proximal dos membros e região cervical, principalmente na extensão do pescoço, e arreflexia. Também existiam, desde os exames clínicos iniciais realizados aos três anos de idade, contraturas significativas no músculo esternocleidomastoideo e nas grandes articulações dos membros superiores e inferiores, sem hiperelasticidade articular. Aos nove anos de idade desenvolveu insuficiência respiratória aguda decorrente de um quadro infeccioso pulmonar, necessitando de ventilação mecânica por período prolongado de tempo, sendo submetido a traqueostomia. A CPK sérica foi elevada, 6 vezes o valor superior de referência. A eletroneuromiografia demonstrou um padrão miopático, com velocidade de condução normal. Na avaliação histológica da biópsia muscular realizada aos três anos de idade foi observado padrão distrófico leve, com variação no tamanho das fibras, aumento do tecido conjuntivo, raros núcleos internalizados, sem infiltrados inflamatórios. Havia também presença marcante de agregados intracitoplasmáticos vistos sob tricrômico de Gomori e preservação da arquitetura interna das fibras musculares (Tabelas 7 e 8). Na análise IHQ foram avaliadas as proteínas merosina, distrofina, colágeno VI, sarcoglicana, disferlina, caveolina-3, emerina, desmina e lamina A/C, todas presentes (Figura 8). O sequenciamento do gene *LMNA* revelou uma substituição missense do ácido glutâmico por lisina, mutação p.E358K, no exon 6 (Figura 10). O sequenciamento do gene dos pais não evidenciou qualquer anormalidade. O paciente realizou RM de encéfalo que não detectou alterações.

4.2 Caso 2

Menino, 8 anos de idade. Não há relato de consanguinidade e de doença neuromuscular na família. A mãe não apresentou intercorrências durante a gravidez e o bebê nasceu com 38 semanas de idade gestacional, através de parto normal. No período neonatal, evoluiu com desconforto respiratório precoce e permaneceu hospitalizado por 13 dias, sem necessidade de ventilação mecânica. Aos seis meses de idade já conseguia sentar sem apoio.

Entretanto, no decorrer do segundo semestre de vida, evoluiu com perda do sustento cervical, com redução do volume e tônus muscular, sendo referido ao serviço médico pelo desenvolvimento de hipotrofia muscular intensa (Tabelas 5 e 6). Também não existiam outros casos de doença neuromuscular na história da família. Aos 15 meses de idade, foi diagnosticado com DMC. Na avaliação inicial, em nosso serviço, foram referidos nível cognitivo normal, fraqueza muscular generalizada, com predomínio proximal, inclusive afetando a musculatura facial; com ausência de reflexos profundos, palato ogival e o sinal da cabeça caída (Figuras 4 e 5). Não conseguia sentar-se de forma independente e nunca deambulou. Apresentava escoliose torácica e retrações fibrotendíneas difusas, exceto nos cotovelos, em que existia hiperextensibilidade. No início do seguimento, a dosagem da CPK foi elevada (5 vezes acima do limite superior da normalidade) e, ao longo da evolução, normalizou-se. A avaliação cardíaca, realizada anualmente no seguimento do paciente, com monitorização Holter 24 horas, eletrocardiograma e ecocardiograma foi sempre normal. Apresentou distúrbio de deglutição, com baixo ganho pondero-estatural e desnutrição, sendo submetido à gastrotomia aos seis anos de idade. Na mesma época, apresentou subitamente parada cardiorrespiratória, necessitando de suporte ventilatório e, desde então, encontra-se traqueostomizado, dependente de ventilação mecânica, estando internado em unidade de terapia intensiva há 2 anos. A biópsia muscular realizada aos 15 meses de idade demonstrou padrão distrófico: intensa variabilidade no calibre das fibras, com abundantes fibras atroficas, fibras necróticas e regenerativas; núcleos centrais e moderada fibrose endomisial, associada à presença de infiltrado inflamatório linfomonocuclear perimisial; caracterizando um padrão distrófico (Tabelas 7 e 8). A análise IHQ para merosina, distrofina, colágeno VI, sarcoglicanas, disferlina, caveolina-3, emerina e lamina A/C não demonstrou qualquer anormalidade. Foi identificada a mutação no exon 4 p.R249W *de novo*, em heterozigose, que acarretou a substituição *missense* de arginina pelo triptofano, o que confirmou a doença (Figura 10). No seguimento também foi realizada TC de crânio que não demonstrou anormalidades.

4.3 Caso 3

Menina, 6 anos, foi encaminhada para avaliação em nosso ambulatório aos três anos de idade devido atraso no desenvolvimento motor. Nasceu a termo, sem complicações gestacionais ou perinatais, filha de pais não consanguíneos. Os pais perceberam o atraso motor desde os primeiros meses de vida e, aos seis meses, ainda não tinha sustento cefálico. Conseguiu sentar sem apoio aos dois anos de idade e nunca andou. Após os três anos de idade, evoluiu com baixo ganho pondero-estatural associado a episódios de engasgos frequentes, sendo então submetida a gastrostomia. Na mesma época iniciou desconforto respiratório durante o sono, sendo indicado suporte ventilatório não invasivo noturno. O desenvolvimento cognitivo foi normal desde o início do quadro. Apesar do perímetro cefálico ser normal para a idade, a criança apresentava desproporção crânio-corporal causada pela hipotrofia muscular acentuada. Realizou TC de crânio com evidência de coleção subdural benigna da infância, sem outras anormalidades. O exame neurológico revelou fraqueza generalizada, com predomínio proximal, hipotonia e hiporreflexia. Também chamava atenção o predomínio da fraqueza na musculatura extensora cervical, a postura de cabeça caída e, secundariamente, escoliose torácica discreta com hiperlordose lombar (Tabelas 5 e 6). Existiam retrações fibrotendíneas nos tornozelos, joelhos, quadris, cotovelos, punhos e dedos das mãos (Figuras 4, 5 e 6). A avaliação cardiológica complementada pelo eletrocardiograma e ecocardiograma foi normal em duas ocasiões. A eletroneuromiografia dos quatro membros evidenciou redução das velocidades de condução sensitivo-motoras (32-40 m/s), com predomínio distal, e redução discreta das amplitudes dos potenciais de ação motor; na miografia com agulha concêntrica notou-se padrão miopático crônico de predomínio na musculatura proximal dos membros, sendo os dados neurofisiológicos compatíveis com miopatia crônica e polineuropatia sensitivo-motora mista, de intensidade leve à moderada, nos quatro membros. A CPK sérica foi 963 UI/L (normal < 228 UI/L). Aos três anos de idade, a histologia muscular revelou padrão distrófico leve, sem deficiência proteica específica identificada na IHQ. O sequenciamento do gene *LMNA*

revelou a mutação p.N39S, no exon 1, que acarreta a substituição *missense* da asparagina pela serina. Aos 6 anos, a paciente faleceu após episódio súbito de dispnéia, de causa não esclarecida.

4.4 Caso 4

Menino, 8 anos, filho de pais não consanguíneos, sem relato de intercorrências gestacionais ou perinatais e de doenças neuromusculares na família. A mãe referia movimentação fetal presente desde o sexto mês de gravidez. Nasceu a termo, de parto cesárea, pois não houve progressão do trabalho de parto normal. Aos dois meses de vida, adquiriu sustento cefálico e, no 2º trimestre de vida, perdeu totalmente o controle cervical. Evoluiu com fraqueza muscular axial e nos membros, com atrofia predominante na musculatura cervical (Figuras 4 e 5). Aos seis meses de idade foi encaminhado para investigação em nosso ambulatório. Aos dois anos de idade passou a andar sem apoio, utilizando as mãos para sustento da cabeça. Aos três anos de idade desenvolveu retrações fibrotendíneas em aquileus e joelhos. Desde então, evidenciava-se hiperextensibilidade distal nos membros superiores. Evoluiu com piora progressiva da fraqueza muscular e aos quatro anos de idade houve perda da marcha. Ao exame neurológico, havia predomínio da fraqueza proximal nos membros superiores e inferiores, além do comprometimento acentuado da musculatura cervical, com prejuízo inclusive para vencer a gravidade; e ausência de reflexos osteotendíneos. Aos cinco anos de idade, necessitou de suporte alimentar, em decorrência da taxa de crescimento pondero-estatural abaixo da esperada para idade, sendo submetido à gastrostomia. Durante o seguimento clínico do paciente, aos seis anos de idade, a polissonografia evidenciou hipoventilação noturna, sendo iniciada ventilação não invasiva com pressão positiva durante o sono. A dosagem da CPK aos sete anos de idade foi normal, embora no início do seguimento, aos três anos, houvesse discreta elevação da enzima (2x acima do limite superior da normalidade). Aos oito anos de idade, durante

investigação cardiológica por monitorização Holter 24 horas foram detectadas extrassístoles supraventriculares frequentes, passando a ser acompanhado pela equipe de cardiologia. Aos quatro anos de idade, a biópsia muscular demonstrou padrão distrófico, com variabilidade no calibre das fibras, fibras atroficas e presença de infiltrado conjuntivo perimisial (Tabelas 7 e 8). A RM dos músculos cervicais e das porções proximais e distais dos membros superiores e inferiores, realizada aos oito anos de idade, evidenciou substituição gordurosa intensa e atrofia nos músculos cervicais posteriores, afetando também o músculo glúteo máximo, os compartimentos anterior e posterior da coxa e o músculo gastrocnêmio medial, com relativa preservação da musculatura distal tanto dos membros superiores como dos inferiores (Figura 9). A análise IHQ foi normal para todas as proteínas rotineiramente testadas. Foi identificada uma substituição *missense* no exon 1 do gene *LMNA* (p.N39S), a mesma encontrada no caso 3 (Figura 10).

Tabela 5 - Caracterização clínica e genética dos pacientes com DMC por deficiência de lamina A/C.

Caso / Idade	Sexo	Mutação	Sinais clínicos iniciais	Máxima habilidade motora	Perda de habilidades motoras/ última avaliação	Nível da CPK ¹ (<228UI/L)
1 / 9 a ²	M ³	p.E358K	Dificuldade para levantar-se e subir degraus aos 2 anos e fraqueza cervical progressiva	Andou aos 19 meses	Perda da marcha aos 6 anos / Senta quando colocado	X6
2 / 8 a	M	p.R249W	Distúrbio respiratório no período neonatal e hipotonia	Sentou sem apoio aos 6 meses	Sem sustento cefálico e de tronco desde os 7-8 meses	X5
3 / 6 a	F ⁴	p.N39S	Desenvolvimento motor atrasado, sem sustento cefálico	Sentou sem apoio aos 2 anos	Controle cefálico pobre desde os primeiros meses de vida / Senta quando colocada	X4
4 / 8 a	M	p.N39S	Perda do controle cervical	Andou sem apoio aos 2 anos com queda da cabeça	Pobre controle cervical desde os 6 meses / Senta quando colocado	X2

¹ Creatinofosfoquinase

² Anos

³ Masculino

⁴ Feminino

Tabela 6 - Caracterização clínica e achados na biópsia muscular dos pacientes com DMC por deficiência de lamina A/C.

Caso	Predomínio da fraqueza muscular / MRC ¹	Contraturas articulares	Hiper-elasticidade	Envolvimento cardíaco / Respiratório	ENMG ²	Biópsia muscular
1	Axial>MS ³ =MI ⁴ Membros: II proximal e III distal	Precoce: SCM ⁵ bilateral Tardia: cotovelos, punhos, joelhos, aquileus e quadril	Não	Arritmia sinusal 6 a ⁶ / Insuficiência respiratória restritiva 6 a e traqueostomia aos 9 a	Miopática	Distrófica Leve e Presença de agregados intra-citoplasmáticos
2	Axial=MS=MI II	Joelhos, aquileus, quadril e punhos	Cotovelos	Aos 6 a, PCR ⁷ súbita revertida Traqueostomia aos 6 a, dependente de ventilação mecânica	Não realizada	Distrófica Grave
3	Axial>MI>MS Membros: III MS (discreta assimetria) e II MI	Aquileus, joelhos, quadril, cotovelos, punhos e dedos das mãos	Não	Morte súbita por provável arritmia cardíaca aos 6 a / Hipoventilação noturna – BIPAP ⁸ 3 a	Neuropática	Distrófica Moderada
4	Axial>MI>MS Membros: II proximal e III distal MS e II MI	Cotovelos, quadril, joelhos e aquileus	Distal nos membros superiores	Arritmia cardíaca em investigação 8 a BIPAP ⁸ noturno aos 5 a	Miopática	Distrófica Leve

¹ Medical Research Council² Eletroneuromiografia³ Membros superiores⁴ Membros inferiores⁵ Músculo esternocleidomastoideo⁶ Anos⁷ Parada cardiorespiratória⁸ Do inglês, Bilevel Positive Pressure Airway

Tabela 7 - Características histológicas na biópsia muscular dos pacientes com DMC por deficiência de lamina A/C, avaliadas através das reações hematoxilina & eosina / tricômico de Gomori.

Caso	HE ¹ /GOMORI ²					Outros achados
	Variabilidade no calibre das fibras	Aumento do tecido conjuntivo		Núcleos internalizados	Necrose	
		Perimisial	Endomisial			
1	+	+	nl ³	+	+	Agregados intracitoplasmáticos
2	+++	+++	+++	ausente	+++	Infiltrado linfomononuclear perimisial
3	+++	++	++	++	+++	-
4	++	+	+	+	+	-

¹ Hematoxilina-eosina

² Tricômico de Gomori

³ Normal

+ Leve, ++ Moderado, +++ Intenso

Tabela 8 - Características histológicas na biópsia muscular dos pacientes com DMC por deficiência de lamina A/C, avaliadas por reações imunoistoquímicas.

Caso	Fosf. ácida ¹	Fosf. Alcalina ²	NADH ³	ATPase ⁴	PAS ⁵	ORO ⁶	SDH ⁷	Conclusão
1	+	raras +	desorganização da arquitetura interna +	Atrofia I	nl ⁸	nl	nl	Distrófico Leve
2	+++	++	não visível pelo pouco número de fibras	Não tem	nl	nl	nl	Distrófico Grave
3	+	NR ⁹	desorganização da arquitetura interna ++	40% Fibras tipo I	nl	nl	nl	Distrófico Moderado
4	+	raras +	desorganização da arquitetura interna +	Atrofia I	nl	nl	nl	Distrófico Leve

¹ Fosfatase ácida

² Fosfatase alcalina

³ Nicotinamida adenina dinucleótido desidrogenase

⁴ Adenosina trifosfatase miofibrilar

⁵ Ácido periódico de Schiff

⁶ Oil-red-O

⁷ Desidrogenase succínica

⁸ Normal

⁹ Não reagente

+ leve, ++ moderado, +++ intenso

Figura 4 - Característica fenotípica predominante dos pacientes com DMC por deficiência de lamina A/C. Hipotrofia cervical marcante com fraqueza da musculatura extensora cervical e sinal da cabeça caída nos casos 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 (D).

Figura 5 - Hipotrofia muscular global nos pacientes com DMC por deficiência de lamina A/C observada nos casos 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 (D).

Figura 6 - Retrações fibrotendíneas em diferentes articulações nos pacientes com DMC por deficiência de lamina A/C. A) Caso 1. B, C e D) Caso 3.

Figura 7 - Aspectos da biópsia muscular dos pacientes com DMC por deficiência da lamina A/C. A) Aspecto muscular distrófico leve no caso 1 (H&E, 40X). B) imagem ampliada do A demonstrando agregados intracitoplasmáticos (seta) (caso 1, H&E). C) defeitos enzimáticos da atividade oxidativa intracitoplasmática no caso 1 (NADH, 40X). D) substituição do tecido muscular por fibrose intensa no caso 2 (H&E, 40X). E) aspecto muscular distrófico caracterizado por variabilidade no calibre das fibras, aumento do tecido conjuntivo, centralização nuclear, necrose e fibras em regeneração no caso 3 (H&E, 40X). F) defeitos da citoarquitetura intracitoplasmática, detectada pela reação citocromo-C-oxidase no caso 3¹⁵⁷. G) aspecto muscular distrófico leve no caso 4 (H&E, 40X). H) atrofia de fibras tipo 1 com leve defeito na atividade oxidativa nessas fibras no caso 4 (NADH, 40X).

Figura 8 – Reação de imunofluorescência para emerina, lamina A/C e desmina. Expressão normal das proteínas emerina, lamina A/C e desmina na biópsia muscular do paciente 1.

Figura 9 – Ressonância de músculos cervicais e apendiculares em paciente com DMC por deficiência de lamina A/C (caso 4) (imagens axiais pesadas em T1-WI) . Substituição gordurosa intensa representada pelo hipersinal e atrofia dos músculos cervicais posteriores (Ce) em **A**, do músculo glúteo máximo em **B**, nos compartimentos anterior (A) e posterior da perna (P) em **C**, da porção medial do músculo gastrocnêmio (GC-M) em **D**, do músculo bíceps (B) e tríceps (T) em **E** e relativa preservação da musculatura distal do braço (E e P) e músculos flexores dos dedos (F) em **F**.

Figura 10 - Mutações no gene *LMNA* em quatro pacientes com DMC. A) Mutação p.E358K no caso 1, B) mutação p.R249W no caso 2, e C e D) mutação p.N39S nos casos 3 e 4, respectivamente.

4.5 Pacientes sem mutação no gene *LMNA* identificada

Em nove pacientes, com idade entre 2 e 18 anos, sendo 3 do sexo feminino e 6 do sexo masculino, não foram identificadas mutações no gene *LMNA*. Todos haviam sido selecionados pela presença marcante do sinal da cabeça caída. Esses pacientes apresentavam quadro clínico caracterizado por atraso motor ou involução motora, sendo bastante semelhantes aos casos confirmados (Figura 11). O início dos sintomas variou do período neonatal aos dois anos de idade; apenas três adquiriram marcha independente, mas mantendo o aspecto da fraqueza cervical durante a deambulação; os demais apenas sentam quando colocados (Tabela 9). Em relação ao fenótipo clínico, identificamos algumas peculiaridades como a presença de hiperelasticidade em seis pacientes, sendo três deles com predomínio distal (casos 7, 8 e 11); hiperlordose lombar nos casos 5, 8, 9 e 10; além de ocorrências isoladas de retrações fibrotendíneas no músculo esternocleidomastóideo no caso 8, espinha rígida característica no caso 5 e hipotrofia proeminente da cintura escapular no caso 11. O nível de CPK nesse grupo variou do normal a 2x o limite superior da normalidade e o estudo neurofisiológico, quando realizado, identificou o padrão miopático de acometimento neuromuscular. A biópsia muscular variou de achados inespecíficos, tais como atrofia de fibras tipo 1I no caso 5, até graus variados de aspecto distrófico (Figura 12). Quanto aos distúrbios cardíacos, todos os casos realizaram investigação com ecocardiograma e monitorização com Holter 24 horas, que não evidenciaram alterações. O envolvimento respiratório ocorreu em três casos, com distúrbio ventilatório restritivo, sendo que 2 deles fazem uso de ventilação não invasiva com pressão positiva durante o sono. O caso 6 necessitou de suporte ventilatório no período neonatal; inicialmente dependente de ventilação mecânica, foi traqueostomizado e, curiosamente, evoluiu com melhora progressiva do padrão respiratório sendo retirado o acesso alternativo à via aérea aos dois anos de idade. Até o momento, não houve nenhum caso com distúrbio de deglutição grave necessitando de gastrostomia. Durante o

seguimento, cinco desses pacientes realizaram tomografias de crânio que não evidenciaram anormalidades (casos 6, 10, 11, 12 e 13).

Tabela 9 - Caracterização fenotípica dos pacientes com DMC sem mutação identificada no gene *LMNA*.

Caso	Idade	Sexo	Início dos sintomas	Sintomas iniciais	Máxima habilidade motora	Peculiaridades clínicas / exames	CPK ¹ (<228U/L)	Biópsia muscular
5	6 a ²	M ³	1 a 4 m ⁴	Quedas frequentes desde aquisição da marcha	Andou 1a4m	Hiperlordose lombar, espinha rígida, hiperelasticidade nos cotovelos, ENMG ⁵ miopática	114	Atrofia fibras tipo 1
6	4 a	M	Período neonatal	Desconforto respiratório e fraqueza cervical intensa	Senta sem apoio quando colocado desde 3a6m	Insuficiência respiratória ao nascimento, traqueostomia até os 2 anos, assim como dieta por sonda até 1a3m, ENMG miopática	35	Distrófica leve
7	6 a	M	6 m	Perdeu sustento cefálico que havia adquirido aos 2 meses	Senta sem apoio quando colocado	Hiperelasticidade distal MMSS	64	Distrófica leve
8	9 a	F ⁶	8 m	Involução motora	Senta sem apoio quando colocada	Hiperelasticidade distal MMSS, retração fibrotendínea no esternocleidomastoideo, hiperlordose lombar, em uso de BIPAP há 2 anos	108	Distrófica moderada
9	7 a	F	Período neonatal	Hipotonia desde o nascimento, prematura e anóxia perinatal, com atraso motor	Senta sem apoio quando colocada	Hiperlordose lombar e escoliose torácica	165	Distrófica leve
10	2 a	F	1 a 3 m	Quedas frequentes após aquisição da marcha e fraqueza cervical intensa	Deambula com queda cervical	Hiperelasticidade global e hiperlordose lombar	381	Distrófica leve
11	5 a	M	4 m	Atraso motor – sustento cefálico aos 6m e sentou sem apoio aos 3a6m	Senta sem apoio quando colocado	Hipotrofia intensa em cintura escapular, paresia facial e hiperelasticidade distal nos MMSS	76	Distrófica leve
12	10 a	M	6 m	Involução motora	Senta sem apoio quando colocado	Distúrbio ventilatório restritivo grave desde os 7a, sem escoliose	284	Distrófica moderada
13	18 a	M	2 a	Fraqueza proximal, dificuldade para levantar-se e subir degraus	Deambula com queda cervical	Hiperelasticidade global, ENMG miopática	148	Distrófica leve

¹ Creatina quinase² Anos³ Masculino⁴ Meses⁵ Eletroneuromiografia⁶ Feminino

Figura 11 – Caracterização fenotípica dos pacientes com DMC, sem identificação de mutação no gene *LMNA*. Observa-se proeminente fraqueza cervical, da esquerda para a direita, casos 5, 8, 9 e 10.

Figura 12 - Aspectos da biópsia muscular dos pacientes com DMC sem deficiência proteica identificada e sem mutação no gene *LMNA*. **A)** caso 5: atrofia de fibras tipo 1I (NADH, 60 x). **B)** caso 6: aspecto distrófico leve, com discreta variabilidade no tamanho das fibras e aumento do tecido conjuntivo perimisial (H&E, 20 x). **C)** caso 9: Aspecto distrófico leve com discreta desorganização da arquitetura interna (NADH, 60 x). **D)** e **E)** caso 10: Presença de infiltrado inflamatório e predomínio de atrofia nas fibras tipo I (H&E, 140 x e NADH, 40 x). **F)** caso 12: grande variabilidade no tamanho das fibras musculares e aumento do tecido conjuntivo endomisial e perimisial, caracterizando um aspecto distrófico moderado (H&E, 60 x)

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Descrevemos neste estudo quatro crianças com fenótipo clínico de um dos subtipos de DMC, caracterizado por fraqueza muscular generalizada com predomínio cervical, em associação a mutações no gene *LMNA*. Uma delas teve marcos adequados do desenvolvimento motor nos primeiros meses de vida e, posteriormente, desenvolveu fraqueza cervical e nos membros, perdendo a habilidade para deambular aos seis anos de idade. As outras três apresentaram comprometimento motor mais grave desde o início do quadro, variando de incapacidade para deambulação até atraso na aquisição da marcha. O paciente que adquiriu a marcha independente aos dois anos de idade, já apresentava na época a postura característica de queda da cabeça, com piora progressiva da fraqueza muscular. Portanto, a apresentação clínica destas crianças corrobora o dado de que pacientes com mutação no gene *LMNA* podem desenvolver diferentes graus de comprometimento motor e gravidade variável mesmo em indivíduos com a mesma mutação^{62, 127, 143, 145, 158}. Pacientes com DMC por deficiência de lamina A/C desenvolvem precocemente o sinal da cabeça caída, sendo este o dado clínico mais consistente juntamente com a fraqueza muscular de predomínio axial, que também observamos em nossos casos^{62, 127, 143, 145, 158}.

Os pacientes com DMC por deficiência de lamina A/C descritos inicialmente por Quijano Roy et al, em 2008, apresentavam fraqueza com predomínio nas porções proximais dos membros superiores e porções distais dos membros inferiores⁶¹. Este padrão de fraqueza muscular não foi observado nos nossos pacientes, nos quais a fraqueza mostrava uma distribuição mais global. Além disso, observamos retrações fibrotendíneas em articulações proximais e distais, diferentes das descritas naquele grupo inicial, em que distais eram nitidamente mais frequentes. Inicialmente, raros casos apresentavam hiperelasticidade nos cotovelos⁶¹. Um dos nossos pacientes apresentava hiperextensibilidade distal.

Todos os nossos pacientes desenvolveram insuficiência ventilatória restritiva e necessitaram de ventilação não invasiva com pressão positiva noturna. Um paciente necessitou de traqueostomia e suporte ventilatório aos seis anos de idade. Três pacientes desenvolveram distúrbio de deglutição e déficit pondero-estatural, sendo submetidos à gastrostomia precocemente para suporte alimentar. Estes resultados confirmam a gravidade da doença e o comprometimento de funções essenciais também enfatizados na literatura^{12, 142-145}.

Nos casos 1 e 4, ocorreu arritmia cardíaca caracterizada por extrassístoles sinusal e ventricular, respectivamente. Um terceiro paciente (caso 3) faleceu subitamente, o que supomos que tenha sido decorrente de defeitos do ritmo cardíaco. Da mesma maneira, aos seis anos de idade, outro paciente (caso 2) apresentou subitamente parada cardíaca, que foi revertida e, desde então, encontra-se em unidade de terapia intensiva, o que também nos pareceu ser decorrente de defeito do ritmo cardíaco. Assim, a nossa casuística reforça o dado da literatura de que a arritmia cardíaca súbita é a causa mais frequente de morte nesses pacientes e os defeitos de condução devem ser avaliados rigorosamente durante o acompanhamento^{61, 143}. O diagnóstico precoce é fundamental para possibilitar a investigação e o tratamento das complicações, particularmente considerando a incidência tão alta e fatal do comprometimento cardíaco.

Em todos os nossos casos, a biópsia muscular demonstrou um padrão distrófico variando de leve a grave, conforme também foi descrito em outros relatos da doença^{60, 117, 120, 122, 131}. Além do padrão distrófico, outros achados histológicos na biópsia muscular têm sido observados, tais como a predominância de fibras tipo 1, hipotrofia de fibra tipo 1, fibras atróficas e anguladas¹⁴². Um dos nossos casos (caso 3), associadamente ao padrão distrófico da biópsia muscular, apresentava comprometimento do nervo periférico, com eletroneuromiografia demonstrando padrão neurogênico. Casos de doença de Charcot-Marie-Tooth têm sido associados a mutações no gene *LMNA*, *CMT2B1*, indicando o envolvimento da lamina A/C na fisiologia do nervo

periférico¹⁵⁹. A neuropatia periférica associada a mutações no gene *LMNA* não se restringe a mutações específicas e até o momento não havia descrição de neuropatia associada à mutação p.N39S que foi detectada na nossa paciente. O reconhecimento da neuropatia periférica sobreposta em pacientes com fraqueza muscular de predomínio proximal é difícil, pois a atrofia distal nos membros pode não ser tão evidente. Os casos que apresentam neuropatia periférica subclínica podem manifestá-la em qualquer momento no decorrer da doença, comprometendo ainda mais suas habilidades motoras.

Em 2012, um primeiro paciente Asiático foi descrito¹⁴⁵. Curiosamente, ele apresentava alterações focais na substância branca, demonstradas pela ressonância magnética. O envolvimento do sistema nervoso central ainda não havia sido descrito nesta forma de DMC¹⁴⁵. Um de nossos pacientes (caso 3) apresentou coleção subdural benigna da infância, sem nenhum acometimento da substância branca, provavelmente sem nenhuma relação com a DMC.

Assim como observamos em nossos pacientes, o achado IHQ da lamina A/C normal provavelmente decorre do fato da alteração proteica ser apenas funcional, o que torna mais difícil o diagnóstico pelos achados da biópsia muscular^{104, 145, 158}. Em 2012, Menezes et al sugeriram que a análise da expressão proteica por *Western blotting* poderia demonstrar níveis reduzidos de lamina A/C, o que seria útil ao diagnóstico, no entanto, até o momento, esse achado não foi consistente¹⁴².

O estudo de ressonância de músculo em nosso paciente (caso 4) evidenciou substituição gordurosa e atrofia muscular extensas na maioria dos grupamentos musculares. Das características por imagem até então descritas como frequentes nesse grupo de doentes, podemos notar a relativa preservação da musculatura distal, tanto nos membros superiores quanto nos inferiores; e o predomínio de acometimento do músculo gastrocnêmio medial^{23, 150}. Outras características tidas como comuns, como a preservação dos músculos reto femural, sartório e grácil não foram observadas neste caso, o que acreditamos justificar-se pelo estado avançado da doença^{22, 23, 61}. No

entanto, devido ao pequeno número de pacientes descritos com DMC por deficiência de lamina A/C que dispõem de ressonância de músculo, ainda não é possível estabelecer um padrão de comprometimento muscular específico.

Todas as mutações identificadas foram previamente descritas em pacientes com quadro clínico desta forma de DMC^{61, 143, 144}. Anteriormente, essas mutações já haviam sido relacionadas à distrofia muscular de Emery-Dreifuss e à distrofia muscular tipo cinturas, nesta última mais raramente⁶⁵. Não há relatos dessas mutações causando outras formas de laminopatias que não afetem o músculo esquelético. Embora o número de casos publicados ainda seja pequeno, 37 no total, os exons 1, 4 e 6 correspondem a 48,65% dos casos descritos, podendo, portanto, serem os primeiros analisados^{61, 143, 144}.

Uma das mutações mais encontradas é a p.E358K com sete casos registrados até o momento, sendo que um é nosso paciente⁶¹. Em associação a esta mutação, o fenótipo costuma ser grave, variando entre nunca deambular até a perda da marcha após três a quatro anos de idade. Nosso paciente tinha apresentação clínica mais branda, com a manutenção da capacidade de andar até os seis anos de idade e a capacidade de ficar sentado até os nove anos de idade. Ele também representa o primeiro caso de mutação p.E358K associada com agregados intracitoplasmáticos na biópsia muscular. Estes agregados, embora escassos e pequenos, existiam inclusões sarcoplasmáticas eosinofílicas na biópsia muscular, com coloração violeta escura ao tricômico de Gomori modificado e ausência de marcação para desmina no estudo imunoistoquímico. Achados similares foram observados por Paradas et al, em 2010, porém em adultos: quatro casos esporádicos com fenótipos leves e diferentes mutações da lamina A/C, todos com os achados morfológicos característicos dos agregados¹⁶⁰. Possivelmente, os filamentos de desmina promovem uma ligação entre o citoesqueleto e a membrana nuclear e, com a perda do ancoramento dessa estrutura, pode ocorrer o acúmulo de proteínas miofibrilares no sarcolema. Existe uma ampla variação fenotípica em relação ao comprometimento cardíaco e respiratório associado à mutação, pois há casos com e sem essas afecções^{61, 142, 152, 161}.

A mutação p.R249W apresenta-se com um padrão clínico mais homogêneo^{61, 143}. Também parece ser bastante comum, com seis casos registrados até o momento¹⁴⁶. Todos os pacientes descritos apresentavam controle cervical ruim durante o primeiro ano de vida, praticamente sem aquisições motoras, conforme observado também em nosso caso^{61, 144}. Recentemente foram identificados dois pacientes com melhores habilidades motoras, que deambularam até os cinco e 12 anos de idade, sendo que este último faleceu aos 12 anos de idade e ainda deambulava^{152, 161}. Nesses pacientes chama a atenção a idade de desenvolvimento da arritmia cardíaca. Há dois casos descritos com identificação da complicação apenas aos 15 e 17 anos de idade, ambos com fraqueza muscular e atraso motor desde o primeiro ano de vida^{143, 161}. Até essa idade, a investigação cardiológica desses pacientes tinha sido normal, o que nos remete à necessidade de manter a averiguação anual das complicações cardiológicas, independentemente da idade dos pacientes. Outro dado relevante é que este paciente (caso 2) apresentava infiltrado inflamatório na biópsia muscular. Assim como já havia sido observado por Komaki et al, em 2011, a presença de miopatia inflamatória nos primeiros dois anos de vida pode ser sugestiva de mutação no gene *LMNA*. Naquela ocasião estudaram 20 pacientes com infiltrado inflamatório na biópsia muscular realizada precocemente e identificaram 11 mutações no gene *LMNA*, sendo que dois deles apresentavam essa mesma mutação, p.R249W, encontrada em nosso paciente¹⁶¹. Observamos também que, dentre os nossos casos, a criança com essa mutação foi a que realizou biópsia muscular mais precocemente, com a idade de 15 meses. Nas séries de casos de pacientes com DMC relacionada à deficiência de lamina A/C, há sempre a observação do infiltrado inflamatório linfomononuclear, associado com diferentes mutações^{61, 152, 161}. Entretanto, curiosamente, esses achados parecem ocorrer naqueles casos em que a biópsia foi realizada mais precocemente.

As três mutações descritas haviam sido sugeridas por Schamer et al, em 2011, como sendo predominantes nas formas com início precoce do acometimento muscular, mas também são associadas ao fenótipo de distrofia

muscular de Emery-Dreifuss, demonstrando que outros fatores desconhecidos contribuem para a manifestação e gravidade da doença¹⁵².

Existem ainda inúmeros outros casos em que a proteína ou o defeito genético permanecem sem identificação. Assim como ocorre com as distroglicanopatias, é possível que existam outros genes que atuem conjuntamente com o *LMNA* e ainda não foram identificados. Em alguns dos nossos casos sem mutação identificada, nos quais o fenótipo clínico é muito similar aos confirmados geneticamente, por exemplo, no caso 10, acreditamos que poderiam ainda tratar-se de mutações que afetem parte das regiões não codificadoras, que não foram identificadas no nosso sequenciamento.

Do ponto de vista clínico, os pacientes sem mutação identificada também apresentaram o início das manifestações nos primeiros dois anos de vida, com fraqueza axial proeminente, com queda da cabeça, variando a apresentação clínica entre atraso e involução motora. Também variaram na intensidade do comprometimento das habilidades motoras, sendo que apenas três alcançaram a deambulação. A cabeça caída decorrente da fraqueza da musculatura extensora cervical acarretou postura adaptativa de hiperlordose lombar em quatro desses pacientes, o que os tornava bastante semelhantes fenotipicamente aos pacientes com mutação no gene *LMNA*. Outro dado comum nesse grupo foi a hiperelasticidade articular, de localização distal nos casos 7, 8 e 11, nos cotovelos no caso 5 e difusa nos casos 10 e 13, também compatíveis com a doença em questão. Apenas três pacientes apresentaram distúrbio ventilatório restritivo, um apresentou distúrbio de deglutição que se resolveu na evolução, e em nenhum caso foi demonstrado comprometimento cardíaco, dado esse extremamente incomum nas séries de casos de DMC por deficiência de lamina A/C^{61, 142, 152} e que parece justificar o fato de não terem sido evidenciadas mutações nesses pacientes; provavelmente, trata-se de outra doença que cursa com fenótipo clínico de fraqueza da musculatura extensora cervical, acarretando o mesmo aspecto da cabeça caída e confundindo o diagnóstico. Outra característica incomum à deficiência de lamina A/C foi o nível normal de CPK, apresentado pela maioria dos pacientes

do grupo sem mutação identificada, exceto em dois em que estava elevada até 2 vezes o limite superior da normalidade, diferindo do grupo com a doença confirmada, que apresentou aumento entre 2 a 6 vezes. Muito possivelmente, nos próximos anos, com o aumento do acesso ao estudo molecular, outros genes serão descobertos, reduzindo de maneira considerável o número de casos sem diagnóstico. O diagnóstico exato propicia a compreensão da patogênese dos subtipos de DMC e, com isso, a identificação de potenciais alvos terapêuticos. Na prática clínica, o sinal da cabeça caída também é observado em outras doenças neuromusculares não distróficas, tais como algumas miopatias congênitas (minicore, nemalínica) e na síndrome mistênica congênita. Porém, essas situações não cabem dentro do diagnóstico diferencial dos nossos casos, que apresentavam como critério de inclusão o diagnóstico de DMC.

Em nossa casuística de doenças neuromusculares, uma das mutações encontradas, p.E358K, também foi verificada em um paciente com distrofia muscular de Emery-Dreifuss, que apresentava associadamente hipoplasia do terço médio da face, acúmulo de tecido gorduroso no pescoço e face; e baixa estatura¹³⁵. Inicialmente, acreditava-se que mutações afetando domínios funcionais distintos da proteína relacionavam-se a formas clínicas peculiares do comprometimento de um único tecido. No entanto, casos descritos com fenótipo sobreposto de acometimento muscular, lipodistróficos e ósseos colocaram em dúvida essa teoria, pois deve haver atuação de outros fatores, ainda desconhecidos^{65, 162}. Nos nossos casos, as mutações identificadas afetaram o domínio central da proteína, porém regiões funcionais diferentes (1A, 2A e 2B), e os pacientes desenvolveram manifestações clínicas exclusivamente neuromusculares. Nos pacientes descritos com DMC por deficiência de lamina A/C, assim como em nossos casos, nenhum apresentou características de lipodistrofia ou envelhecimento precoce; até o momento, não há associação desta forma de DMC com doença em outros tecidos.

A DMC associada a mutações no gene *LMNA* parece ser rara, embora a real incidência permaneça desconhecida. As laminopatias são, certamente,

subdiagnosticadas quando são utilizadas apenas as características clínicas, histopatológicas e IHQ. Apenas 37 casos foram descritos até o momento, possivelmente em decorrência da dificuldade na realização da análise molecular, visto que os testes genéticos não estão disponíveis em muitos centros de referência^{61, 142, 144, 145, 155}. A maior parte dos casos são provenientes da Europa, EUA e Japão. Uma série Australiana que durante oito anos buscou quadros clínicos sugestivos para a realização do sequenciamento do gene *LMNA*, identificou apenas cinco casos com a apresentação clínica de DMC, sendo mais um dado a favor da raridade da doença¹⁴². De maneira semelhante, uma série americana que analisou 255 pacientes com diversos fenótipos clínicos encaminhados para análise molecular do gene *LMNA*, identificou mutações em 23,9% dos casos¹⁵². Embora considerando apenas a forma congênita com o sinal da cabeça caída, identificamos mutações em 30,7% dos nossos casos, o que também contribuiu para demonstrar a distribuição universal da doença.

Na última década, tem ocorrido um grande interesse pelas funções do envelope nuclear em decorrência da descoberta de cerca de 15 doenças humanas associadas a mutações em proteínas do envelope nuclear. Desde 1993 era sabido que o gene *LMNA* codificava a lamina A e, apenas em 1999, a mutação do gene foi associada à doença neuromuscular, com fenótipo clínico de distrofia muscular de Emery-Dreifuss^{63, 154}. O mecanismo fisiopatogênico pelo qual a deficiência da lamina A/C inicia a doença neuromuscular vem sendo muito estudado. Tem-se como bem estabelecido que defeitos da lamina A/C geram aumento da fragilidade nuclear e redução da elasticidade citoplasmática, rompendo a estrutura mecânica entre o complexo citoesqueleto-núcleo e a cromatina. Isso acarreta uma grande vulnerabilidade durante o estresse mecânico, especialmente nos tecidos expostos ao estiramento, como os músculos esquelético e cardíaco. As lamina nucleares também contribuem para a regulação da organização da cromatina através da ligação, principalmente, da heterocromatina inativa à periferia nuclear. O modo pelo qual todas essas interações iniciam o processo da doença ainda não é bem compreendido^{62, 127, 158}.

Diante dessas diferenças no comparativo entre os grupos estudados, embora exista uma ampla variabilidade genotípica nos pacientes com DMC por deficiência de lamina A/C e a relação genótipo-fenótipo ainda não seja possível, até mesmo pelo pequeno número de casos descritos, está evidente que esses pacientes demonstram com maior frequência, além do aspecto peculiar da cabeça caída, a CPK aumentada entre 2 a 6 vezes o limite superior da normalidade, complicações respiratórias, cardíacas e distúrbios de deglutição, conferindo uma certa homogeneidade que pode facilitar a suspeita clínica da doença. O fenótipo é peculiar mesmo na ausência de achados imunoistoquímicos característicos ou outros marcadores específicos.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Esta série de pacientes amplia os achados clínicos, histológicos e moleculares da DMC por deficiência de lamina A/C, além de reforçar o conceito da distribuição universal da doença.

Identificamos mutações no gene *LMNA* em 30,7% dos pacientes com fenótipo clínico de DMC por deficiência de lamina A/C.

Todos os casos com mutação no gene *LMNA* apresentaram sinal da cabeça caída, insuficiência ventilatória restritiva, acometimento cardíaco e biópsia muscular distrófica, variando de leve a grave.

É possível o encontro de agregados intracitoplasmáticos ao estudo histológico muscular dos pacientes com DMC por deficiência de lamina A/C.

A mutação p.N39S do gene *LMNA* está relacionada à associação de distrofia muscular e neuropatia periférica, assim como à hiperelasticidade distal.

A correlação genótipo-fenótipo permanece difícil, mas algumas mutações, como a p.R249W, parecem apresentar um padrão clínico mais homogêneo e grave.

No sequenciamento do gene *LMNA*, as mutações p.N39S, p.R249W e p.E358K são as mais frequentemente detectadas. Sendo assim, os exons 1, 4 e 6 devem ser os primeiros a serem analisados.

ANEXOS

ANEXO A

Aprovação da comissão de ética

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 12/05/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0251/10**, intitulado: "**ESTUDO CLÍNICO, HISTOLÓGICO E MOLECULAR DE CRIANÇAS COM DISTROFIA MUSCULAR CONGÊNITA POR DEFICIÊNCIA DE LAMINA A/C**" apresentado pelo Departamento de **NEUROLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Profa. Dra. Umbertina Conti Reed**

Pesquisador (a) Executante: **Livia Meirelles de Araujo Pasqualin**

CAPPesq, 12 de Maio de 2010

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

ANEXO B

Termo de consentimento livre e esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº

APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD

(.....).....

2. RESPONSÁVEL LEGAL

.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):

.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :

SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº

APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD

(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Estudo clínico, histológico e molecular de crianças com distrofia muscular congênita por deficiência de lamina A/C

PESQUISADOR: Umbertina Conti Reed

CARGO/FUNÇÃO: médica

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº CRM-SP: 17145

UNIDADE DO HCFMUSP: Neurologia

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO X

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : 48 meses

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

A fim de identificar qual o tipo distrofia muscular que seu filho (a) apresenta, além da biópsia muscular, a qual já foi realizada, é necessário analisar o DNA para estudo de genes causadores de diversas formas de distrofia muscular congênita. O exame do DNA, neste caso, visa o estudo do gene da lamina A/C, cuja deficiência causa uma das formas mais comuns de distrofia muscular. Para esse fim, iremos colher amostra de sangue por meio de punção de veia superficial visível na região do braço. A coleta será realizada no Laboratório Central do IC-HCFMUSP por profissional especializado. Este exame é feito com uso de agulha descartável e apresenta desconforto ou risco mínimo com retirada de no máximo 10 mL de sangue. O material será então enviado ao nosso laboratório para as análises.

Autorizo que o material colhido e não utilizado nesta pesquisa seja armazenado por tempo superior a 5 anos no Banco de DNA do Departamento de Neurologia para pesquisas futuras devidamente aprovadas pelo Conselho do Departamento de Neurologia e CAPPESQ da FMUSP, garantindo sempre que os dados de estudos futuros sejam confidenciais, sigilosos e privados e serão utilizados apenas para pesquisa.

Este estudo trará para seu filho (a) o benefício de conhecer com exatidão o tipo de distrofia que ele (a) apresenta para podermos tratar adequadamente e oferecer informações sobre a evolução da doença e o risco de repetição, caso desejem ter outros filhos.

Em qualquer etapa do estudo, o Sr (a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra Umbertina Conti Reed que pode ser encontrado no endereço *Av. Dr.Enéas de Carvalho Aguiar, 255, Cerqueira César, São Paulo, Prédio dos Ambulatórios, 6º andar*, telefone (11) 30696000, ramal 6341 e na sua sala 5131, quinto andar do Instituto Central, telefone (11) 30697878, das 7 às 16 horas de 2ª a 5ª feira, das 7 às 16 horas, e às 6ªs feiras, das 7 às 12 horas. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa ¹⁶³ – Rua

Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br.

É garantida a liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

As informações obtidas serão analisadas pelos pesquisadores em conjunto com aquelas de todos os demais pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

O Sr (a) tem o direito de ser mantido (a) atualizado (a) sobre os resultados parciais e final da pesquisa que neste caso corresponde ao diagnóstico do tipo de distrofia muscular.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Estudo clínico, histológico e molecular de crianças com distrofia muscular congênita por deficiência de lamina A/C”.

Eu discuti com o Dra Umbertina Conti Reed sobre a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal*

Data ____/____/____

Assinatura da testemunha,

Data ____/____/____

(* para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual).

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Voit T. Congenital muscular dystrophies: 1997 update. *Brain Dev.* 1998; 20: 65-74.
2. Mercuri E and Longman C. Congenital muscular dystrophy. *Pediatr Ann.* 2005; 34: 560-2, 4-8.
3. Tome FM. The Peter Emil Becker Award lecture 1998. The saga of congenital muscular dystrophy. *Neuropediatrics.* 1999; 30: 55-65.
4. Dubowitz V SC. *Muscle biopsy: a practical approach*. Edition 3 ed. Philadelphia: Elsevier, 2006.
5. Muntoni F and Voit T. 133rd ENMC International Workshop on Congenital Muscular Dystrophy (IXth International CMD Workshop) 21-23 January 2005, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord.* 2005; 15: 794-801.
6. Reed UC. Congenital muscular dystrophy. Part I: a review of phenotypical and diagnostic aspects. *Arq Neuropsiquiatr.* 2009; 67: 144-68.
7. Bonnemann CG, McNally EM and Kunkel LM. Beyond dystrophin: current progress in the muscular dystrophies. *Curr Opin Pediatr.* 1996; 8: 569-82.
8. Klein A, Clement E, Mercuri E and Muntoni F. Differential diagnosis of congenital muscular dystrophies. *Eur J Paediatr Neurol.* 2008; 12: 371-7.
9. Darin N, Kimber E, Kroksmark AK and Tulinius M. Multiple congenital contractures: birth prevalence, etiology, and outcome. *J Pediatr.* 2002; 140: 61-7.

10. Muntoni F and Voit T. The congenital muscular dystrophies in 2004: a century of exciting progress. *Neuromuscul Disord.* 2004; 14: 635-49.
11. Bonnemann CG, Rutkowski A, Mercuri E and Muntoni F. 173rd ENMC International Workshop: congenital muscular dystrophy outcome measures 5-7 March 2010, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord.* 2011; 21: 513-22.
12. Philpot J, Bagnall A, King C, Dubowitz V and Muntoni F. Feeding problems in merosin deficient congenital muscular dystrophy. *Arch Dis Child.* 1999; 80: 542-7.
13. Dohna-Schwake C, Ragette R, Mellies U, Straub V, Teschler H and Voit T. Respiratory function in congenital muscular dystrophy and limb girdle muscular dystrophy 2l. *Neurology.* 2004; 62: 513-4.
14. Mellies U, Dohna-Schwake C and Voit T. Respiratory function assessment and intervention in neuromuscular disorders. *Curr Opin Neurol.* 2005; 18: 543-7.
15. Ramelli GP, Aloysius A, King C, Davis T and Muntoni F. Gastrostomy placement in paediatric patients with neuromuscular disorders: indications and outcome. *Dev Med Child Neurol.* 2007; 49: 367-71.
16. Leite CC, Lucato LT, Martin MG, Ferreira LG, Resende MB, Carvalho MS, Marie SK, Jenkins JR and Reed UC. Merosin-deficient congenital muscular dystrophy (CMD): a study of 25 Brazilian patients using MRI. *Pediatr Radiol.* 2005; 35: 572-9.
17. Leite CC, Reed UC, Otaduy MC, Lacerda MT, Costa MO, Ferreira LG, Carvalho MS, Resende MB, Marie SK and Cerri GG. Congenital muscular

dystrophy with merosin deficiency: 1H MR spectroscopy and diffusion-weighted MR imaging. *Radiology*. 2005; 235: 190-6.

18. Reed UC, Marie SK, Vainzof M, Salum PB, Levy JA, Zatz M and Diament A. Congenital muscular dystrophy with cerebral white matter hypodensity. Correlation of clinical features and merosin deficiency. *Brain Dev*. 1996; 18: 53-8.

19. Werneck LC, Scola RH and Iwamoto FM. [Congenital muscular dystrophy and merosin deficiency]. *Arq Neuropsiquiatr*. 1997; 55: 780-7.

20. Lampe AK and Bushby KM. Collagen VI related muscle disorders. *J Med Genet*. 2005; 42: 673-85.

21. Allamand V, Sunada Y, Salih MA, Straub V, Ozo CO, Al-Turaiki MH, Akbar M, Kolo T, Colognato H, Zhang X, Sorokin LM, Yurchenco PD, Tryggvason K and Campbell KP. Mild congenital muscular dystrophy in two patients with an internally deleted laminin alpha2-chain. *Hum Mol Genet*. 1997; 6: 747-52.

22. Mercuri E, Pichiecchio A, Allsop J, Messina S, Pane M and Muntoni F. Muscle MRI in inherited neuromuscular disorders: past, present, and future. *J Magn Reson Imaging*. 2007; 25: 433-40.

23. Quijano-Roy S, Avila-Smirnow D and Carlier RY. Whole body muscle MRI protocol: pattern recognition in early onset NM disorders. *Neuromuscul Disord*. 2012; 22 Suppl 2: S68-84.

24. Peters SA, Kohler C, Schara U, Hohendahl J, Vorgerd M, Nicolas V and Heyer CM. [Muscular magnetic resonance imaging for evaluation of myopathies in children]. *Klin Padiatr*. 2008; 220: 37-46.

25. CG B. *Congenital muscular dystrophy*. Oxford Academic Press ed.: Oxford, 2009, p.67-74.
26. Batten F. Three cases of myopathy, infantile type. *Brain*. 1903: 147-8.
27. Batten F. Case of myositis fibrosa with pathological examination. . *Trans Clin Soc Lond*. 1904: 12-22.
28. Howard R. A Case of Congenital Defect of the Muscular System (Dystrophia muscularis congenita) and its Association with Congenital Talipes equino-varus. *Proc R Soc Med*. 1908; 1: 157-66.
29. Voit T TF. *The congenital muscular dystrophies*. 3 ed. New York: McGraw-Hill-Medical Publishing Division, 2004, p.1960.
30. Ullrich O. Kongenitale atonisch-sklerotische Muskeldystrophie, ein weiterer Typus der heredodegeneration Erkrankungen des nueromuskularen Systems. *Z Ges Neurol Psychiat*. 1930: 171-201.
31. Fukuyama Y KM, Haruna H. A peculiar form of congenital progressive muscular dystrophy: report of fifteen cases. *Paediat Univ Tokyo*. 1960: 5-8.
32. Dubowitz V. Rigid spine syndrome: a muscle syndrome in search of a name. *Proc R Soc Med*. 1973; 66: 219-20.
33. Santavuori P LJ, Kruus S. Muscle, eye and brain disease (MEB): a new syndrome. *Neuropadiatrie*. 1977; 8 (Suppl): 553-8.
34. Dobyns WB PR, Armstrong D, et al. New diagnostic criteria for Walker-Warburg syndrome. *Am J Hum Genet*. 1986; 39: A59.
35. Dubowitz V. 22nd ENMC sponsored workshop on congenital muscular dystrophy held in Baarn, The Netherlands, 14-16 May 1993. *Neuromuscul Disord*. 1994; 4: 75-81.

36. Kanagawa M SF, Kunz S, et al. Congenital muscular dystrophy of a non-Fukuyama type with white matter hyperlucency on CT scan. *Brain Dev.* 1992; 420-2.
37. Tome FM, Evangelista T, Leclerc A, Sunada Y, Manole E, Estournet B, Barois A, Campbell KP and Fardeau M. Congenital muscular dystrophy with merosin deficiency. *C R Acad Sci III.* 1994; 317: 351-7.
38. Helbling-Leclerc A, Zhang X, Topaloglu H, Cruaud C, Tesson F, Weissenbach J, Tome FM, Schwartz K, Fardeau M, Tryggvason K and et al. Mutations in the laminin alpha 2-chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Nat Genet.* 1995; 11: 216-8.
39. Toda T, Segawa M, Nomura Y, Nonaka I, Masuda K, Ishihara T, Sakai M, Tomita I, Origuchi Y, Suzuki M and et al. Localization of a gene for Fukuyama type congenital muscular dystrophy to chromosome 9q31-33. *Nat Genet.* 1993; 5: 283-6.
40. Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, Matsumura K, Kondo-Iida E, Nomura Y, Segawa M, Yoshioka M, Saito K, Osawa M, Hamano K, Sakakihara Y, Nonaka I, Nakagome Y, Kanazawa I, Nakamura Y, Tokunaga K and Toda T. An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature.* 1998; 394: 388-92.
41. Moghadaszadeh B, Desguerre I, Topaloglu H, Muntoni F, Pavsek S, Sewry C, Mayer M, Fardeau M, Tome FM and Guicheney P. Identification of a new locus for a peculiar form of congenital muscular dystrophy with early rigidity of the spine, on chromosome 1p35-36. *Am J Hum Genet.* 1998; 62: 1439-45.
42. Muntoni F, Taylor J, Sewry CA, Naom I and Dubowitz V. An early onset muscular dystrophy with diaphragmatic involvement, early respiratory failure

and secondary alpha2 laminin deficiency unlinked to the LAMA2 locus on 6q22.

Eur J Paediatr Neurol. 1998; 2: 19-26.

43. Hayashi YK, Chou FL, Engvall E, Ogawa M, Matsuda C, Hirabayashi S, Yokochi K, Ziober BL, Kramer RH, Kaufman SJ, Ozawa E, Goto Y, Nonaka I, Tsukahara T, Wang JZ, Hoffman EP and Arahata K. Mutations in the integrin alpha7 gene cause congenital myopathy. *Nat Genet.* 1998; 19: 94-7.

44. Cormand B, Avela K, Pihko H, Santavuori P, Talim B, Topaloglu H, de la Chapelle A and Lehesjoki AE. Assignment of the muscle-eye-brain disease gene to 1p32-p34 by linkage analysis and homozygosity mapping. *Am J Hum Genet.* 1999; 64: 126-35.

45. Brockington M, Sewry CA, Herrmann R, Naom I, Dearlove A, Rhodes M, Topaloglu H, Dubowitz V, Voit T and Muntoni F. Assignment of a form of congenital muscular dystrophy with secondary merosin deficiency to chromosome 1q42. *Am J Hum Genet.* 2000; 66: 428-35.

46. Moghadaszadeh B, Petit N, Jaillard C, Brockington M, Roy SQ, Merlini L, Romero N, Estournet B, Desguerre I, Chaigne D, Muntoni F, Topaloglu H and Guicheney P. Mutations in SEPN1 cause congenital muscular dystrophy with spinal rigidity and restrictive respiratory syndrome. *Nat Genet.* 2001; 29: 17-8.

47. Camacho Vanegas O, Bertini E, Zhang RZ, Petrini S, Minosse C, Sabatelli P, Giusti B, Chu ML and Pepe G. Ullrich scleroatonic muscular dystrophy is caused by recessive mutations in collagen type VI. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98: 7516-21.

48. Demir E, Sabatelli P, Allamand V, Ferreiro A, Moghadaszadeh B, Makrelouf M, Topaloglu H, Echenne B, Merlini L and Guicheney P. Mutations in

COL6A3 cause severe and mild phenotypes of Ullrich congenital muscular dystrophy. *Am J Hum Genet.* 2002; 70: 1446-58.

49. Pan TC, Zhang RZ, Sudano DG, Marie SK, Bonnemann CG and Chu ML. New molecular mechanism for Ullrich congenital muscular dystrophy: a heterozygous in-frame deletion in the COL6A1 gene causes a severe phenotype. *Am J Hum Genet.* 2003; 73: 355-69.

50. Brockington M, Blake DJ, Prandini P, Brown SC, Torelli S, Benson MA, Ponting CP, Estournet B, Romero NB, Mercuri E, Voit T, Sewry CA, Guicheney P and Muntoni F. Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) cause a form of congenital muscular dystrophy with secondary laminin alpha2 deficiency and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Am J Hum Genet.* 2001; 69: 1198-209.

51. Hayashi YK, Ogawa M, Tagawa K, Noguchi S, Ishihara T, Nonaka I and Arahata K. Selective deficiency of alpha-dystroglycan in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Neurology.* 2001; 57: 115-21.

52. Yoshida A, Kobayashi K, Manya H, Taniguchi K, Kano H, Mizuno M, Inazu T, Mitsuhashi H, Takahashi S, Takeuchi M, Herrmann R, Straub V, Talim B, Voit T, Topaloglu H, Toda T and Endo T. Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell.* 2001; 1: 717-24.

53. Muntoni F, Brockington M, Blake DJ, Torelli S and Brown SC. Defective glycosylation in muscular dystrophy. *Lancet.* 2002; 360: 1419-21.

54. Beltran-Valero de Bernabe D, Currier S, Steinbrecher A, Celli J, van Beusekom E, van der Zwaag B, Kayserili H, Merlini L, Chitayat D, Dobyns WB, Cormand B, Lehesjoki AE, Cruces J, Voit T, Walsh CA, van Bokhoven H and

Brunner HG. Mutations in the O-mannosyltransferase gene POMT1 give rise to the severe neuronal migration disorder Walker-Warburg syndrome. *Am J Hum Genet.* 2002; 71: 1033-43.

55. Longman C, Brockington M, Torelli S, Jimenez-Mallebrera C, Kennedy C, Khalil N, Feng L, Saran RK, Voit T, Merlini L, Sewry CA, Brown SC and Muntoni F. Mutations in the human LARGE gene cause MDC1D, a novel form of congenital muscular dystrophy with severe mental retardation and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Hum Mol Genet.* 2003; 12: 2853-61.

56. van Reeuwijk J, Janssen M, van den Elzen C, Beltran-Valero de Bernabe D, Sabatelli P, Merlini L, Boon M, Scheffer H, Brockington M, Muntoni F, Huynen MA, Verrips A, Walsh CA, Barth PG, Brunner HG and van Bokhoven H. POMT2 mutations cause alpha-dystroglycan hypoglycosylation and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet.* 2005; 42: 907-12.

57. Dubowitz V. 68th ENMC international workshop (5th international workshop): On congenital muscular dystrophy, 9-11 April 1999, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord.* 1999; 9: 446-54.

58. Muntoni F and Guicheney P. 85th ENMC International Workshop on Congenital Muscular Dystrophy. 6th International CMD Workshop. 1st Workshop of the Myo-Cluster Project 'GENRE'. 27-28th October 2000, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord.* 2002; 12: 69-78.

59. Muntoni F, Bertini E, Bonnemann C, Brockington M, Brown S, Bushby K, Fiszman M, Korner C, Mercuri E, Merlini L, Hewitt J, Quijano-Roy S, Romero N, Squarzoni S, Sewry CA, Straub V, Topaloglu H, Haliloglu G, Voit T, Wewer U and Guicheney P. 98th ENMC International Workshop on Congenital Muscular Dystrophy (CMD), 7th Workshop of the International Consortium on CMD, 2nd

Workshop of the MYO CLUSTER project GENRE. 26-28th October, 2001, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord.* 2002; 12: 889-96.

60. Muntoni F, Valero de Bernabe B, Bittner R, Blake D, van Bokhoven H, Brockington M, Brown S, Bushby K, Campbell KP, Fiszman M, Gruenewald S, Merlini L, Quijano-Roy S, Romero N, Sabatelli P, Sewry CA, Straub V, Talim B, Topaloglu H, Voit T, Yurchenco PD, Urtizberea JA, Wewer UM and Guicheney P. 114th ENMC International Workshop on Congenital Muscular Dystrophy (CMD) 17-19 January 2003, Naarden, The Netherlands: (8th Workshop of the International Consortium on CMD; 3rd Workshop of the MYO-CLUSTER project GENRE). *Neuromuscul Disord.* 2003; 13: 579-88.

61. Quijano-Roy S, Mbieleu B, Bonnemann CG, Jeannet PY, Colomer J, Clarke NF, Cuisset JM, Roper H, De Meirleir L, D'Amico A, Ben Yaou R, Nascimento A, Barois A, Demay L, Bertini E, Ferreira A, Sewry CA, Romero NB, Ryan M, Muntoni F, Guicheney P, Richard P, Bonne G and Estournet B. De novo LMNA mutations cause a new form of congenital muscular dystrophy. *Ann Neurol.* 2008; 64: 177-86.

62. Muchir A and Worman HJ. The nuclear envelope and human disease. *Physiology (Bethesda).* 2004; 19: 309-14.

63. Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S, Becane HM, Hammouda EH, Merlini L, Muntoni F, Greenberg CR, Gary F, Urtizberea JA, Duboc D, Fardeau M, Toniolo D and Schwartz K. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet.* 1999; 21: 285-8.

64. Ben Yaou R, Becane HM, Demay L, Laforet P, Hannequin D, Bohu PA, Drouin-Garraud V, Ferrer X, Mussini JM, Ollagnon E, Petiot P, Penisson-

- Besnier I, Streichenberger N, Toutain A, Richard P, Eymard B and Bonne G. [Autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy associated with conduction defects (LGMD1B): a description of 8 new families with the LMNA gene mutations]. *Rev Neurol (Paris)*. 2005; 161: 42-54.
65. Worman HJ and Bonne G. "Laminopathies": a wide spectrum of human diseases. *Exp Cell Res*. 2007; 313: 2121-33.
66. Peat RA, Smith JM, Compton AG, Baker NL, Pace RA, Burkin DJ, Kaufman SJ, Lamande SR and North KN. Diagnosis and etiology of congenital muscular dystrophy. *Neurology*. 2008; 71: 312-21.
67. Mercuri E, Messina S, Bruno C, Mora M, Pegoraro E, Comi GP, D'Amico A, Aiello C, Biancheri R, Berardinelli A, Boffi P, Cassandrini D, Laverda A, Moggio M, Morandi L, Moroni I, Pane M, Pezzani R, Pichiecchio A, Pini A, Minetti C, Mongini T, Mottarelli E, Ricci E, Ruggieri A, Saredi S, Scuderi C, Tessa A, Toscano A, Tortorella G, Trevisan CP, Uggetti C, Vasco G, Santorelli FM and Bertini E. Congenital muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan: a population study. *Neurology*. 2009; 72: 1802-9.
68. Norwood FL, Harling C, Chinnery PF, Eagle M, Bushby K and Straub V. Prevalence of genetic muscle disease in Northern England: in-depth analysis of a muscle clinic population. *Brain*. 2009; 132: 3175-86.
69. Mostacciolo ML, Miorin M, Martinello F, Angelini C, Perini P and Trevisan CP. Genetic epidemiology of congenital muscular dystrophy in a sample from north-east Italy. *Hum Genet*. 1996; 97: 277-9.
70. Darin N and Tulinius M. Neuromuscular disorders in childhood: a descriptive epidemiological study from western Sweden. *Neuromuscul Disord*. 2000; 10: 1-9.

-
71. Okada M, Kawahara G, Noguchi S, Sugie K, Murayama K, Nonaka I, Hayashi YK and Nishino I. Primary collagen VI deficiency is the second most common congenital muscular dystrophy in Japan. *Neurology*. 2007; 69: 1035-42.
72. Ferreira LG, Marie SK, Liu EC, Resende MB, Carvalho MS, Scaff M and Reed UC. Dystrophin-glycoproteins associated in congenital muscular dystrophy: immunohistochemical analysis of 59 Brazilian cases. *Arq Neuropsiquiatr*. 2005; 63: 791-800.
73. Clement EM, Feng L, Mein R, Sewry CA, Robb SA, Manzur AY, Mercuri E, Godfrey C, Cullup T, Abbs S and Muntoni F. Relative frequency of congenital muscular dystrophy subtypes: analysis of the UK diagnostic service 2001-2008. *Neuromuscul Disord*. 2012; 22: 522-7.
74. Mercuri E and Muntoni F. The ever-expanding spectrum of congenital muscular dystrophies. *Ann Neurol*. 2012; 72: 9-17.
75. Barone R, Aiello C, Race V, Morava E, Foulquier F, Riemersma M, Passarelli C, Concolino D, Carella M, Santorelli F, Vleugels W, Mercuri E, Garozzo D, Sturiale L, Messina S, Jaeken J, Fiumara A, Wevers RA, Bertini E, Matthijs G and Lefeber DJ. DPM2-CDG: a muscular dystrophy-dystroglycanopathy syndrome with severe epilepsy. *Ann Neurol*. 2012; 72: 550-8.
76. Shalaby S, Hayashi YK, Goto K, Ogawa M, Nonaka I, Noguchi S and Nishino I. Rigid spine syndrome caused by a novel mutation in four-and-a-half LIM domain 1 gene (FHL1). *Neuromuscul Disord*. 2008; 18: 959-61.
77. Roscioli T, Kamsteeg EJ, Buysse K, Maystadt I, van Reeuwijk J, van den Elzen C, van Beusekom E, Riemersma M, Pfundt R, Vissers LE, Schraders M,

Altunoglu U, Buckley MF, Brunner HG, Grisart B, Zhou H, Veltman JA, Gilissen C, Mancini GM, Delree P, Willemsen MA, Ramadza DP, Chitayat D, Bennett C, Sheridan E, Peeters EA, Tan-Sindhunata GM, de Die-Smulders CE, Devriendt K, Kayserili H, El-Hashash OA, Stemple DL, Lefeber DJ, Lin YY and van Bokhoven H. Mutations in ISPD cause Walker-Warburg syndrome and defective glycosylation of alpha-dystroglycan. *Nat Genet.* 2012; 44: 581-5.

78. Manzini MC, Tambunan DE, Hill RS, Yu TW, Maynard TM, Heinzen EL, Shianna KV, Stevens CR, Partlow JN, Barry BJ, Rodriguez J, Gupta VA, Al-Qudah AK, Eyaid WM, Friedman JM, Salih MA, Clark R, Moroni I, Mora M, Beggs AH, Gabriel SB and Walsh CA. Exome sequencing and functional validation in zebrafish identify GTDC2 mutations as a cause of Walker-Warburg syndrome. *Am J Hum Genet.* 2012; 91: 541-7.

79. Tetreault M, Duquette A, Thiffault I, Bherer C, Jarry J, Loisel L, Banwell B, D'Anjou G, Mathieu J, Robitaille Y, Vanasse M and Brais B. A new form of congenital muscular dystrophy with joint hyperlaxity maps to 3p23-21. *Brain.* 2006; 129: 2077-84.

80. Voit T, Parano E, Straub V, Schroder JM, Schaper J, Pavone P, Falsaperla R, Pavone L and Herrmann R. Congenital muscular dystrophy with adducted thumbs, ptosis, external ophthalmoplegia, mental retardation and cerebellar hypoplasia: a novel form of CMD. *Neuromuscul Disord.* 2002; 12: 623-30.

81. Susman RD, Quijano-Roy S, Yang N, Webster R, Clarke NF, Dowling J, Kennerson M, Nicholson G, Biancalana V, Ilkovski B, Flanigan KM, Arbuckle S, Malladi C, Robinson P, Vucic S, Mayer M, Romero NB, Urtizberea JA, Garcia-Bragado F, Guicheney P, Bitoun M, Carlier RY and North KN. Expanding the

clinical, pathological and MRI phenotype of DNM2-related centronuclear myopathy. *Neuromuscul Disord.* 2010; 20: 229-37.

82. Ferreiro A, Mezmezian M, Olive M, Herlicoviez D, Fardeau M, Richard P and Romero NB. Telethonin-deficiency initially presenting as a congenital muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 2011; 21: 433-8.

83. Mitsuhashi S, Ohkuma A, Talim B, Karahashi M, Koumura T, Aoyama C, Kurihara M, Quinlivan R, Sewry C, Mitsuhashi H, Goto K, Koksal B, Kale G, Ikeda K, Taguchi R, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Sher RB, Sugimoto H, Nakagawa Y, Cox GA, Topaloglu H and Nishino I. A congenital muscular dystrophy with mitochondrial structural abnormalities caused by defective de novo phosphatidylcholine biosynthesis. *Am J Hum Genet.* 2011; 88: 845-51.

84. Campbell KP and Stull JT. Skeletal muscle basement membrane-sarcolemma-cytoskeleton interaction minireview series. *J Biol Chem.* 2003; 278: 12599-600.

85. Michele DE and Campbell KP. Dystrophin-glycoprotein complex: post-translational processing and dystroglycan function. *J Biol Chem.* 2003; 278: 15457-60.

86. Reed UC. Congenital muscular dystrophy. Part II: a review of pathogenesis and therapeutic perspectives. *Arq Neuropsiquiatr.* 2009; 67: 343-62.

87. McKeon FD, Kirschner MW and Caput D. Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature.* 1986; 319: 463-8.

88. Villanova M, Malandrini A, Sabatelli P, Sewry CA, Toti P, Torelli S, Six J, Scarfo G, Palma L, Muntoni F, Squarzoni S, Tosi P, Maraldi NM and Guazzi

- GC. Localization of laminin alpha 2 chain in normal human central nervous system: an immunofluorescence and ultrastructural study. *Acta Neuropathol.* 1997; 94: 567-71.
89. van der Knaap MS, Smit LM, Barth PG, Catsman-Berrevoets CE, Brouwer OF, Begeer JH, de Coe IF and Valk J. Magnetic resonance imaging in classification of congenital muscular dystrophies with brain abnormalities. *Ann Neurol.* 1997; 42: 50-9.
90. Vigliano P, Dassi P, Di Blasi C, Mora M and Jarre L. LAMA2 stop-codon mutation: merosin-deficient congenital muscular dystrophy with occipital polymicrogyria, epilepsy and psychomotor regression. *Eur J Paediatr Neurol.* 2009; 13: 72-6.
91. Guicheney P, Vignier N, Helbling-Leclerc A, Nissinen M, Zhang X, Cruaud C, Lambert JC, Richelme C, Topaloglu H, Merlini L, Barois A, Schwartz K, Tome FM, Tryggvason K and Fardeau M. Genetics of laminin alpha 2 chain (or merosin) deficient congenital muscular dystrophy: from identification of mutations to prenatal diagnosis. *Neuromuscul Disord.* 1997; 7: 180-6.
92. Mercuri E, Yuva Y, Brown SC, Brockington M, Kinali M, Jungbluth H, Feng L, Sewry CA and Muntoni F. Collagen VI involvement in Ullrich syndrome: a clinical, genetic, and immunohistochemical study. *Neurology.* 2002; 58: 1354-9.
93. Reed UC, Ferreira LG, Liu EC, Resende MB, Carvalho MS, Marie SK and Scaff M. Ullrich congenital muscular dystrophy and Bethlem myopathy: clinical and genetic heterogeneity. *Arq Neuropsiquiatr.* 2005; 63: 785-90.

94. Hicks D, Lampe AK, Barresi R, Charlton R, Fiorillo C, Bonnemann CG, Hudson J, Sutton R, Lochmuller H, Straub V and Bushby K. A refined diagnostic algorithm for Bethlem myopathy. *Neurology*. 2008; 70: 1192-9.
95. Pepe G, Bertini E, Bonaldo P, Bushby K, Giusti B, de Visser M, Guicheney P, Lattanzi G, Merlini L, Muntoni F, Nishino I, Nonaka I, Yaou RB, Sabatelli P, Sewry C, Topaloglu H and van der Kooi A. Bethlem myopathy (BETHLEM) and Ullrich scleroatonic muscular dystrophy: 100th ENMC international workshop, 23-24 November 2001, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord*. 2002; 12: 984-93.
96. Allamand V, Merlini L and Bushby K. 166th ENMC International Workshop on Collagen type VI-related Myopathies, 22-24 May 2009, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord*. 2010; 20: 346-54.
97. Michele DE, Barresi R, Kanagawa M, Saito F, Cohn RD, Satz JS, Dollar J, Nishino I, Kelley RI, Somer H, Straub V, Mathews KD, Moore SA and Campbell KP. Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature*. 2002; 418: 417-22.
98. Diesen C, Saarinen A, Pihko H, Rosenlew C, Cormand B, Dobyns WB, Dieguez J, Valanne L, Joensuu T and Lehesjoki AE. POMGnT1 mutation and phenotypic spectrum in muscle-eye-brain disease. *J Med Genet*. 2004; 41: e115.
99. Mercuri E, Topaloglu H, Brockington M, Berardinelli A, Pichiecchio A, Santorelli F, Rutherford M, Talim B, Ricci E, Voit T and Muntoni F. Spectrum of brain changes in patients with congenital muscular dystrophy and FKRP gene mutations. *Arch Neurol*. 2006; 63: 251-7.

100. Louhichi N, Triki C, Quijano-Roy S, Richard P, Makri S, Meziou M, Estournet B, Mrad S, Romero NB, Ayadi H, Guicheney P and Fakhfakh F. New FKRP mutations causing congenital muscular dystrophy associated with mental retardation and central nervous system abnormalities. Identification of a founder mutation in Tunisian families. *Neurogenetics*. 2004; 5: 27-34.
101. Topaloglu H, Brockington M, Yuva Y, Talim B, Haliloglu G, Blake D, Torelli S, Brown SC and Muntoni F. FKRP gene mutations cause congenital muscular dystrophy, mental retardation, and cerebellar cysts. *Neurology*. 2003; 60: 988-92.
102. Brockington M, Yuva Y, Prandini P, Brown SC, Torelli S, Benson MA, Herrmann R, Anderson LV, Bashir R, Burgunder JM, Fallet S, Romero N, Fardeau M, Straub V, Storey G, Pollitt C, Richard I, Sewry CA, Bushby K, Voit T, Blake DJ and Muntoni F. Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Hum Mol Genet*. 2001; 10: 2851-9.
103. Brown SC, Torelli S, Brockington M, Yuva Y, Jimenez C, Feng L, Anderson L, Ugo I, Kroger S, Bushby K, Voit T, Sewry C and Muntoni F. Abnormalities in alpha-dystroglycan expression in MDC1C and LGMD2I muscular dystrophies. *Am J Pathol*. 2004; 164: 727-37.
104. Fukuyama Y. Congenital muscular dystrophies: an update. *J Child Neurol*. 1999; 14: 28-30.
105. Toda T, Kobayashi K, Kondo-Iida E, Sasaki J and Nakamura Y. The Fukuyama congenital muscular dystrophy story. *Neuromuscul Disord*. 2000; 10: 153-9.

106. Toda T and Kobayashi K. Fukuyama-type congenital muscular dystrophy: the first human disease to be caused by an ancient retrotransposal integration. *J Mol Med (Berl)*. 1999; 77: 816-23.
107. Barkovich AJ. Neuroimaging manifestations and classification of congenital muscular dystrophies. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1998; 19: 1389-96.
108. Yoshioka M and Kuroki S. Clinical spectrum and genetic studies of Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Am J Med Genet*. 1994; 53: 245-50.
109. Kondo-Iida E, Kobayashi K, Watanabe M, Sasaki J, Kumagai T, Koide H, Saito K, Osawa M, Nakamura Y and Toda T. Novel mutations and genotype-phenotype relationships in 107 families with Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD). *Hum Mol Genet*. 1999; 8: 2303-9.
110. Zanolli E, Rocha JC, Narumia LK, Fireman MA, Moura LS, Oliveira AS, Gabbai AA, Fukuda Y, Kinoshita M and Toda T. Fukuyama-type congenital muscular dystrophy: a case report in the Japanese population living in Brazil. *Acta Neurol Scand*. 2002; 106: 117-21.
111. Santavuori P, Somer H, Sainio K, Rapola J, Kruus S, Nikitin T, Ketonen L and Leisti J. Muscle-eye-brain disease (MEB). *Brain Dev*. 1989; 11: 147-53.
112. Biancheri R, Bertini E, Falace A, Pedemonte M, Rossi A, D'Amico A, Scapolan S, Bergamino L, Petrini S, Cassandrini D, Broda P, Manfredi M, Zara F, Santorelli FM, Minetti C and Bruno C. POMGnT1 mutations in congenital muscular dystrophy: genotype-phenotype correlation and expanded clinical spectrum. *Arch Neurol*. 2006; 63: 1491-5.
113. Teber S, Sezer T, Kafali M, Manzini MC, Konuk Yuksel B, Tekin M, Fitoz S, Walsh CA and Deda G. Severe muscle-eye-brain disease is associated with

a homozygous mutation in the POMGnT1 gene. *Eur J Paediatr Neurol*. 2008; 12: 133-6.

114. Haltia M, Leivo I, Somer H, Pihko H, Paetau A, Kivela T, Tarkkanen A, Tome F, Engvall E and Santavuori P. Muscle-eye-brain disease: a neuropathological study. *Ann Neurol*. 1997; 41: 173-80.

115. Beltran-Valero de Bernabe D, Voit T, Longman C, Steinbrecher A, Straub V, Yuva Y, Herrmann R, Sperner J, Korenke C, Diesen C, Dobyns WB, Brunner HG, van Bokhoven H, Brockington M and Muntoni F. Mutations in the FKRP gene can cause muscle-eye-brain disease and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet*. 2004; 41: e61.

116. Walker A. Lissencephaly. *Arch Neurol Psychiatr*. 1942: 13-29.

117. Warburg M. Heterogeneity of congenital retinal nonattachment, falciform folds and retinal dysplasia: a guide to genetic counselling. *Hum Hered*. 1976: 137-48.

118. Muntoni F, Brockington M, Godfrey C, Ackroyd M, Robb S, Manzur A, Kinali M, Mercuri E, Kaluarachchi M, Feng L, Jimenez-Mallebrera C, Clement E, Torelli S, Sewry CA and Brown SC. Muscular dystrophies due to defective glycosylation of dystroglycan. *Acta Myol*. 2007; 26: 129-35.

119. van Reeuwijk J, Maugenre S, van den Elzen C, Verrips A, Bertini E, Muntoni F, Merlini L, Scheffer H, Brunner HG, Guicheney P and van Bokhoven H. The expanding phenotype of POMT1 mutations: from Walker-Warburg syndrome to congenital muscular dystrophy, microcephaly, and mental retardation. *Hum Mutat*. 2006; 27: 453-9.

120. Godfrey C, Clement E, Mein R, Brockington M, Smith J, Talim B, Straub V, Robb S, Quinlivan R, Feng L, Jimenez-Mallebrera C, Mercuri E, Manzur AY,

Kinali M, Torelli S, Brown SC, Sewry CA, Bushby K, Topaloglu H, North K, Abbs S and Muntoni F. Refining genotype phenotype correlations in muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan. *Brain*. 2007; 130: 2725-35.

121. Buysse K, Riemersma M, Powell G, van Reeuwijk J, Chitayat D, Roscioli T, Kamsteeg EJ, van den Elzen C, van Beusekom E, Blaser S, Babul-Hirji R, Halliday W, Wright GJ, Stemple DL, Lin YY, Lefeber DJ and van Bokhoven H. Missense mutations in beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 1 (B3GNT1) cause Walker-Warburg syndrome. *Hum Mol Genet*. 2013.

122. Schara U, Kress W, Bonnemann CG, Breitbach-Faller N, Korenke CG, Schreiber G, Stoetter M, Ferreira A and von der Hagen M. The phenotype and long-term follow-up in 11 patients with juvenile selenoprotein N1-related myopathy. *Eur J Paediatr Neurol*. 2008; 12: 224-30.

123. Petit N, Lescure A, Rederstorff M, Krol A, Moghadaszadeh B, Wewer UM and Guicheney P. Selenoprotein N: an endoplasmic reticulum glycoprotein with an early developmental expression pattern. *Hum Mol Genet*. 2003; 12: 1045-53.

124. Flanigan KM, Kerr L, Bromberg MB, Leonard C, Tsuruda J, Zhang P, Gonzalez-Gomez I, Cohn R, Campbell KP and Leppert M. Congenital muscular dystrophy with rigid spine syndrome: a clinical, pathological, radiological, and genetic study. *Ann Neurol*. 2000; 47: 152-61.

125. Ferreira A, Quijano-Roy S, Pichereau C, Moghadaszadeh B, Goemans N, Bonnemann C, Jungbluth H, Straub V, Villanova M, Leroy JP, Romero NB, Martin JJ, Muntoni F, Voit T, Estournet B, Richard P, Fardeau M and Guicheney P. Mutations of the selenoprotein N gene, which is implicated in rigid spine muscular dystrophy, cause the classical phenotype of multiminicore disease:

reassessing the nosology of early-onset myopathies. *Am J Hum Genet.* 2002; 71: 739-49.

126. Voit T CS, Abraham S, Karakesisoglou I, Parano E, Pavone P, Falsaperla R, Amthor H, Schroeder J, Mutoni F, Guicheney P, Nurnberg P, Noegel A, Herrmann R. . Congenital muscular dystrophy with adducted thumbs, mental retardation, cerebellar hypoplasia, and cataracts is caused by mutation of Enaptin (Nesprin-1): the third nuclear envelopathy with muscular dystrophy. In: 2007. tICotWMS, (ed.). Taormina, Italy:2007.

127. Lattanzi G. Prelamin A-mediated nuclear envelope dynamics in normal and laminopathic cells. *Biochem Soc Trans.* 2011; 39: 1698-704.

128. Maraldi NM, Capanni C, Cenni V, Fini M and Lattanzi G. Laminopathies and lamin-associated signaling pathways. *J Cell Biochem.* 2011; 112: 979-92.

129. Zastrow MS, Vlcek S and Wilson KL. Proteins that bind A-type lamins: integrating isolated clues. *J Cell Sci.* 2004; 117: 979-87.

130. Schneider M, Lu W, Neumann S, Brachner A, Gotzmann J, Noegel AA and Karakesisoglou I. Molecular mechanisms of centrosome and cytoskeleton anchorage at the nuclear envelope. *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68: 1593-610.

131. Gomez-Diaz B, Rosas-Vargas H, Roque-Ramirez B, Meza-Espinoza P, Ruano-Calderon LA, Fernandez-Valverde F, Escalante-Bautista D, Escobar-Cedillo RE, Sanchez-Chapul L, Vargas-Canas S, Lopez-Hernandez LB, Bahena-Martinez E, Luna-Angulo AB, Canto P and Coral-Vazquez RM. Immunodetection analysis of muscular dystrophies in Mexico. *Muscle Nerve.* 2012; 45: 338-45.

132. McNally EM and Pytel P. Muscle diseases: the muscular dystrophies. *Annu Rev Pathol.* 2007; 2: 87-109.

133. Garg A, Speckman RA and Bowcock AM. Multisystem dystrophy syndrome due to novel missense mutations in the amino-terminal head and alpha-helical rod domains of the lamin A/C gene. *Am J Med.* 2002; 112: 549-55.
134. van der Kooi AJ, van Meegen M, Ledderhof TM, McNally EM, de Visser M and Bolhuis PA. Genetic localization of a newly recognized autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy with cardiac involvement (LGMD1B) to chromosome 1q11-21. *Am J Hum Genet.* 1997; 60: 891-5.
135. Mercuri E, Poppe M, Quinlivan R, Messina S, Kinali M, Demay L, Bourke J, Richard P, Sewry C, Pike M, Bonne G, Muntoni F and Bushby K. Extreme variability of phenotype in patients with an identical missense mutation in the lamin A/C gene: from congenital onset with severe phenotype to milder classic Emery-Dreifuss variant. *Arch Neurol.* 2004; 61: 690-4.
136. Jimenez-Mallebrera C, Brown SC, Sewry CA and Muntoni F. Congenital muscular dystrophy: molecular and cellular aspects. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62: 809-23.
137. Cenni V, Sabatelli P, Mattioli E, Marmioli S, Capanni C, Ognibene A, Squarzone S, Maraldi NM, Bonne G, Columbaro M, Merlini L and Lattanzi G. Lamin A N-terminal phosphorylation is associated with myoblast activation: impairment in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *J Med Genet.* 2005; 42: 214-20.
138. Mitsuhashi H, Hayashi YK, Matsuda C, Noguchi S, Wakatsuki S, Araki T and Nishino I. Specific phosphorylation of Ser458 of A-type lamins in LMNA-associated myopathy patients. *J Cell Sci.* 2010; 123: 3893-900.
139. Burke B and Stewart CL. Life at the edge: the nuclear envelope and human disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3: 575-85.

140. Malouf J, Alam S, Kanj H, Mufarrij A and Der Kaloustian VM. Hypergonadotropic hypogonadism with congestive cardiomyopathy: an autosomal-recessive disorder? *Am J Med Genet.* 1985; 20: 483-9.
141. Cortelli P, Terlizzi R, Capellari S and Benarroch E. Nuclear lamins: functions and clinical implications. *Neurology.* 2012; 79: 1726-31.
142. Menezes MP, Waddell LB, Evesson FJ, Cooper S, Webster R, Jones K, Mowat D, Kiernan MC, Johnston HM, Corbett A, Harbord M, North KN and Clarke NF. Importance and challenge of making an early diagnosis in LMNA-related muscular dystrophy. *Neurology.* 2012; 78: 1258-63.
143. Chemla JC, Kanter RJ, Carboni MP and Smith EC. Two children with "dropped head" syndrome due to lamin A/C mutations. *Muscle Nerve.* 2010; 42: 839-41.
144. Prigogine C, Richard P, Van den Bergh P, Groswasser J and Deconinck N. Novel LMNA mutation presenting as severe congenital muscular dystrophy. *Pediatr Neurol.* 2010; 43: 283-6.
145. Hattori A, Komaki H, Kawatani M, Sakuma H, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Hayashi YK, Nonaka I and Nishino I. A novel mutation in the LMNA gene causes congenital muscular dystrophy with dropped head and brain involvement. *Neuromuscul Disord.* 2012; 22: 149-51.
146. The Universal Mutation Database. www.umd.be
147. Sewry CA. Muscular dystrophies: an update on pathology and diagnosis. *Acta Neuropathol.* 2010; 120: 343-58.
148. Drakonaki EE and Allen GM. Magnetic resonance imaging, ultrasound and real-time ultrasound elastography of the thigh muscles in congenital muscle dystrophy. *Skeletal Radiol.* 2010; 39: 391-6.

149. Carboni N, Mura M, Marrosu G, Cocco E, Ahmad M, Solla E, Mateddu A, Maioli MA, Marini S, Nissardi V, Frau J, Mallarini G, Mercuro G and Marrosu MG. Muscle MRI findings in patients with an apparently exclusive cardiac phenotype due to a novel LMNA gene mutation. *Neuromuscul Disord*. 2008; 18: 291-8.
150. Carboni N, Mura M, Marrosu G, Cocco E, Marini S, Solla E, Mateddu A, Maioli MA, Piras R, Mallarini G, Mercuro G, Porcu M and Marrosu MG. Muscle imaging analogies in a cohort of patients with different clinical phenotypes caused by LMNA gene mutations. *Muscle Nerve*. 2010; 41: 458-63.
151. Arpa J, Campos Y, Cruz Martinez A, Gutierrez Molina M, Arenas J, Alonso M, Plaza I, Morales C, Palomo F, Barreiro P and et al. [Clinical and investigative approaches in mitochondrial diseases. A review of 15 cases]. *Neurologia*. 1994; 9: 324-36.
152. Scharner J, Brown CA, Bower M, Iannaccone ST, Khatri IA, Escolar D, Gordon E, Felice K, Crowe CA, Grosmann C, Meriggioli MN, Asamoah A, Gordon O, Gnocchi VF, Ellis JA, Mendell JR and Zammit PS. Novel LMNA mutations in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy and functional characterization of four LMNA mutations. *Hum Mutat*. 2011; 32: 152-67.
153. Miller SA, Dykes DD and Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16: 1215.
154. Lin F and Worman HJ. Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J Biol Chem*. 1993; 268: 16321-6.
155. Stenson PD, Ball EV, Howells K, Phillips AD, Mort M and Cooper DN. The Human Gene Mutation Database: providing a comprehensive central

mutation database for molecular diagnostics and personalized genomics. *Hum Genomics*. 2009; 4: 69-72.

156. den Dunnen JT and Antonarakis SE. Mutation nomenclature. *Curr Protoc Hum Genet*. 2003; Chapter 7: Unit 7 13.

157. Stalnakker SH, Stuart R and Wells L. Mammalian O-mannosylation: unsolved questions of structure/function. *Curr Opin Struct Biol*. 2011; 21: 603-9.

158. Magagnotti C, Bachi A, Zerbini G, Fattore E, Fermo I, Riba M, Previtali SC, Ferrari M, Andolfo A and Benedetti S. Protein profiling reveals energy metabolism and cytoskeletal protein alterations in LMNA mutation carriers. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1822: 970-9.

159. Benedetti S, Bertini E, Iannaccone S, Angelini C, Trisciani M, Toniolo D, Sferrazza B, Carrera P, Comi G, Ferrari M, Quattrini A and Previtali SC. Dominant LMNA mutations can cause combined muscular dystrophy and peripheral neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005; 76: 1019-21.

160. Paradas C RE, Jesus S, Morales J, Gonzalez-Quereda L, Gallano P, Olivé M, Márquez C. Unusual morphological changes due to different mutations in lamin A/C gene: observations in four patients. . *Neuromuscul Disord* 2010; 20: 615-15.

161. Komaki H, Hayashi YK, Tsuburaya R, Sugie K, Kato M, Nagai T, Imataka G, Suzuki S, Saitoh S, Asahina N, Honke K, Higuchi Y, Sakuma H, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Nonaka I and Nishino I. Inflammatory changes in infantile-onset LMNA-associated myopathy. *Neuromuscul Disord*. 2011; 21: 563-8.

162. Wiltshire KM, Hegele RA, Innes AM and Brownell AK. Homozygous Lamin A/C familial lipodystrophy R482Q mutation in autosomal recessive Emery Dreifuss muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 2013; 23:265-8.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Artigo submetido à revista *BMC Neurology* em 11/04/2013

MS: 4387552239658538

Congenital muscular dystrophy with dropped head linked to the LMNA gene in a Brazilian Cohort

Livia MA Pasqualin, Umbertina C Reed, Thais VMM Costa, Elisangela Quedas, Marco AA Veloso, Maria BD Resende, Anne Rutkowski, Gerson Chadi and Edmar Zanuteli

BMC Neurology

Dear Ms Pasqualin

Thank you for your recent submission to BMC Neurology. I would like to update you regarding your status with respect to the article processing charge that is normally due if a manuscript is accepted.

Congenital muscular dystrophy with dropped head linked to the *LMNA* gene in a Brazilian Cohort

LÍVIA MA PASQUALIN¹, UMBERTINA C REED¹, THAIS VMM COSTA¹,
ELISÂNGELA QUEDAS², MARCO AA VELOSO¹, MARIA BD RESENDE¹,
ANNE RUTKOWSKI³, GERSON CHADI¹, EDMAR ZANOTELI¹

Livia Meirelles de Araujo Pasqualin (PhD)

Umbertina Conti Reed (MD, PhD)

Thais Virginia Moura Machado Costa

Elisangela Quedas

Marco Antônio Albuquerque Veloso (PhD)

Maria Bernadete Dutra Resende (MD, PhD)

Anne Rutkowski, (MD)

Gerson Chadi (MD, PhD)

Edmar Zanuteli (MD, PhD)

Author Affiliations

1 Department of Neurology, School of Medicine, University of São Paulo, Brazil.

2 Department of Endocrinology, School of Medicine, University of São Paulo, Brazil.

3 Kaiser SCPMG, Cure CMD, USA.

Corresponding author and address: Edmar Zanuteli zanoteli@terra.com.br
Av. Dr. Arnaldo, 455, Medical School of the University of São Paulo, Room
2115, CEP 01246903, São Paulo, Brazil. Tel 55 11-30617878

Abstract

Background: The Congenital Muscular Dystrophies (CMDs) are a clinically and genetically heterogeneous group of myopathies that are characterized by hypotonia, delayed motor development and early onset of progressive muscle weakness with dystrophic pattern on muscle biopsy. The dystrophic pattern is not specific. The clinical course is broadly variable and can comprise the involvement of the brain and eyes. Almost half of the cases is caused by deficiency of laminin- α 2 (merosin). Other protein deficiencies recently described include: collagen VI, selenoprotein N1, several glycosyltransferases responsible for glycosylation of α -dystroglycan and lamin A/C. LMNA-related congenital muscular dystrophy (CMD) is rare and characterized by early onset hypotonia with axial muscle weakness presenting typically with loss in motor acquisitions within the first year of life and a dropped head phenotype. Here, we report clinical and histological characteristics of four unrelated Brazilian patients with dropped head syndrome and confirmed mutations in the *LMNA* gene. **Case presentation:** All patients had previously described mutations (p.E358K, p.R249W, and p.N39S) and showed an elevation of serum creatine kinase (two to six-fold), a dystrophic pattern on muscle biopsy and respiratory insufficiency requiring ventilatory support. Three of the patients manifested cardiac arrhythmias while one patient demonstrated a mild neuropathic pattern by nerve conduction study. **Conclusion:** While LMNA-related CMD is a clinically distinct and recognizable phenotype, genotype/phenotype correlation and ability to anticipate onset of respiratory and cardiac involvement and need for nutritional support remains difficult.

Keywords: Congenital muscular dystrophy; *LMNA* gene; muscle biopsy; muscle hypotonia

Background

Congenital muscular dystrophy (CMD) comprises a clinically and genetically heterogeneous group of muscular dystrophies that presents within the first two years of life with hypotonia, muscle weakness, delayed motor development, and contractures[1-5]. The most common classification is based on both the cellular localization of the deficient protein product and gene involved: 1) deficiency of extracellular matrix proteins (*LAMA2*-related muscular dystrophy, Collagen VI-related myopathy and *ITGA7*-related myopathy); 2) deficiency of the membrane associated protein complex due to hypoglycosylation of alpha-dystroglycan (*POMT1*, *POMT2*, *POMGnT1*, *LARGE*, *Fukutin*, *FKRP*, and, *ISPD*-related muscular dystrophies); 3) deficiency of endoplasmic reticulum proteins (*SEPN1*-related myopathy); and 4) deficiency in nuclear envelope proteins (*LMNA*-related muscular dystrophy). However, some recent identified CMDs, per example, due to *CHKB* mutations, do not fit into any of those categories. Marked axial weakness identified as head lag on clinical exam and a dropped head posture in patients with an early CMD phenotype, normal cognition and a dystrophic muscle biopsy is tightly associated with mutations in the *LMNA* gene[6-10]. The *LMNA* gene maps to chromosome 1q21.2–q21.3 and encodes lamin A/C. Mutations in the lamin A/C gene lead to both premature aging syndromes and several forms of neuromuscular disorders, including CMD, a

dominant-form of Emery-Dreifuss muscular dystrophy, limb-girdle muscular dystrophy type 1B, dilated cardiomyopathy with conduction defect disease, and recessive Charcot-Marie-Tooth type 2[11]. Herein we report the clinical and histological characterization of four unrelated Brazilian children with CMD who presented with dropped head syndrome and carry *LMNA* gene mutations.

Case presentation

Case 1: Patient 1 is a 9-year-old boy, born to healthy non-consanguineous parents. Pregnancy and perinatal/neonatal course were uneventful. The patient was able to achieve independent ambulation at 19 months though parents report difficulty in rising from floor and stair climbing. At the age of 2 years, he began to have progressive difficulty holding his head up and lost the ability to walk at the age of 6 years. Clinical examination showed generalized muscle atrophy, hypotonia and marked proximal limb and neck extensor weakness (Figure 1A). Significant contractures of the sternocleidomastoid muscle and of the major joints of the upper and lower limbs were noted at 3 years of age. Creatine kinase level was 6 times the upper limit of normal value. Cardiac evaluation by EKG showed a tachyarrhythmia sinus, but echocardiogram and Holter monitoring were normal. He was found to have a moderate restrictive respiratory insufficiency. Electromyography demonstrated a myopathic pattern and normal nerve conduction studies (NCS). Biceps braquialis muscle biopsy at 3 years of age was compatible with a mild dystrophic pattern characterized by fiber size variability, increase of nuclei centralization, increase of endomysial and perimysial connective tissue, intracytoplasmatic defects of oxidative activity enzymes, but no necrosis or inflammation, in association with some fibers showing small intracytoplasmatic aggregates (Figure 2A-C).

Immunohistochemistry for merosin, dystrophin, collagen VI, sarcoglycan, dysferlin, caveolin 3, emerin, and lamin A/C was normal. Complete *LMNA* gene sequencing revealed the heterozygous mutation p.E358K.

Case 2: Patient 2 is an 8-year-old boy, born at 38 weeks gestation to non-consanguineous parents. His neonatal course was remarkable for respiratory distress and he was hospitalized for 13 days. At age 6 months, he was able to raise his head from prone and sit unsupported. However, over the next several months, head control was entirely lost, and marked weakness and atrophy of the cervical muscles became apparent with global hypotonia. When first examined, he had a dropped head, generalized weakness, elbows hyperextensibility and absence of deep tendon reflexes. He could not sit independently (Figure 1B). Progressive feeding difficulties and severe failure to thrive led to the need for gastrostomy at the age of 6 years. The patient required intubation and prolonged mechanical ventilation, followed by tracheostomy at 6 years of age due to a reversible cardiac arrest of unknown cause. He has remained hospitalized in an intensive care unit for 2 years. The patient was last examined at 6 years of age. Biceps braquialis muscle biopsy at 1 year and 3 months of age showed a severe dystrophic pattern characterized by intense fatty and connective tissue infiltration with the presence of few atrophic muscle fibers (Figure 2D). At the same time, CK level was 5 times the upper limit of normality. Immunohistochemistry for merosin, dystrophin, collagen VI, sarcoglycan, dysferlin, caveolin 3, emerin, and lamin A/C was normal. He was found to have the heterozygous mutation p.R249W confirming the diagnosis of L-CMD. The mutation was not found in the parents.

Case 3: Patient number 3 was a 6-year-old girl referred for evaluation of delayed motor development. Motor milestones were delayed in the first year of life and, at six months, the patient was unable to hold her head up (Figure 1C). She was able to sit unsupported at 2 years old but never walked. From age 3 years, she developed failure to thrive and respiratory discomfort when sleeping. Neurological examination revealed generalized weakness with predominance in the proximal portions of the limbs, more pronounced in the lower limbs, hypotonia, and hyporeflexia. Diffuse contractures were observed including ankles, knees, hips, elbows, wrists, hands and fingers. The CK level was increased by four times the upper limit of the normal value. EKG and echocardiogram were normal. She died suddenly at the age of 6 years after an episode of brief dyspnea possibly due to either progressive respiratory insufficiency or a cardiac arrhythmia. Neurophysiological study showed motor and sensory conduction slowing consistent with demyelination predominant in distal nerve segments (NCS average 33m/s), discrete reduction of compound muscle action potential (CMAP) at the proximal sites, and a chronic myopathic pattern predominantly in the proximal portions of the limbs demonstrated by concentric needle electrode, thereby associating the myopathic pattern with a mild peripheral neuropathy. A biceps braquialis muscle biopsy at 3 years of age showed a moderately dystrophic pattern characterized by muscle fiber variability, increase of connective tissue, nuclei centralization, necrosis and regenerated fibers (Figures 2E and 2F) without changes in merosin, dystrophin, collagen VI, sarcoglycan, dysferlin, caveolin 3, emerin, and lamin A/C

expression. *LMNA* gene sequencing revealed the previously reported heterozygous mutation p.N39S. The mutation was not found in the parents.

Case 4: Patient 4 is an 8-year-old boy born full term. Family history was unremarkable. He was able to hold his head up at 2 months old, but over the next few months head control was entirely lost and marked weakness and atrophy of the cervicoaxial muscles became apparent. The patient could walk holding his head up at 2 years of age, lost the walking ability at 4 years, and during the last examination was able to sit when placed. Neurological examination exhibited severe axial and limb muscle wasting (Figure 1D). At 3 years of age, he developed elbow, ankle, and knee contractures and distal upper limb hyperextensibility. At the age of 5 years, he was found to have nocturnal hypoventilation by polysomnography with the initiation of non-invasive ventilator support and gastrostomy placement, due to inadequate nutrition. Cardiac evaluation with Holter monitoring demonstrated frequent ventricular extrasystoles. The CK level was 2 times the upper limit of the normal value. Muscular magnetic resonance imaging of whole body (T1 sequences) showing severe abnormal signal in the posterior cervical muscles, gluteus maximum muscles, anterior and posterior compartments of the legs, with relative preservation in distal muscle of the legs and arms (Figure 3). A biceps braquialis muscle biopsy at 4 years of age demonstrated a mildly dystrophic pattern characterized by fiber size variability, increase of nuclei centralization and type 1 atrophy with mild defects of oxidative activity on type 1 fibers (Figures 2G and 2H). Immunohistochemical analysis was normal for all proteins tested (merosin, dystrophin, collagen VI, sarcoglycan, dysferlin, caveolin 3,

emerin, and lamin A/C). The heterozygous mutation p.N39S in the *LMNA* gene was identified. The mutation was not found in the mother.

Discussion

We describe herein four unrelated Brazilian children with a CMD phenotype, profound axial muscle weakness and dropped head syndrome associated with confirmed previously reported *LMNA* gene mutations. L-CMD appears to be rare and the incidence remains unknown. The increasing availability and access to genetic testing may assist in establishing true prevalence over time. In all four cases, the muscle biopsy showed a dystrophic pattern ranging from mild to severe, as has been described in other cases of L-CMD though patients can have findings associated more commonly with myopathic disease, including: type 1 fiber predominance, type 1 fiber hypotrophy, or atrophic angulated fibers[6-8, 10, 12]. In addition, cases with neurogenic changes have also been described[5, 6]. Indeed, patients with Charcot-Marie-Tooth disease have been associated with *LMNA* mutations, indicating the involvement of lamin A/C in nerve physiology[13]. One of our patients showed muscle and nerve involvement. Peripheral neuropathy associated with *LMNA* mutations is not restricted to specific mutations and this is the first case described with the p.N39S mutation. While the muscle biopsy typically demonstrates dystrophic or myopathic findings the immunohistochemical stain for LMNA is often normal highlighting protein functional abnormalities rather than deficiency as causative. The inability to deliver a diagnosis by immunohistochemical may preclude the diagnosis in countries with limited access to genetic testing[2]. However,

analysis of protein expression by Western blotting can demonstrate reduced levels of lamin A/C and confirm a diagnosis[10].

All of our patients demonstrated early motor gains that were subsequently lost, though one patient maintained gains for longer and achieved the ability to walk. CMD patients with the same *LMNA* mutations can develop variable degrees of motor involvement[6-8, 10]. Progressive neck extensor weakness with muscle wasting in the cervico-axial distribution together with dropped head syndrome is the most consistent finding in L-CMD patients[10]. Unlike the patients with L-CMD described by Quijano et al (2008) with predominant weakness in proximal upper and distal lower extremities, our patients' muscle weakness pattern was more diffuse[6]. In our patients, we also noted contractures in several joints, not restricted to distal joints. Although global hyperextensibility has been rarely described[10], one of our patients demonstrated distal hyperextensibility, which has not been previously described[1].

All of our patients had restrictive respiratory insufficiency and required nocturnal mechanical ventilation. One patient required tracheostomy and ventilatory support at 6 years of age. Three patients developed swallowing disturbance, failure to thrive, and required early placement of a gastrostomy. Three of our patients presented with cardiac arrhythmia, characterized by sinus and ventricular extrasystoles. One of them had sudden death that we believe to be associated with cardiac disease, as happened in another one that presented with a reversible sudden cardiac arrest of unknown cause. Sudden cardiac arrhythmia is the most frequent cause of death in these patients and conduction defects should be tested at follow-up. These findings confirm the challenges in

medical management and the need for a multidisciplinary approach to ensure optimal care[6-8, 10].

In some patients with laminopathies, the resonance of the muscle seems to show a peculiar pattern of involvement. The subcutaneous tissue is diffusely reduced with severe fatty replacement of axial muscles, the pelvic and shoulder girdles, and limbs. There is abnormal signal in the biceps, triceps and thoracic paraspinal musculature, with moderate involvement of the deltoid, sparing the distal muscles of the limbs. Furthermore the involvement spares the rectus femoris and adductor magnus, different from the vastus lateralis and medial gastrocnemius, with characteristic preservation of the lateral gastrocnemius, similar to the findings of muscular dystrophy, Emery-Dreifuss and LGMD1B, thus these findings could help in early suspicion of disease[14].

All the mutations we detected have already been described in association with CMD and also with Emery-Dreifuss muscular dystrophy, and more rarely with limb girdle muscular dystrophies[13]. There are no reports of these mutations causing other forms of laminopathies that do not affect the skeletal muscle. Among our patients, missense mutation of exons 1 or 6 were detected in three cases. Although the number of published cases of L-CMD is still small, exons 1 and 6 are apparently the most frequently locations for causative mutations, and therefore should be analyzed first[6, 8, 10]. p.E358K mutation has been described frequently in patients with L-CMD. These cases usually have a severe phenotype ranging from never achieving walking to ambulation loss at approximately 3 to 4 years old[6, 15]. Our patient with this mutation had a slightly milder clinical phenotype with maintenance of walking ability up to 6 years of age and the ability to stay seated until the age of 8 years. The mutation

p.R249W presents with a less varied clinical phenotype: most patients described so far have developed poor neck control during the first year of life without acquisition of motor skills, as seen in our patient[6, 7, 16]. p.R249W mutations may cause a more homogeneous clinical phenotype.

Conclusions

Genotype-phenotype correlation remains difficult in L-CMD. As demonstrated by these four cases, different mutations can give rise to the same clinical pattern and an identical mutation may cause a different clinical progression and severity. Clinical recognition of the characteristic phenotype and disease course together with Western blotting study of protein expression and genetic testing will provide the highest yield in establishing the individual diagnosis and true global prevalence.

Competing interest

The authors declare that they have no competing of interests.

Authors' contributions

LMAP and EZ had full access to all of the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. Study concept, design and interpretation: LMAP, UCR and EZ. LMAP, TVMMC and EQ carried out the molecular genetic study. MAAV and MBDR carried out the examination of the patients. AR, GC and UCR made a critical revision of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding/Support

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2010/08902-5).

References

1. Reed UC: **Congenital muscular dystrophy. Part I: a review of phenotypical and diagnostic aspects.** *Arquivos de neuro-psiquiatria* 2009, **67**(1):144-168.
2. Bonnemann CG, Rutkowski A, Mercuri E, Muntoni F: **173rd ENMC International Workshop: congenital muscular dystrophy outcome measures 5-7 March 2010, Naarden, The Netherlands.** *Neuromuscular disorders : NMD* 2011, **21**(7):513-522.
3. Sewry CA: **Muscular dystrophies: an update on pathology and diagnosis.** *Acta neuropathologica* 2010, **120**(3):343-358.
4. Muntoni F, Voit T: **The congenital muscular dystrophies in 2004: a century of exciting progress.** *Neuromuscular disorders : NMD* 2004, **14**(10):635-649.
5. Benedetti S, Bertini E, Iannaccone S, Angelini C, Trisciani M, Toniolo D, Sferrazza B, Carrera P, Comi G, Ferrari M *et al*: **Dominant LMNA mutations can cause combined muscular dystrophy and peripheral neuropathy.** *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2005, **76**(7):1019-1021.
6. Quijano-Roy S, Mbieleu B, Bonnemann CG, Jeannet PY, Colomer J, Clarke NF, Cuisset JM, Roper H, De Meirleir L, D'Amico A *et al*: **De novo LMNA mutations cause a new form of congenital muscular dystrophy.** *Annals of neurology* 2008, **64**(2):177-186.
7. Chemla JC, Kanter RJ, Carboni MP, Smith EC: **Two children with "dropped head" syndrome due to lamin A/C mutations.** *Muscle & nerve* 2010, **42**(5):839-841.
8. Prigogine C, Richard P, Van den Bergh P, Groswasser J, Deconinck N: **Novel LMNA mutation presenting as severe congenital muscular dystrophy.** *Pediatric neurology* 2010, **43**(4):283-286.

9. Hattori A, Komaki H, Kawatani M, Sakuma H, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Hayashi YK, Nonaka I *et al*: **A novel mutation in the LMNA gene causes congenital muscular dystrophy with dropped head and brain involvement.** *Neuromuscular disorders : NMD* 2012, **22**(2):149-151.
10. Menezes MP, Waddell LB, Evesson FJ, Cooper S, Webster R, Jones K, Mowat D, Kiernan MC, Johnston HM, Corbett A *et al*: **Importance and challenge of making an early diagnosis in LMNA-related muscular dystrophy.** *Neurology* 2012, **78**(16):1258-1263.
11. Muchir A, Worman HJ: **The nuclear envelope and human disease.** *Physiology (Bethesda)* 2004, **19**:309-314.
12. van Berlo JH, de Voogt WG, van der Kooi AJ, van Tintelen JP, Bonne G, Yaou RB, Duboc D, Rossenbacker T, Heidebuchel H, de Visser M *et al*: **Meta-analysis of clinical characteristics of 299 carriers of LMNA gene mutations: do lamin A/C mutations portend a high risk of sudden death?** *J Mol Med (Berl)* 2005, **83**(1):79-83.
13. Worman HJ, Bonne G: **"Laminopathies": a wide spectrum of human diseases.** *Experimental cell research* 2007, **313**(10):2121-2133.
14. Quijano-Roy S, Avila-Smirnow D, Carrier RY: **Whole body muscle MRI protocol: pattern recognition in early onset NM disorders.** *Neuromuscular disorders : NMD* 2012, **22 Suppl 2**:S68-84.
15. Scharner J, Brown CA, Bower M, Iannaccone ST, Khatri IA, Escolar D, Gordon E, Felice K, Crowe CA, Grosmann C *et al*: **Novel LMNA mutations in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy and functional characterization of four LMNA mutations.** *Human mutation* 2011, **32**(2):152-167.
16. Komaki H, Hayashi YK, Tsuburaya R, Sugie K, Kato M, Nagai T, Imataka G, Suzuki S, Saitoh S, Asahina N *et al*: **Inflammatory changes in infantile-onset LMNA-associated myopathy.** *Neuromuscular disorders : NMD* 2011, **21**(8):563-568.