Erika Midoli Matsunaga

**Distribuição do tipo de fibras musculares e sua
correlação genotípica na doença de Pompe**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Neurologia

Orientadora: Profa. Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Matsunaga, Erika Midoli

Distribuição do tipo de fibras musculares e sua correlação genotípica na doença de Pompe / Erika Midoli Matsunaga. -- São Paulo, 2009.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Neurologia.

Área de concentração: Neurologia.

Orientadora: Suely Kazue Nagahashi Marie.

Descritores: 1.Doença de depósito de glicogênio tipo II 2.Alfa-glucosidases
3.Fibras musculares 4.Miosina tipo I 5.Miosina tipo II 6.Ulex 7.Imunoistoquímica
8.Western blotting 9.Polimorfismo genético 10.Genótipo

USP/FM/SBD-032/09

DEDICATÓRIA

Um agradecimento especial à minha orientadora Prof^ª Dr^a Suely Kazue Nagahashi Marie, pelos valiosos ensinamentos e pelo incentivo constante ao conhecimento, sempre me apoiando no que fosse necessário para meu aprendizado e crescimento profissional. Obrigada pela oportunidade de trabalhar e aprender ao seu lado, compartilhando sua sabedoria, experiência, dedicação e disciplina, proporcionando trabalhos de qualidade para a comunidade científica.

Deixo minha gratidão eterna pelo seu esforço constante em busca do melhor para o Grupo de Miopatias da Faculdade de Medicina da USP.

À toda a minha família, agradeço do fundo do coração todo o amor, carinho, compreensão, respeito, apoio e dedicação, que me deram para que eu possa estar aqui hoje.

Aos meus pais, Hiroyuki e Nobuco, sempre ao meu lado em cada conquista, fazendo de suas vidas a minha vida, acreditando nos meus objetivos, pensando sempre no melhor para eu crescer e prosperar.

Às minhas irmãs, Andréa e Márcia, pela compreensão e paciência em todos os momentos.

À minha querida tia e madrinha Alice, obrigada por tudo, e sobretudo pelo amor que demonstra por mim. Você me ensina e incentiva muito. Sem você, tenho certeza que esse caminho seria muito mais árduo.

AGRADECIMENTOS

Às vezes, o tempo passa tão rápido que não temos tempo para agradecer e falar o quanto gostamos de determinadas pessoas.

A lista de agradecimentos é grande, o que me torna uma pessoa de sorte.

Gostaria de agradecer todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho e que estarão guardadas para sempre em minha memória e em meu coração. Obrigada a todos, amigos e familiares, por terem compartilhado comigo momentos decisivos de minha vida acadêmica, apoiando-me, incentivando e lutando comigo, em busca de um ideal que agora se concretiza na forma deste trabalho.

À Dr^a Sueli Mieko Oba-Shinjo, por toda atenção, pelas discussões e sugestões em vários momentos durante a elaboração deste trabalho. Acompanhou todas as etapas deste trabalho, contando sempre sua experiência, idéias e comentários, sendo um estímulo constante em busca do melhor.

À Dra. Mary Souza de Carvalho pelos conselhos e ensinamentos preciosos e pela ajuda na captação das amostras, através da realização de biópsia muscular, que fizeram parte dessa casuística.

À Eliene Dutra Campos, sempre dedicada, acudiu-me com sua amizade e competência profissional. Agradeço pela prontidão e pelo seu esforço em me ajudar.

À Dra. Alda Wakamatsu pela realização e ensino das reações de imunoistoquímica.

À minha amiga Miyuki Uno, que me apoiou no início das minhas atividades no laboratório, ensinando com paciência e sabedoria as técnicas utilizadas, sempre com ótimas sugestões que muito contribuíram para esta dissertação.

Às minhas queridas amigas, Thatiana Bastos Guimarães e Mariana Brandão, pela ajuda, incentivo e alegria em todos os momentos. Sempre dispostas a ajudar. Amigas para todas as horas.

Às minhas colegas e meu colega de laboratório – LIM 15: Célia Miyagui, Priscila Carvalho, Maria José Ferreira Alves, Roseli da Silva, Thais Galatro, Renata Correia, Mussya Cisotto, Márcia Hiromi Matsunaga, Thais Freire, Simone Kneip, Ana Paula Hasegawa, Patrícia Takahashi, Juliana Kitahara, Marcelo D. Campos, Keila Cardoso, Alice Yamada, Márcia de Azevedo, Maria Eunice da Silva, Rose Bedim,

Mônica Rusticci, Rosa, Camila e Darcy Borges pelos momentos alegres e sobretudo pela amizade.

Ao querido Dr. Pedro A. Santana Jr., uma pessoa carismática e inteligente, que sempre compartilhou momentos de alegria, angústia e apreensão, pois também estava finalizando sua tese de doutorado, mas que por uma fatalidade da vida, nos deixou, sem tempo para despedidas. Deixo aqui meus sinceros agradecimentos e saudades.

Às voluntárias do Ambulatório de Músculo: Ivete, Nair, Leonilda, pela alegria e descontração, que me fizeram muito bem. Agradeço a Deus por ter me dado a benção de conhecer vocês.

Aos funcionários do Departamento de Neurologia: Sra. Thaís, Sr. Erli, Sra. Sueli e Sra. Reiko pelo carinho e atenção.

Aos pacientes e seus familiares, que sempre foram a razão para a realização deste trabalho, todo o meu respeito e dedicação.

Aos meus familiares: pais, irmãs, primos e tios. Vocês são peças fundamentais da minha vida e sem vocês tenho certeza que não teria conseguido. Obrigada pelos momentos de alegria e pela compreensão nesses anos que fui tão ausente.

Aos colegas de trabalho do Hospital, principalmente minha amiga Raquel Tomotani pelas madrugadas em claro nos plantões, que passaram mais rápido com nossas conversas, sempre me incentivando a seguir em frente.

Às colegas de trabalho da EEUSP: Carla, Josinete, Maria Cecília e Verônica, que conheci na finalização desta dissertação, mas que me apoiaram e incentivaram, possibilitando finalizar este trabalho com tranquilidade.

À Deus, por ter me dado forças para seguir este caminho e por ter me abençoado com pessoas maravilhosas que marcaram minha vida.

Apesar deste trabalho ser individual e muitas vezes solitário, seria impossível realizar algo sem a ajuda dos amigos e daqueles que nos querem bem.

Cada pessoa que passa em nossa vida é única. Sempre deixa um pouco de si e leva um pouco de nós. Há os que levaram muito, mas não há os que não deixaram nada. Esta é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova evidente de que não nos encontramos por acaso.

"Preciso de serenidade para aceitar as
coisas que não posso mudar, coragem para
mudar as que posso e sabedoria para
conhecer a diferença."
(R. Niebuhr)

“Escolhi os plantões,
porque sei que o escuro da noite amedronta os enfermos.
Escolhi estar presente na dor,
porque já estive muito perto do sofrimento.
Escolhi servir ao próximo,
porque sei que todos nós um dia precisamos de ajuda.
Escolhi o branco,
porque quero transmitir a paz.
Escolhi estudar métodos de trabalho,
porque os livros são fontes de saber.
Escolhi me dedicar à saúde,
porque respeito a vida.”
(Autor desconhecido)

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Gráficos

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	04
2.1. Doença de Pompe	05
2.1.1. Histórico	05
2.1.2. Formas Clínicas	08
2.1.3. Diagnóstico	10
2.1.4. Epidemiologia.....	12
2.1.5. Genotipagem.....	12
2.2. Morfologia do músculo esquelético.....	14
2.2.1. Fibra Muscular.....	14
2.2.2. Alterações musculares na Doença de Pompe	20
2.2.3. Vascularização das fibras	21
2.2.4. Alterações musculares na hipóxia muscular.....	23
2.3. Outros genes constitutivos na determinação das fibras musculares	25
2.4. Western Blotting, quantidade residual de GAA e quadro clínico.....	28
2.5. Genótipo e quantidade residual de GAA	29

2.6. Estudo da autofagia em modelo animal	29
3. OBJETIVOS.....	32
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	34
4.1. Casuística	35
4.1.1. Casos	36
4.1.2. Controle	36
4.1.3. Portadores	37
4.1.4. Aspectos Éticos.....	37
4.2. Métodos.....	38
4.2.1. Biópsia Muscular	38
4.2.2. Técnicas de Tipagem das Fibras	39
4.2.3. Estudo Morfométrico	43
4.2.4. Genotipagem.....	44
4.2.5. Gene ACE (Enzima Conversora da Angiotensina).....	45
4.2.6. Estudo da proteína GAA.....	47
4.2.7. Análise Estatística.....	49
5. RESULTADOS	50
5.1. População de estudo.....	51
5.2. Análise dos dados clínicos	56
5.3. Análise da genotipagem.....	57
5.4. Análise dos achados de biópsia muscular	59
5.4.1. Estudo histológico e histoquímico.....	59
5.4.2. Estudo morfométrico	89

5.5. Correlação do polimorfismo do gene ACE com a distribuição de fibras ..	102
5.6. Correlação da quantificação da enzima GAA no Western Blotting (WB) e o genótipo da doença.....	104
6. DISCUSSÃO.....	108
6.1. População de estudo.....	109
6.2. Dados clínicos	109
6.3. Genotipagem das mutações	110
6.4. Achados de biópsia muscular	111
6.4.1. Análise histológica e histoquímica à biópsia muscular	111
6.4.2. Estudo morfométrico	112
6.4.3. Densidade capilar.....	117
6.5. Correlação do polimorfismo do gene ACE com a distribuição de fibras ..	118
6.6. Correlação do Western Blotting (WB) com a enzima residual de GAA e o genótipo da doença	119
6.7. O impacto do achado de predomínio de fibras tipo II no prognóstico a na resposta terapêutica dos pacientes com doença de Pompe.....	120
7. CONCLUSÃO	123
8. ANEXOS.....	125
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	147

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
ABS	Complexo Avidina-biotina-peroxidase
ACE	Enzima Conversora de Angiotensina
A I	Angiotensina I
A II	Angiotensina II
<i>apud</i>	citado por
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Adenosina trifosfatase
BSA	Soro Albumina Bovina
C	Citosina
°C	graus Celsius
COX	Citocromo C oxidase
CPK	Creatinofosfoquinase
CRIM	Reação cruzada de material imunológico
CTO	Controle
Cis	Cisteína
DBS	<i>Dried Blood Spot</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	deoxinucleotídeo trifosfatado
DP	Desvio-padrão
ECL	Reagente quimiluminescente
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
<i>et al.</i>	e outros
F. ác.	Fosfatase ácida
F. alc.	Fosfatase alcalina
FG	Metabolismo glicolítico

FIP	Forma de início-precoce
FIT	Forma de início-tardio
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FOG	Metabolismo oxidativo-glicolítico
FT	<i>Fast twitch</i>
G	Guanina
GAA	α - glucosidase ácida
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutâmico
Gli	Glicina
Gomori	Gomori-modificado
GSD II	Glicogenose tipo II
h	hora
H&E	Hematoxilina-eosina
HCl	Ácido clorídrico
He	Heterozigose
HIF-1	Fator induzível pela hipóxia 1
Ho	Homozigose
HQ	Histoquímica
HRP	Horse Radish Peroxidase
IHQ	Imunoistoquímica
IVS	Intron
KCl	Cloreto de potássio
KO	<i>Knock-out</i>
kDA	kilodalton
Leu	Leucina
LIM-15	Laboratório de Investigação em Neurologia - 15
Lis	Lisina
mA	miliampere
MyF	Miosina rápida
MgCl ₂	Cloreto de magnésio

MHC (MyHC)	Cadeia de miosina pesada
MHCI	Cadeia Pesada de Miosina I
MHCII	Cadeia Pesada de Miosina II
min	minutos
mL	mililitro
MLC (LC)	Cadeia de miosina leve
mM	milimolar
MyS	Miosina lenta
NaCl	Cloreto de sódio
ng	nanograma
ORO	Oil Red O
PAS	Ácido periódico de Schiff
pb	pares de bases
PBS	Tampão fosfato salina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	potencial de Hidrogênio
PIC	Coquetel Inibidor de Protease
PM	Peso molecular
Pro	Prolina
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SO	Metabolismo oxidativo
SRA	Sistema renina-angiotensina
ST	<i>Slow twitch</i>
T	Timina
TAE	Tris-acetato EDTA
TBS	Tampão tris salina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Thr	Tirosina
TRE	Terapia de Reposição Enzimática

Tris-HCl	TrisHydrochloride
Trp	Triptofano
T-TBS	Tampão tris salina com temed
UEA-I	<i>Ulex europaeus agglutinin</i>
UM	Unidade motora
UV	Ultra-violeta
Val	Valina
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WB	Western blotting
X	Códon de parada prematura
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
µM	micromolar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gene estrutural humano que codifica GAA	06
Figura 2. Fisiopatologia da Doença de Pompe	07
Figura 3. Distribuição das mutações e polimorfismos do gene GAA	13
Figura 4. Nível de organização da fibra muscular esquelética	19
Figura 5a. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR.....	46
Figura 5b. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR.....	46
Figura 6. Fórmula para cálculo da quantidade de proteína e correlação com a curva de Bradford	47
Figura 7. Bandas da proteína GAA no Western blotting.....	48
Figura 8. Heredograma da Família A	54
Figura 9. Heredograma da Família B.....	55
Figura 10. Histologia, histoquímica e imunoistoquímica do caso 2.....	61
Figura 11. Histologia, histoquímica e imunoistoquímica do caso 32.....	63
Figura 12. Histologia, histoquímica e imunoistoquímica do caso 5.....	65
Figura 13. Histologia, histoquímica e imunoistoquímica do caso 11.....	67
Figura 14. Histologia, histoquímica e imunoistoquímica do caso 12.....	69
Figura 15. Histologia, histoquímica e imunoistoquímica do caso 13.....	71
Figura 16. Histologia, histoquímica e imunoistoquímica do caso 14.....	73
Figura 17. Histologia, histoquímica e imunoistoquímica do caso 15.....	75
Figura 18. Histologia, histoquímica e imunoistoquímica do caso 16.....	77
Figura 19. Histologia, histoquímica e imunoistoquímica do caso 17.....	79
Figura 20. Histologia, histoquímica e imunoistoquímica do caso 18.....	81

Figura 21. Histologia, histoquímica e imunoistoquímica do caso 19	83
Figura 22. Histologia, histoquímica e imunoistoquímica do caso 38	85
Figura 23. Primeira e segunda biópsia do caso 15	88
Figura 24. Western blotting dos pacientes estudados com doença de Pompe	106
Figura 25. Dupla-marcação no caso 12	115
Figura 26. Dupla-marcação no caso 16	116
Figura 27. Densidade capilar aumentada ao redor das fibras tipo II vacuoladas no caso 16	118

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribuição do tipo de fibras na Forma início-precoce	93
Gráfico 2. Distribuição do tipo de fibras na Forma início-tardio.....	93
Gráfico 3. Distribuição do tipo de fibras em controle infantil	94
Gráfico 4. Distribuição do tipo de fibras em controle juvenil/adulto	94
Gráfico 5. Gráfico de tendência da distribuição do tipo de fibras em casos e controles da FIP	95
Gráfico 6. Gráfico de tendência da distribuição do tipo de fibras em casos e controles da FIT	95
Gráfico 7. Densidade capilar na Forma início-precoce.....	99
Gráfico 8. Densidade capilar em controle infantil	99
Gráfico 9. Densidade capilar na Forma início-tardio.....	100
Gráfico 10. Densidade capilar em controle juvenil/adulto	100
Gráfico 11. Gráfico de tendência da densidade capilar em casos e controles da FIP e FIT	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Sinais e sintomas da forma início-precocce (FIP)	09
Tabela 2.	Sinais e sintomas da forma início-tardio (FIT)	10
Tabela 3.	Diagnóstico diferencial	11
Tabela 4.	Mutações e polimorfismos do gene GAA.....	14
Tabela 5.	Principais diferenças das fibras do músculo esquelético	16
Tabela 6.	Distribuição dos casos quanto ao gênero, a idade e a forma clínica da doença	36
Tabela 7.	Distribuição dos controles quanto ao gênero e a idade	37
Tabela 8.	Distribuição dos portadores quanto ao gênero e a idade.....	37
Tabela 9.	Anticorpos Monoclonais comerciais de miosina e ulex e as diluições utilizadas	41
Tabela 10.	Seqüência do <i>primer</i> e tamanho do produto de PCR	45
Tabela 11.	Casuística do estudo com a respectiva idade de início dos sintomas, ao diagnóstico e à biópsia.....	51
Tabela 12.	Dados clínicos dos 19 casos estudados	53
Tabela 13.	Mutações encontradas nos 19 pacientes estudados com doença de Pompe.....	58
Tabela 14.	Achados de biópsia muscular.....	60
Tabela 15.	Idade dos pacientes na realização de biópsias seqüenciais	87
Tabela 16.	Distribuição do tipo de fibras e tipo de fibra vacuolada dos casos estudados	91
Tabela 17.	Distribuição do tipo de fibras em controles dos casos estudados .	92

Tabela 18.	Densidade capilar dos 19 casos estudados	97
Tabela 19.	Densidade capilar dos controles dos 19 casos estudados	98
Tabela 20.	Polimorfismo ACE dos pacientes, fenótipo preditivo pela genotipagem do gene ACE, resultado da distribuição de fibras tipo I e II, e a presença ou não da correspondência desta distribuição com o polimorfismo	102
Tabela 21.	Polimorfismo ACE dos controles, fenótipo preditivo pela genotipagem do gene ACE, resultado da distribuição de fibras tipo I e II, e a presença ou não da correspondência desta distribuição com o polimorfismo	103
Tabela 22.	Western Blotting da proteína GAA dos casos estudados	105
Tabela 23.	Sinopse geral dos resultados analisados de cada caso de doença de Pompe	107

RESUMO

MATSUNAGA, E. M. *Distribuição do tipo de fibras musculares e sua correlação genotípica na doença de Pompe*. [Dissertação] São Paulo, 2009 – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. 160p.

A doença de Pompe (GSDII), autossômica recessiva, é causada pela deficiência da enzima lisossomal que degrada o glicogênio, α -glucosidase ácida (GAA). O quadro clínico varia de acordo com a idade de início da doença, grau de progressão e envolvimento dos tecidos: predominantemente cardíaco e muscular esquelético na forma de início-precoce (FIP) e mais restrito no músculo esquelético na forma de início-tardio (FIT). A sobrevida média na FIP é de 9-12 meses.

Com avanço dos métodos histológicos, histoquímicos e imunoistoquímicos intensificou-se a análise estrutural e funcional dos tipos de fibras musculares.

O estudo da vascularização também é de importância pelo aporte nutricional e funcional das fibras.

O objetivo do presente trabalho é analisar a correlação da distribuição do tipo de fibras com a forma de apresentação clínica da doença de Pompe, seu genótipo correspondente e a quantidade residual da enzima GAA.

Analisou-se 10 biópsias musculares de pacientes FIP e 09 de FIT comparados com o grupo controle, pareados por idade e gênero. Os pacientes foram selecionados segundo dados clínicos e laboratoriais, sendo feito o seqüenciamento de toda parte codificante do gene e Western Blotting (WB) com anticorpo monoclonal 15362-157, cedido pela Genzyme (primário 1:200 e secundário 1:10.000). A confirmação do diagnóstico foi feita através da medida da atividade residual de GAA em papel filtro, da presença de miopatia vacuolar com grânulos PAS e fosfatase ácida positivos em biópsia muscular e pela presença de mutação no gene GAA.

A reação de imunoistoquímica foi realizada para fibras tipo I (lenta), tipo II (rápida) e densidade capilar (ulex), utilizando anticorpos monoclonais, respectivamente: anti-miosina lenta (1:80), anti-miosina rápida (1:40) da Novocastra e ulex da Vector (1:800). A contagem das fibras foi realizada por 2 observadores em todo fragmento do corte transversal da biópsia com auxílio de um programa semi-automatizado.

Observou-se predomínio de fibras tipo II em ambos os gêneros na FIP e predomínio de fibras tipo I em mulheres e tipo II em homens, na FIT. Aumento da densidade capilar, em comparação com os controles, foi notada em ambas as formas IP e IT.

Verificou-se em média 90% de fibras vacuoladas nos casos FIP com completa distorção da arquitetura, enquanto na FIT, a porcentagem de fibras vacuoladas foi variável (0-88%).

Como alguns genes constitutivos influenciam na distribuição das fibras musculares, como o gene ACE, o polimorfismo deste gene foi analisado quanto aos genótipos I/I, D/D e I/D. Observou-se ausência de concordância entre o genótipo do ACE e a distribuição de fibras em 60% dos casos da FIP e FIT, atribuindo-se o resultado da distribuição do tipo de fibras como parte da patologia da doença de Pompe.

A gravidade da doença variou inversamente com a quantidade de enzima residual, sendo compatível com o quadro clínico do paciente.

A presença de mutação deletéria em ambos os alelos foi observada em 3/10 casos de IP, sendo que todos os 3 casos apresentaram ausência total de enzima no WB.

Há maior envolvimento de fibras tipo II em GSDII, sem depleção da microcirculação muscular. Estudos demonstram que a remoção do depósito de glicogênio ocorre diferencialmente nos tipos de fibra, sendo menos eficiente nas fibras tipo II.

O achado do presente estudo poderá ter implicações na resposta à recente terapêutica proposta por reposição enzimática.

SUMMARY

MATSUNAGA, E. M. *Muscle fiber type distribution and genotype correlation in the Pompe disease*. [Dissertação] São Paulo, 2009 – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. 160p.

The glycogen storage disease type II (GSDII), autosomal recessive disorder, is caused by the deficiency of GAA (acid α -glucosidase) a lysosomal enzyme that degrades the glycogen. The clinical findings are in accordance to great variability of age onset, degree of disease progression and extent of tissue involvement: predominantly cardiac and skeletal muscle in the infantile form (I) and more restricted to the skeletal muscle in the late-onset form (LO). The average survival time of the infantile form is 9-12 months. With advances of the histological, histochemical and immunohistochemical methods structural and functional analysis of muscle fiber types were intensified. The study of the capillary density is also important for nutritional and functional aspects. The objective of the present work is to analyze the correlations of the fiber type distribution to clinical presentation, genotype and residual GAA enzymatic activity. We analyzed 10 muscle biopsies of infantile and 09 of late-onset patients and compared to age and gender matched controls. The patients were selected according to clinical and laboratorial data, molecular diagnosis by full gene sequencing, and Western Blotting (WB) with monoclonal antibody 15362-157, courtesy Genzyme Science Group (primary 1:200 and secondary 1:10.000). Diagnostic confirmation was made by GAA enzymatic measurement in DBS, presence of vacuolar myopathy in muscle biopsy, and presence of mutation in GAA gene. The immunohistochemical study was carried out by detection of type I (slow), type II (fast) fibers and capillaries, using monoclonal antibodies, respectively: anti-slow myosin (1:80), anti-fast myosin (1:40) (Novocastra) and ulex (1:800) (Vector). Morphometry was performed by 2 observers using a half-automatized program. Type II fiber predominance was observed in both gender in the infantile form, type I fiber predominance in women and type II predominance in men with LO. Increase of the capillary density, in comparison to controls was noticed in both forms. 90% of vacuolated fibers with complete distortion of fiber architecture were demonstrated in I cases, while in LO, the percentage of vacuolated fibers ranged from 0 to 88%. As some constitutive gene, like ACE, influence muscle fiber distribution, its polymorphisms I/I, D/D and I/D gene were analyzed. Absence of agreement was observed between ACE genotype and fiber type distribution in 60% of I and LO cases, which was attributed as consequence of Pompe disease pathology itself. The disease severity varied inversely to the amount of residual GAA enzymatic activity, being compatible with the patient clinical findings. The presence of deleterious mutation in both alleles was observed in 3/10 infantile cases, and all 3 presented total enzyme absence at WB. A greater fiber type II involvement was observed in GSDII, without decrease in muscle capillary density. Recent studies demonstrated that glycogen deposit removal occurs distinctively in different fiber types, being less efficient in type II fibers. The present findings might have implications in the reply to the recent proposed enzyme replacement therapy.

1. INTRODUÇÃO

A glicogenose tipo II (GSD II) é uma desordem de depósito lisossomal, de herança autossômica recessiva, causada por alterações envolvendo a α -1,4-glucosidase (GAA), que hidroliza cadeias externas do glicogênio, oligossacarídeos lineares e maltose para glicose. A forma clássica infantil (doença de Pompe), a forma mais grave de glicogenose, é geralmente fatal na infância. É uma doença generalizada com envolvimento de múltiplos órgãos, incluindo fígado, coração, músculo esquelético, rim e sistema nervoso central. As crianças afetadas apresentam acentuada hipotonia e fraqueza, associadas a sintomas de insuficiência cardíaca e respiratória. A fraqueza muscular deve-se ao acometimento do músculo ou dos motoneurônios do corno anterior da medula, havendo semelhança no fenótipo muscular esquelético com os casos infantis de amiotrofia espinal progressiva. Nas formas juvenil e adulta predomina o acometimento muscular esquelético, frequentemente similar a distrofia muscular tipo cinturas.

Atualmente, a GSD II apresenta mais de 250 mutações descritas no gene GAA, resultando em diminuição ou ausência da atividade enzimática e consequente acúmulo de glicogênio em células do músculo cardíaco e esquelético, sendo considerada uma desordem muito heterogênea, com grande variabilidade em relação à idade de início, grau de progressão da doença e comprometimento dos tecidos envolvidos. As principais manifestações incluem cardiomegalia e progressiva fraqueza muscular, que em geral, culminam em morte por falência cardíaca e/ou respiratória.

Nas últimas décadas, com o avanço dos métodos histológicos, histoquímicos e imunoistoquímicos, que permitem uma maior precisão na tipagem das fibras musculares determinando as isoformas de miosina, houve uma intensificação dos estudos com relação à tipologia das fibras musculares e suas funções.

A vascularização das fibras também tem-se mostrado um importante alvo de estudo devido ao seu envolvimento na nutrição celular, refletindo o estado funcional das fibras musculares.

O principal avanço na doença de Pompe foi o desenvolvimento da terapia de reposição enzimática (TRE), que se tornou recentemente disponível para os pacientes (abril de 2008). Os resultados dos estudos clínicos e pré-clínicos indicam que a retirada eficaz do glicogênio do músculo esquelético parece ser mais difícil do que o previsto, em vista da variabilidade da resposta à TRE.

A irreversibilidade da destruição e a resistência do músculo esquelético à TRE permanecem problemas ainda não resolvidos, necessitando assim de novas abordagens experimentais para compreender melhor os mecanismos que levam à transição do tipo de fibras e seu comportamento, para melhorar a eficácia do tratamento na doença de Pompe.

Há descrições prévias de que as fibras musculares tipo II apresentam-se mais resistentes ao tratamento da reposição enzimática. Esta observação foi primeiramente realizada em modelo animal e confirmada em número restrito de biópsias musculares humanas.

Este estudo tem como objetivo analisar a distribuição do tipo de fibras em pacientes com doença de Pompe e correlacionar com a forma clínica de apresentação, densidade capilar, polimorfismo do gene ACE, genótipo e quantidade de enzima GAA residual em busca de fator preditivo de prognóstico para a resposta terapêutica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Doença de Pompe

2.1.1. Histórico

Primeira descrição do quadro clínico

A doença de Pompe foi nomeada após a apresentação de um caso de uma criança de 7 meses que morreu com hipertrofia idiopática do coração em 1932, pelo patologista holandês J.C. Pompe. Além dos problemas cardíacos, a criança apresentava fraqueza muscular generalizada. Dr. Pompe observou que os sintomas da criança estavam associados com o armazenamento maciço de glicogênio em todos os tecidos. Logo após, M. Putschar relatou um caso similar no mesmo ano. Segundo a classificação de G.T. Cori de 1954, dentre as doenças metabólicas de armazenamento do glicogênio, a doença de Pompe foi denominada como doença de depósito do glicogênio tipo II (GSD II), sendo a forma mais grave das 12 doenças de depósito de glicogênio. (*apud Schoser et al.* 2007).

Enzima α -glucosidase ácida (GAA, maltase ácida)

A α -glucosidase ácida (GAA), enzima lisossomal (OMIM 606800), catalisa a hidrólise do acoplamento de α -1,4 e α -1,6-glucosidase no pH ácido, realizando a hidrólise completa de seu substrato natural, glicogênio, um polímero de cadeia ramificada de glucose (Auricchio 1968). O gene estrutural humano que codifica GAA está localizado no cromossomo 17q25.2-q25.3 e contém 20 exons, o primeiro dos quais não é codificado (Raben 1995, Kuo 1996, Hirschhorn 2001). O cDNA é superior a 3,6 kb no comprimento, com 2859 nucleotídeos da sequência codificada, predizendo um polipeptídeo de 952 aminoácidos com uma massa molecular calculada de 105 kDa para a proteína não glicosilada (Martiniuk 1990, 1991). O polipeptídeo da enzima tem sete locais para a glicosilação ligada ao N das asparaginas 140, 233, 390, 470, 652, 882, e 925, e um domínio catalítico no aminoácido 518 (Hermans 1991, 1993). A enzima é sintetizada como um precursor catalítico inativo de 110 kDa que é dividida nas proteínas maduras de 76 kDa e 70 kDa através da glicosilação, fosforilação e das modificações

proteolíticas múltiplas (Moreland 2005, Wisselaar 1993, Hermans 1993). A enzima precursora da GAA é fosforilada e é transportada para os lisossomos da via principal através do receptor cátion-independente manose-6-fosfato de 215 kDa (Tsuji 1988, Ghosh 2003). Além disso, GAA pode estar localizado em outros compartimentos subcelulares em alguns tecidos por um mecanismo não identificado, foi também detectado na superfície das membranas dos microvilos intestinais (Willemsen 1991), de linhagens celulares humanas do carcinoma de cólon (Klumperman 1992) e de células epiteliais do túbulo proximal do rim (Oude-Elferink 1989). A localização e o transporte de GAA em células musculares não foram até o momento elucidados. Tais estudos poderiam ser relevantes para compreender a fisiopatologia das diferentes mutações, particularmente com respeito aos pacientes com doença de início-tardio que tem a atividade residual de GAA, e para a reposição da enzima ou terapia visando o aumento da eficiência da atividade da enzima residual. Em resumo, enquanto as etapas principais pós-translacionais do processo de GAA já tenham sido delineadas, os detalhes precisos das diversas etapas intermediárias, bem como sua possível variação nos diferentes tecidos, necessitam ainda ser melhor analisados (Hirschhorn 2001).

Figura 1. Gene estrutural humano que codifica GAA (Modificado do *Pompe Center*).

Fisiopatologia da Doença de Pompe

Segundo Hirschhom 2001, a doença de depósito do glicogênio tipo II (GSDII) ou doença de Pompe (OMIM 23230) é uma desordem autossômica recessiva causada pela atividade deficiente da enzima lisossomal, α -glucosidase ácida (GAA). Esta enzima é responsável pela degradação do glicogênio intra-lisossômico, que representa apenas uma pequena porcentagem (1-3%) do glicogênio celular total. A medida que a doença avança, ocorre a ruptura dos lisossomos e a invasão do glicogênio no interior das células. A sua ausência completa ou presença em níveis de baixa atividade enzimática causam o acúmulo do glicogênio em células do músculo cardíaco, respiratório e esquelético, resultando em progressiva fraqueza muscular e morte, por falência cardíaca e/ou respiratória (Hirschhom, 2001 e Kishnani, 2004).

Figura 2. Fisiopatologia da Doença de Pompe (Modificado de Raben N, *et al.* Curr Mol Med. 2002;2:145-166).

2.1.2. Formas Clínicas

Os pacientes com deficiência de GAA têm sido classificados em 2 subtipos: forma de início-precoc (FIP) e forma de início-tardio (FIT), que diferem: 1) pela idade do início, 2) velocidade de progressão da doença, e 3) extensão de tecidos envolvidos.

A FIP (doença de Pompe) apresenta-se tipicamente nos primeiros meses da vida, e é caracterizada pela hipotonia grave, pela fraqueza progressiva e pela cardiomegalia maciça, com hepatomegalia variável e macroglossia (Tabela 1). A morte ocorre dentro do primeiro ano de vida devido à insuficiência cardio-respiratória em 80% dos bebês, que tipicamente apresentam envolvimento do músculo cardíaco e esquelético. Na autópsia, os casos de FIP apresentam acentuado acúmulo de glicogênio em: fígado, coração, músculo esquelético, músculo liso, rim, olho, pele, células do corno anterior da medula espinal, núcleo motor do tronco cerebral, gânglios espinais, plexo mioentérico, astrócitos, oligodendrócitos, células endoteliais, linfócitos, fibroblastos, e pericitos (Martin 1973, DiMauro 1978).

A FIT é subdividida em: juvenil (início após o primeiro ano, mas antes da fase adulta) e adulto (início após 20 anos de idade). A subforma juvenil apresenta dificuldade à marcha, com quedas frequentes iniciando-se entre 2 e 3 anos de idade. Geralmente, tornam-se restritos a cadeira de rodas na infância tardia e sucumbem à insuficiência respiratória na adolescência. E a subforma adulta evolui com fraqueza muscular, sendo mais restrita à musculatura esquelética, com uma lenta progressão clínica da miopatia proximal e envolvimento marcado dos músculos respiratórios, conforme a Tabela 2 (Hirschhorn 2001).

Tabela 1. Sinais e sintomas da forma início-precoce (FIP)

Sistema de Órgãos	Sinais / Sintomas
Músculo-esquelético	Fraqueza muscular progressiva Hipotonia profunda Flacidez (“bebê de pano”) Falta de firmeza no pescoço (“não segura a cabeça”) Insuficiência para alcançar os marcos do desenvolvimento motor
Pulmões	Fraqueza respiratória progressiva/ insuficiência respiratória Infecções respiratórias freqüentes Morte devido à insuficiência cardiorrespiratória
Coração	Cardiomegalia/Cardiomiopatia Falência cardíaca progressiva
Visceral/ Gastrointestinal	Dificuldade de deglutir, mamar e/ou alimentar-se Organomegalia (Hepatomegalia, esplenomegalia e macroglossia)

Adaptado de Hirschhorn R, *et al.* The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 2001:3389-3420.

Tabela 2. Sinais e sintomas da forma início-tardio (FIT)

Sistema de Órgãos	Sinais / Sintomas
Músculo-esquelético	Fraqueza progressiva da musculatura proximal (escápula, tronco e membros inferiores) Dores musculares Marcha instável, na ponta dos pés Reflexos profundos reduzidos Dificuldades para subir escadas Escápula alada Sinal de Gower Quedas freqüentes
Pulmões	Insuficiência respiratória Ortopnéia Apnéia do sono Dispnéia ao esforço, intolerância ao exercício Infecções respiratórias
Outros	Dores de cabeça matinais Sonolência diurna

Adaptado de Hirschhorn R, *et al.* The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 2001:3389-3420.

2.1.3. Diagnóstico

O diagnóstico da doença de Pompe baseia-se em níveis elevados de creatinofosfoquinase (CPK) e alterações à biopsia muscular caracterizadas por miopatia vacuolar. A medida da atividade da enzima GAA pode ser realizada em *dried blood spot* (DBS) (Umapathysivam *et al.*, 2001), leucócitos e fibroblastos cultivados. Quando houver histórico familiar, o diagnóstico pré-natal pode ser realizado através da determinação da atividade de GAA em vilosidades coriônicas ou cultura de células amnióticas (Kishnani *et al.* 2006).

Devido à raridade da doença, geralmente perde-se um tempo precioso entre o início dos sintomas e o diagnóstico da forma infantil da doença de Pompe (Kishnani 2004). Similarmente, os pacientes com progressão mais lenta da doença são também mais difíceis de serem diagnosticados, pois os sintomas se apresentam mais atenuados e há sobreposição do quadro clínico com distrofias, miopatias metabólicas e inflamatórias (Hagemans 2005).

Os erros de diagnóstico iniciais mais comuns encontram-se descritos na Tabela 3. Entre os exames importantes para o diferencial entre a doença de Pompe e outras doenças estão os testes bioquímicos, eletromiografia, raios-X do tórax, ecocardiograma, ECG e o teste isquêmico do antebraço.

Tabela 3. Diagnóstico diferencial

Forma início-precoces da doença de Pompe
Doença de Werding-Hoffman aguda (atrofia muscular espinhal I)
Doença de Danon
Fibroelastose endocárdica
Doenças de depósito de glicogênio III, IV, VI
Cardiomiopatia hipertrófica idiopática
Distúrbios mitocondriais
Miocardite
Forma início-tardias da doença de Pompe
Distrofia muscular de Duchenne
Doenças de depósito de glicogênio III, V, VI
Distrofia muscular cintura-membros
Polimiosite
Síndrome da espinha rígida
Síndromes escapuloperoneais

2.1.4. Epidemiologia

Estimativas atuais relatam que a incidência geral da doença é de 1:40.000 nascidos-vivos, sendo a incidência menor na FIP (1:138.000) e maior na FIT (1:57.000) (Martiniuk 1998 e Ausems 1999).

Entretanto, a incidência da doença de Pompe pode variar em diferentes grupos étnicos, de 1/100.000 a 1/200.000 para a FIP na população caucasiana (Kroos 1995), 1/14.000 entre afro-americanos, e 1/40.000 a 1/50.000 entre os chineses (Lin 1987). A frequência da FIT em populações caucasianas pode ser tão elevada quanto 1/60.000 (Ausems 1999).

2.1.5. Genotipagem

Mutações do gene GAA

Em 1990, as mutações no GAA foram descritas pela primeira vez por Hoefsloot *et al.* As pesquisas subsequentes demonstraram grande heterogeneidade dessas mutações ao nível molecular (Van der Ploeg 1989 e Martiniuk 1998). Demonstrou-se que a deficiência da GAA na FIP é causada por uma mutação estrutural com síntese de enzima cataliticamente inativa, enquanto a mutação na FIT causa a redução na quantidade da enzima (Beratis 1978).

Mutações: A figura 1 mostra 252 mutações e 64 polimorfismos que foram descritos no gene GAA (<http://www.pompecenter.nl>- Maio, 2008 e Kroos 2008), sendo 167 mutações correlacionadas ao fenótipo infantil grave, 17 ao intermediário, 16 à forma de início-tardio e 52 desconhecidas. Algumas mutações são relativamente comuns, como: IVS1-13 T>G causando um *splicing* aberrante do exon 2 (Kroos 1995, Huie 1994, Hermans 2004), a deleção do exon 18, resultando em perda de 55 aminoácidos (Van der Kraan 1994), uma deleção de uma única-base no exon 2 (del T525) que conduz à parada prematura da síntese de GAA (Hermans 1994), e a substituição N645 (1935C>A) no exon 14 (Shieh 1994, Tsujino 2000).

Polimorfismos (regiões de um gene específico com substituição de uma única base de nucleotídeo ou uma variação do número de pequenas seqüências repetidas de DNA encontrados em mais de 1% da população normal): há três formas alélicas comuns de GAA humano expressos co-dominantemente (Nickel 1982, Beratis 1980, Martiniuk 1990, Huie 1996). A análise dessas freqüências prediz a heterozigosidade de 20% para estes polimorfismos normais na população. Há um aumento de evidências de que a variação genética normal poderia potencialmente interagir com as mutações para modular o fenótipo resultante, tal como o polimorfismo G689K que é ligado a mutação comum de início infantil em Taiwan (Shieh 1998). Adicionalmente, há uma variação normal nos introns (Figura 3), com diversos locais que possivelmente modificam a eficiência do *splicing*. Embora a freqüência dos alelos tenha sido determinada para muito deles, a base molecular é desconhecida para a maioria.

Figura 3: Distribuição das mutações e polimorfismos do gene GAA já descritas em pacientes com GSDII. 5': região não codificadora 5', 3': região não codificadora 3', int#: intron, #: exon. Baseado nos dados apresentados em <http://www.pompecenter.nl>- Maio, 2008 e Kroos 2008.

Tabela 4: Mutações e polimorfismos do gene GAA.

Mutações descritas	Número
<i>Nonsense</i>	27
<i>Missense</i>	131
Rearranjo*	66
<i>Splice</i>	28
Polimorfismos	64
Total	316

* Rearranjo (deleção, inserção e duplicação)

www.pompecenter.nl - Maio, 2008 e Kroos 2008

Mutações de GAA que causam GSDII: As mutações descritas até a presente data são 131 mutações do tipo *missense* (troca de base com troca de aminoácido), além de 27 *nonsense* (troca de base gerando códon de parada prematura), 28 mutações em sítio de *splice* (troca de base nas regiões de “splicing”), e 66 inserção/deleção/duplicação (rearranjo) distribuídos ao longo de todo o gene, com uma concentração mais elevada de mutações *missense* no exon 14, a segunda área mais conservada evolutivamente, e nos exons 5, 12 e 13, como mostra o histograma acima (Tabela 4). Embora a maioria das mutações descritas ocorra em um ou dois pacientes, há diversas mutações que são freqüentes em grupos étnicos específicos como o IVS1-13 T>G observado nos caucasianos com uma freqüência do alelo de 0,4-0,6; Asp645Glu observados em taiwaneses; Asg854X nos afro-americanos; del525T e del exon 18 em holandeses, com a freqüência do alelo de 0,8; 0,6; 0,34 e 0,25 respectivamente.

Para melhor compreensão das alterações do músculo esquelético, será apresentada uma revisão morfológica e funcional da fibra muscular.

2.2. Morfologia do músculo esquelético

2.2.1. Fibra Muscular

Em meados da segunda metade do século XIX, houve uma preocupação dos pesquisadores em buscar uma explicação para a variação na cor da fibra muscular, no aspecto fisiológico e estrutural. Em 1898, Ciaccio afirmou que as primeiras pesquisas sobre a variação na cor da fibra muscular datavam de 1678, quando Lorenzini, observando os músculos animais, havia classificado as fibras musculares em brancas e vermelhas (*apud* Dubowitz, 1985).

A maioria das pesquisas era feita em animais e os estudos feitos nos anos de 1873, 1874 e 1880, por Ranvier, em coelhos, sugeriam uma diferença fisiológica entre as fibras vermelhas e brancas, correlacionando-as com contração lenta (ST-*slow twitch*) e rápida (FT-*fast twitch*), respectivamente. O autor confirmou, também, um maior suprimento sangüíneo nos músculos vermelhos que nos brancos (*apud* Dubowitz, 1985).

Em 1884, Grützner, concluiu que os músculos de todos os vertebrados, incluindo o homem, eram compostos de dois tipos de fibras: uma fina e escura e outra larga e clara; definindo a cor escura como grânulos no sarcoplasma (*apud* Dubowitz, 1985).

Paul e Sperling (1952) demonstraram que músculos brancos tinham uma menor quantidade de mitocôndria e baixa atividade respiratória, enquanto músculos vermelhos eram ricos em mitocôndria e apresentavam alta atividade respiratória.

O desenvolvimento das técnicas histoquímicas possibilitou estudar o sistema enzimático, os componentes celulares das fibras musculares e correlacionar as atividades funcionais de cada fibra com sua morfologia (Dubowitz, 1985).

Em 1960, Dubowitz e Pearse subdividiram as fibras musculares de humanos e animais em 2 tipos: tipo I com alta atividade oxidativa e baixa glicolítica; e tipo II com baixa atividade oxidativa e alta glicolítica. A atividade enzimática das fibras intermediárias não foi considerada como outro tipo de fibra.

As fibras de contração rápida podem ser subdivididas em dois subtipos: tipo IIA e IIB. As fibras IIA possuem características contráteis rápidas com capacidade oxidativa-glicolítica

(FOG), enquanto que as fibras IIB são chamadas de verdadeiras fibras de contração rápida, pois suas propriedades metabólicas possuem alta capacidade glicolítica (FG).

O comportamento fisiológico de um músculo está relacionado a uma unidade motora (UM). A inervação da fibra muscular tem origem nos neurônios dispostos no corno anterior da espinha dorsal. O neurônio localizado no corno anterior da medula irá ramificar-se para suprir várias fibras do músculo esquelético (Dubowitz, 1985).

Os tipos de fibras de um músculo são determinados pela UM e o motoneurônio que inerva a fibra muscular determina o seu tipo. No entanto, se a fibra muscular foi inervada por outro motoneurônio, diferente da original, esta irá mudar as suas características de acordo com a inervação atual. Isto indica a flexibilidade e adaptação dos tipos de fibras.

Outros fatores também podem influenciar o tipo de fibra, como por exemplo, exercício físico aeróbio tende a aumentar a proporção de fibras tipo I no músculo exercitado (Carpenter e Karpati, 2001).

As principais diferenças histoquímicas, bioquímicas, fisiológicas e metabólicas entre os tipos de fibras podem ser observadas na Tabela 5.

Tabela 5: Principais diferenças das fibras do músculo esquelético

Métodos de classificação das fibras	Terminologia da classificação das fibras	
- Histoquímico	Tipo I	Tipo II
- Coloração	Vermelha	Branca
- Bioquímico	SO	FG/ FOG
- Fisiológico	Contração lenta	Contração rápida
- Metabolismo	Oxidativo	Glicolítico
- Limiar de fadiga	Alta resistência à fadiga	Baixa/ moderada resistência à fadiga
- Imunoistoquímico	MHCI	MHCII
- pH	Ácido	Básico

SO: slow-twitch oxidative (metabolismo oxidativo), FG: fast-twitch glycolytic (metabolismo glicolítico), FOG: fast-twitch oxidative-glycolytic (metabolismo oxidativo-glicolítico), MHCI (Cadeia Pesada de Miosina I) e MHCII (Cadeia Pesada de Miosina II).

Distribuição de fibras

No músculo de membros (bíceps braquial, deltóide, tríceps, quadríceps, vasto lateral, gastrocnêmio, sóleo), a proporção entre as fibras tipo I: II é aproximadamente na mesma proporção e diâmetro (Eriksson, 1982; Dubowitz, 1985; Stal *et al*, 1987). Segundo Eriksson (1982), a proporção de fibras musculares em bíceps braquial é: Tipo I (41,7%), IIB (29%), IIA (19,4%), IIAB (9,4%) e IIC (0,5%).

Mutabilidade dos tipos de fibras

Em estudos feitos por Brooke *et al*, em 1971, observou-se a produção de grandes agrupamentos de fibras tipo I e II sob condições de reinervação, sendo uma evidência indireta que as unidades motoras são uniformes e que é a inervação que determina o tipo de fibras. Sugere-se que as fibras do tipo IIA e IIB são independentemente inervadas. As fibras do tipo IIC não foram encontradas no processo de reinervação, sugerindo que este é um tipo primitivo de fibra.

As unidades motoras de músculos lentos são mais constantemente ativadas com uma frequência menor de disparo que os músculos rápidos. Isto sugere que as diferenças entre as características mecânicas destes músculos são decorrentes de diferenças do padrão de atividade de seus nervos motores (Dubowitz, 1985).

Em resumo, os efeitos de exercícios no padrão histoquímico do músculo esquelético são complexos, variáveis e dependem de diversos fatores externos, incluindo o tipo de atividade física exercida, a intensidade, a duração, o músculo estudado e a herança genética.

Através de técnicas histoquímicas, em 1978, Colling e Saltin analisaram amostras musculares de fetos humanos e observaram que até a 20ª semana de gestação, 100% das fibras musculares eram indiferenciadas.

Notou-se que o número de fibras indiferenciadas diminuía proporcionalmente ao surgimento de fibras tipo I. Após o nascimento, ocorria a continuação do processo de maturação e diferenciação das fibras musculares, sendo mais evidente no 1º ano de vida e estabilizando-se na vida adulta.

Miosina e suas Isoformas

A tipagem das fibras musculares pode ser realizada pela análise da composição das proteínas contráteis (miosina, actina, tropomiosina e troponina).

A miosina corresponde a 54 % das proteínas miofibrilares e é a principal constituinte do filamento grosso, sendo altamente polimórfica. A molécula de miosina é um hexâmero (Figura 4), constituído de 2 cadeias pesadas (PM: 200kDa) e 4 cadeias leves (PM: 20kDa). Ela é concomitantemente uma proteína estrutural e a enzima, responsável pela atividade da ATPase. Suas funções são o ancoramento da linha Z e a contração muscular. As fibras musculares são classificadas de acordo com a sua característica fisiológica mais importante, a velocidade de contração. As fibras musculares podem ser de 2 tipos: contração lenta e contração rápida. Existem diferentes isoformas quimiomecânicas de miosina e ela constitui um bom marcador para distinção dos diferentes tipos de fibras funcionais. Portanto, no músculo adulto, as fibras tipo I de contração lenta expressam miosina lenta, enquanto as fibras tipo II de contração rápida expressam miosina rápida (Dubowitz, 1985; Botinelli, 2000).

Figura 4. Nível de organização da fibra muscular esquelética.

A: estrutura global da fibra muscular, **B:** estrutura da unidade de miofibrila contrátil, **C:** composição ultra-estrutural e proteica da miofibrila, e **D:** modelo dimensional da estrutura proteica da miosina. A molécula de miosina é composta de 2 cadeias pesadas (MyHC) e 4 cadeias leves (MyLC -2 essencial e 2 regulatório).

Modificado de Korfage JAM, *et al.* Fiber-type composition of the human jaw muscles. 2005: 774-783.

As fibras apresentam alterações fenotípicas em resposta ao padrão do impulso nervoso, mas se admite também a existência de uma regulação miogênica na sua determinação fenotípica. A regulação miogênica durante o desenvolvimento ocorre da seguinte forma: mioblastos lentos primários apresentam miosina embrionária e lenta, persistindo apenas a miosina lenta na fibra muscular adulta. Já os mioblastos rápidos primários apresentam miosina embrionária e perinatal que são trocadas pelas isoformas rápidas nas fibras maduras. Portanto, a diferenciação entre fibras lentas e rápidas já ocorre na fase de mioblastos, época de inervação múltipla, apontando evidências de que exista uma regulação miogênica para esta diferenciação (Gambke, 1984; Kelly, 1994; Ghosh, 1998).

A marcação pela isoforma da miosina de cadeia pesada (MyHC) pode fornecer a indicação precisa das propriedades das fibras melhor que no processo enzimático histoquímico pela ATPase. O método da ATPase, particularmente no pH alcalino, detecta a atividade enzimática associada a mais de uma isoforma de miosina. Portanto, torna-se difícil a determinação da dupla-marcação por histoquímica enzimática, sendo necessária análise por imunoistoquímica (Tinball, 1992).

2.2.2. Alterações musculares na Doença de Pompe

Histológica, Histoquímica e Imunoistoquímica

O exame histológico da biópsia muscular esquelética mostra que na forma infantil da doença de Pompe a grande maioria das fibras apresenta acúmulo maciço de grânulos PAS positivos de glicogênio. Muitas fibras apresentam espaços vacuolares vazios correspondentes aos depósitos de glicogênio dissolvidos durante o processamento, e a distorção completa da arquitetura das fibras. Estes vacúolos apresentam positividade à reação pela fosfatase ácida indicando a sua natureza lisossomal. Há uma atenuação da gravidade do quadro clínico com o avançar da idade de início, que corresponde paralelamente aos achados histológicos à biópsia com menor número de fibras musculares acometidas. Da mesma forma, as determinações quantitativas do índice de glicogênio no músculo podem variar de normal à três vezes do valor normal nos casos mais graves (Engel 1973).

Na forma início-precoce (FIP), quase todas as fibras apresentam-se vacuoladas e assim, ambas as fibras são igualmente afetadas, enquanto na forma início-tardio (FIT), a porcentagem de fibras vacuoladas diminuiu para 75% (juvenil) e para 10-50%.(adulto), sendo que há um predomínio de fibras vacuoladas em fibras tipo II (Schoser *et al.* 2007).

2.2.3. Vascularização das fibras

O fluxo sanguíneo no músculo esquelético mantém a homeostase durante a atividade muscular através do fornecimento de energia e oxigênio, eliminando excesso de calor e subprodutos metabólicos. O sangue necessário para a execução do trabalho muscular depende do suficiente abastecimento vascular e regulação eficaz do fluxo sanguíneo. O leito capilar proporciona a via final para a nutrição celular e reflete o estado funcional muscular. A fluxo sanguíneo insuficiente pode levar à isquemia, à crise energética e ao acúmulo de substâncias que podem sensibilizar nociceptores musculares e causar dor (Mense, 1992).

Assim, em média, os músculos dos membros contêm cerca de 300-400 capilares/mm² em área transversal. O bíceps braquial apresenta vascularização de 1,8 capilares/fibra em homens e 1,4 capilares/fibra em mulheres (Schmalbruch, 1985). Segundo Stal *et al.* (1987), o número de capilares ao redor de cada fibra praticamente não difere na proporção, sendo tipo I (4,9) e tipo II (4,6).

O exercício aumenta a densidade capilar das fibras musculares, portanto, quando estas estão em atividade, o fluxo sanguíneo aumenta. O aumento da capilaridade ocorre mais facilmente nos músculos compostos com fibras de baixa capacidade oxidativa (Tipo IIB), e apresentam, normalmente, uma baixa densidade capilar. O desenvolvimento de novos capilares, porém, pode ocorrer nos músculos com ambos tipos de fibras (Saltin e Gollnick, 1983; Yang *et al.*, 1994).

O aumento da capilaridade ao redor de cada fibra aumenta a captação de oxigênio devido ao aumento da capacidade de difusão desse elemento, encurtando a distância necessária para que o oxigênio se difunda no músculo e/ou pelo aumento do tempo para que o processo ocorra (ou seja, as células vermelhas do sangue ficam mais tempo nos capilares). Este aumento da capilarização contribui para a melhora da oxigenação, como já foi observado em animais de laboratório submetidos ao treinamento (Bebout *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1994) e em seres humanos (Saltin *et al.*, 1976). Como consequência há

um aumento na captação de oxigênio como se observa em indivíduos condicionados para provas de resistência.

O fluxo sanguíneo no músculo esquelético é bastante elevado e o débito cardíaco não consegue perfundir todos os capilares da massa muscular quando está em atividade máxima (Andersen e Saltin, 1985). Devido a este fato, quando o indivíduo está se exercitando intensamente e requisitando um consumo máximo de oxigênio, o débito cardíaco somente atinge parte das exigências, sendo que parte das necessidades não são atendidas. Especula-se que ocorram modificações e adaptações durante o treinamento, envolvendo uma melhor utilização do fluxo sanguíneo nos músculos e, também ocorra um aumento na troca de nutrientes entre os capilares e as fibras. Este fato tem um papel importante no controle arterial vasomotor no suprimento e na resistência dos vasos (Delp *et al.*, 1993; Segal, 1994) e também no aumento da capacidade de trocas entre os vasos que circundam as fibras musculares.

Ulex (marcador endotelial)

Ulex europaeus agglutinin (UEA-I) é uma glicoproteína com um peso molecular de 63 kDa. É considerado um marcador excelente de células endoteliais humanas que apresenta 2 subunidades, um de aproximadamente 31 kDa e outro de 32 kDa, que se liga a outras glicoproteínas e glicolipídios, que contêm resíduos associados a fucose, tais como glicoconjugados do grupo sanguíneo ABO. Essa lectina se agrega preferencialmente às células do grupo sanguíneo O, e tem sido usada para determinar o estado secretor (Wang X *et al.* 2005). O UEA-I é um marcador endotelial mais específico que o fator Von Willebrand (Sehested e Hou-Jensen 1981; Stephenson *et al.* 1986) e seu anticorpo é altamente sensível ao complexo avidina-biotina-peroxidase (ABS) para determinar a densidade capilar (Hsu *et al.* 1981; Sipos *et al.* 1988) e o número de capilares em relação a diferentes tipos de fibras musculares esqueléticas humanas (Qu *et al.* 1997).

2.2.4. Alterações musculares na hipóxia muscular

O aumento da atividade do músculo esquelético, devido ao treinamento de resistência induz o crescimento capilar (Hudlicka 1990; Hansen-Smith 1998; Pearce 2000; Milkiewicz 2003). Os possíveis fatores responsáveis por este crescimento podem ser metabólicos, os quais se relacionam com a hipóxia, situação na qual ocorre grande aumento na potência aeróbica devido ao aumento da atividade das enzimas oxidativas e das mitocôndrias. Mas estes fatores também podem ser mecânicos, quando estão relacionados com o aumento no fluxo sanguíneo durante a atividade muscular (McGuigan 2001; Hudlicka 1990).

A hipóxia é conhecida por causar indução rápida das mitoses das células endoteliais pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), podendo atuar como estímulo para a angiogênese precoce em músculos estimulados cronicamente (Milkiewicz 2003; Sondell 1999; Hudlicka 2002). O fluxo sanguíneo aumentado pode elevar a força de cisalhamento capilar, que pode ser descrita como um estímulo para a proliferação das células endoteliais e, conseqüentemente, o crescimento capilar (Hudlicka 1990; Hansen-Smith 1998; Pearce 2000; Hudlicka 2002; Hudlicka 1992; Egginton 2000). McGuigan *et al.* relataram que o grau de angiogênese capilar deve ser proporcional à intensidade da hipóxia tecidual.

Anderson *et al.* (2004) observaram que a eletroestimulação crônica de músculos rápidos, experimentalmente, provocou efeitos semelhantes aos do exercício de resistência. Ao contrário do exercício aeróbico, onde as fibras glicolíticas são somente recrutadas durante exercícios de alta intensidade (Carvalho 2004; Egginton 2000). Na eletroestimulação ativa todas as fibras musculares são recrutadas (Hudlicka 2002; Egginton 1999), sendo as fibras tipo II as primeiras (Hudlicka 1994).

Diversos estudos, também experimentais, observaram que a ocorrência de proliferação capilar no treinamento de resistência é mais evidente nas proximidades das fibras oxidativas (Hudlicka 1990; Hudlicka 1984). Em contraposição, na eletroestimulação

crônica, os capilares começam a crescer nas proximidades das fibras glicolíticas inervadas por grandes axônios ativados preferencialmente durante estimulação elétrica (Hudlicka 1990). Portanto, as mudanças descritas no metabolismo de músculos sob eletroestimulação crônica são diferentes das mudanças observadas nos músculos submetidos a treinamento de resistência. Neste tipo de treinamento, a atividade da enzima oxidativa aumenta, mas a relação da densidade capilar/área permanece a mesma enquanto a fibra muscular hipertrofia. Com isso, a distância de difusão do oxigênio é aumentada. No caso dos músculos eletroestimulados, não somente a densidade capilar duplica após 28 dias, segundo Hudlicka *et al.*, mas o diâmetro da fibra é reduzido. Assim, a distância de difusão é bastante diminuída, podendo o músculo obter total vantagem do grande aumento do fluxo sanguíneo durante a sua contração, e utilizar a atividade da enzima oxidativa mais eficientemente (Hudlicka 1977).

Capilarização e capacidade oxidativa

Diversos estudos realizados em experimentos animais (Skorjanc 1998; Green 1997; Egginton 2000; Hudlicka 1977; Hudlicka 1982) relataram que o aumento na capilarização e na atividade oxidativa seguem diferentes tempos de curso. Em geral, o treinamento de resistência induz um aumento na capilarização, o qual é precedido por um aumento na capacidade oxidativa, que pode ser avaliada pelo aumento na atividade enzimática oxidativa e na densidade de volume mitocondrial (Carvalho 2004; Egginton 2000). Em contraste, a estimulação elétrica crônica de músculos esqueléticos rápidos, numa frequência parecida com a observada durante descargas de motoneurônios lentos, aumentou o suprimento capilar previamente ao aumento na capacidade oxidativa (Egginton 2000).

2.3. Outros genes constitutivos na determinação das fibras musculares

Polimorfismo do gene ACE (Enzima Conversora da Angiotensina)

O sistema renina-angiotensina (SRA) endócrino desempenha importante função no controle e homeostasia do sistema circulatório humano (Myerson 1999). Produzida pelas células renais justaglomerulares, um tipo modificado de célula muscular lisa localizada nas arteríolas aferentes, a renina atua sobre a globulina angiotensinogênio, liberando um peptídeo de 10 aminoácidos, a angiotensina I. Esse peptídeo possui propriedades vasoconstritoras leves, porém, quando clivada num peptídeo de oito aminoácidos, angiotensina II (Ang II), por ação da enzima conversora de angiotensina (ACE), uma metaloprotease produzida pelas células endoteliais, adquire capacidade vasoconstritora das mais relevantes. Essa resposta fisiológica é mediada predominantemente por ação em receptores específicos para Ang II (AT₁ e AT₂) localizados na superfície celular (Payne 2003). Além da sua ação vasoconstritora, a Ang II provoca aumento da pressão arterial pela retenção de sais e água nos túbulos renais, secundária à ação da aldosterona liberada pelas suprarenais (Payne 2003; Myerson 1999). Tem sido documentada também a existência de SRA nos tecidos: cardíaco (Dzau 1988; Myerson 2001), adiposo (Jonsson 1994) e muscular esquelético (Dragovic 1996). Outra função determinante do ACE concentra-se na hidrólise da bradicinina (ação vasodilatadora e inibidora do crescimento celular) pela remoção de um dipeptídeo da região C terminal (Coates 2003), o que provoca sua desativação.

O gene ACE (21 Kbp) está localizado no cromossomo 17 q23 e é composto de 26 exons (Coates 2003). Uma variante genética comum no gene ACE foi descrito e consiste na ausência (deleção ou alelo "D") ou presença (inserção ou alelo "I") de 287 pares de base no intron 16 (Rankinen 2000). O alelo D está associado com níveis circulatório e tecidual aumentados no ACE (Costerousse 1993; Danser 1995). O polimorfismo I/D do ACE tem atraído considerável atenção a respeito de sua associação com a performance física humana. Estudos recentes demonstraram que o alelo I é mais freqüente em atletas de

resistência, enquanto que o alelo D, em atletas de força e explosão muscular (Myerson 1999; Hagberg 1998).

No coração, a Ang II é um potente fator de crescimento celular (Touyz 1999). Embora não se tenha verificado aumento da massa ventricular esquerda em indivíduos com diferentes genótipos para o ACE (Kauma 1998; Linhart 2000), a ativação do SRA local com conseqüente aumento da Ang II em resposta à sobrecarga mecânica induzida pelo exercício físico parece aumentar a síntese protéica no miócito cardíaco via receptores AT₁ (Kinugawa 1997; Higaki 2000). A hipertrofia do ventrículo esquerdo (VE) é uma característica marcante em atletas de elite (Douglas 1997). No entanto, foram verificados, em atletas de resistência submetidos a regime de treinamento semelhante, níveis variados de hipertrofia do VE, sugerindo que essa adaptação é mediada geneticamente. Em atletas de resistência (sexo masculino) foi encontrada distribuição de 44%, 51% e 5% para os genótipos DD, DI e II, respectivamente (Hernandez 2003). E atletas com genótipo DD mostraram valores significativamente superiores de índice de massa ventricular esquerda quando comparados com os atletas com genótipo ID. Interessante foi o fato de que 70,4% dos atletas DD, 42% dos atletas DI e 0% dos atletas II atingiram os critérios de caracterização de hipertrofia de VE. Vale ainda ressaltar que a ativação do SRA local pelo exercício físico encontra-se exacerbado em indivíduos homozigotos para o alelo D, resultando em maior degradação da bradicinina. Conforme comentado anteriormente, a bradicinina tem efeito antiproliferativo e inibidor do crescimento (Kinugawa 1997). Portanto, maior degradação da bradicinina pode facilitar a hipertrofia do VE. Entretanto, esses resultados não permitem a conclusão de que polimorfismo I/D do ACE seja o único mediador do desenvolvimento do VE.

Com o intuito de esclarecer o papel entre o polimorfismo I/D do gene ACE e a massa do VE, Montgomery *et al* (1997) relataram mudanças na massa ventricular esquerda associada com o alelo D. 156 recrutas militares masculinos submeteram-se a 10 semanas do treinamento físico, que levou a um aumento médio da massa ventricular esquerda de 2, 38.5 e 42.3g em portadores de genótipo II, ID e DD, respectivamente ($p < 0.01$).

Em um estudo anterior, Montgomery *et al* (1998) encontrou igualmente uma associação entre o polimorfismo ACE e a performance física. O alelo I está associado com a prova de resistência, assim como o alelo D está com a hipertrofia ventricular esquerda. Os portadores do alelo D podem desenvolver hipertrofia atribuível a uma baixa eficiência metabólica.

Williams *et al.* (2000) estudaram em 58 indivíduos saudáveis (sexo masculino) (35 II e 23 DD) a eficiência contrátil muscular avaliada em cicloergômetro, antes e após 11 semanas de um programa de treinamento físico. A energia utilizada por unidade de potência, "delta da eficiência" (% de alteração no trabalho realizado por minuto/% de alteração na energia expendida por minuto) não mostrou ser diferente entre os genótipos II e DD (24,5% e 24,9%, respectivamente) no período pré-treinamento; no entanto, em resposta ao treinamento, essa variável aumentou significativamente entre os indivíduos com genótipo II. Essa diferença representa aumento na eficiência, relativa ao período pré-treinamento, de 8,62% para o genótipo II e -0,39% para o genótipo DD. Os autores reportaram que desconheciam os mecanismos pelos quais o alelo I estaria potencializando a eficiência mecânica em indivíduos treinados. No entanto, fundamentaram seus achados em duas possíveis explicações: 1) a baixa atividade enzimática do ACE no genótipo II poderia melhorar a função contrátil na musculatura cardíaca e esquelética através da melhora na eficiência da oxidação mitocondrial, fator este mediado pelo aumento local na concentração de óxido nítrico (Zhao 1999); e 2) a maior eficiência muscular poderia estar relacionada à constituição das fibras musculares, com o genótipo II apresentando maior percentual de fibras do tipo I (fibras de contração lenta), que são mais eficientes do que as fibras de contração rápida (tipo II) quando a atividade contrátil muscular é realizada em baixa velocidade).

Posteriormente, em 2003, Zhang *et al.* confirmaram uma das hipóteses de Williams *et al.* (2000). Os autores, após biópsia do músculo vasto lateral de 41 indivíduos sedentários, verificaram uma associação entre os genótipos do ACE e a distribuição percentual de fibras I, IIA e IIB. Indivíduos com genótipo II quando comparados com o genótipo DD apresentaram maior média percentual de fibras do tipo I (~50% vs. ~30%,

respectivamente) e menor média percentual de fibras do tipo IIB (~16% vs. ~32%, respectivamente). Não houve diferença entre os genótipos para os valores de média percentual para as fibras do tipo IIA. A relação do tipo de fibras I:II diferiram de acordo com o genótipo ACE. Embora não esteja claro o mecanismo pelo qual o gene ACE determina a distribuição dos diferentes tipos de fibra no músculo, estes resultados corroboram os estudos que mostraram associação do alelo I e alta performance em atletas de resistência.

2.4. Western Blotting, quantidade residual de GAA e quadro clínico

O Western Blotting (WB) é um método em biologia molecular/bioquímica para detectar proteínas em um extrato de tecido biológico, onde podemos examinar a quantidade de proteína em uma dada amostra e comparar os níveis entre diversos grupos (Montalvo 2004).

A proteína GAA é sintetizada como uma proteína precursora de 110 kDa, que é transportada do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi e posteriormente para os lisossomos, onde é proteoliticamente convertida nas formas ativas de 76 kDa e 70 kDa, via um intermediário de longa vida de 95kDa. Uma parcela pequena da proteína precursora é transportada para a membrana plasmática e secretada (Hoefsloot 1990; Martiniuk 1990 e 1991).

Pacientes com doença de Pompe que tem a deficiência de GAA causada por uma mutação nula (mutação *nonsense* que leva a deficiência completa da proteína) são denominadas CRIM (reação cruzada de material imunológico) negativo. Estes pacientes estão sujeitos a produzir grande quantidade de anticorpos anti-hGAA, por não apresentarem proteína residual GAA, mostrando notavelmente a redução na eficácia da TRE (Amalfitano *et al* 2001), pela reação cruzada do anticorpo produzido com enzima GAA exógena administrada terapeuticamente (Koeberl 2007).

O quadro clínico dos pacientes geralmente se relaciona com a quantidade de atividade enzimática residual conforme medida nos fibroblastos cultivados da pele (Van Meir 2003). A maior parte da FIP geralmente apresenta menos de 1% da atividade enzimática normal, enquanto a subforma juvenil apresenta 10% e a subforma adulta, menos de 40%.

2.5. Genótipo e quantidade residual de GAA

Atividade residual e funcional da enzima: Os genótipos GAA na maioria dos pacientes de GSDII compõem-se de dois diferentes alelos mutantes, e a combinação dos alelos mutantes conduz a diferentes estados funcionais de GAA. O fenótipo será grave a moderado dependendo do nível da atividade residual do GAA. A análise destas mutações permite a correlação do genótipo de um dado paciente com seu fenótipo bioquímico e clínico (Hermans 1993, Pipo 2003, Pittis 2003, Montalvo 2004). A maioria dos pacientes de início infantil tem as mutações que resultam em marcada diminuição ou ausência da atividade da enzima. Estas mutações da FIP, na grande maioria do tipo *nonsense*, com presença de parada prematura da leitura para síntese da proteína determinam a síntese de enzima instável, cineticamente defeituosa, truncada ou mRNAs instáveis de GAA. Por outro lado, as mutações associadas às formas juvenil e adulto têm pelo menos um alelo que codifica uma proteína mutante GAA com atividade residual. Muitos pacientes adultos apresentam a mutação freqüente de IVS1-13 T>G, uma mutação fraca no sítio de *splice*, em combinação com um alelo nulo não funcional, resultando na síntese de proteína normal, mas em quantidade marcadamente reduzida. A enzima normal de GAA não foi cristalizada, não havendo informações sobre a estrutura 3D da enzima até o momento, que quando disponível, será útil na compreensão dos relacionamentos de estrutura/função e melhores correlações de genótipo/fenótipo.

2.6. Estudo da autofagia em modelo animal

O principal avanço na doença de Pompe foi o desenvolvimento da terapia de reposição enzimática (TRE), que se tornou recentemente disponível para os pacientes. Os resultados dos estudos clínicos e pré-clínicos indicam que a retirada eficaz do glicogênio

do músculo esquelético parece ser mais difícil do que o previsto, em vista da variabilidade da resposta à TRE. A irreversibilidade da destruição e a resistência do músculo esquelético à TRE permanecem problemas não resolvidos.

Observa-se na doença de Pompe o excessivo acúmulo de substrato, glicogênio, pela deficiência da enzima GAA, responsável pela sua clivagem. Esta destruição é máxima nos casos FIP e variável de acordo com a quantidade e preservação funcional da enzima residual nos casos de FIT.

A autofagia é um processo lisossomal evolutivamente conservado relacionado à degradação citoplasmática. O processo normalmente ocorre no nível basal na maioria dos tecidos, sendo seu papel principal a reciclagem dos componentes citoplasmáticos para manutenção do equilíbrio entre a biogênese das estruturas celulares e sua degradação. Sob circunstâncias de privação e outras formas de estresse, a atividade autofágica é aumentada como um mecanismo crítico de sobrevivência (Raben 2007).

Três formas de autofagia são conhecidas: autofagia mediada por *chaperone* (proteína auxiliar), microautofagia e macroautofagia. O evento central em macrofagia é a formação e alongamento da membrana celular que seqüestram uma região do citoplasma e organelas danificadas, como as mitocôndrias, dentro de um vacúolo limitado por dupla membrana, os autofagossomos, que fundem com os lisossomos resultando em distribuição, degradação e reciclagem de componentes seqüestrados (Raben 2007).

Na doença de Pompe, a excessiva autofagia pode ser um fator determinante da miopatia, como mostrado por Raben *et al.* (2007), em modelo animal de ratos *knockout* (KO).

Os estudos nos mioblastos desses ratos KO com deficiência completa de GAA mostraram uma expansão dramática das vesículas nas vias endocítico/autofágico, com movimento vesicular diminuído nas células abarrotadas de glicogênio, e com defeito na acidificação dos endossomos/lisossomos. A análise pela microscopia confocal de fibras únicas isoladas de músculo esquelético demonstrou que as consequências do acúmulo de

glicogênio lisossomal são marcadamente diferentes no tipo I e II das fibras musculares. Somente o tipo II apresentou maior resistência à terapia, contendo grandes regiões de acúmulo autofágico que se estendem por todo o comprimento das fibras, às vezes com ramificações ou interrupções, e que persistem após meses de TRE (Raben 2003 e 2005).

Para avaliar o papel da autofagia na patogênese da doença humana, a mesma análise foi realizada em miofibrilas humanas extraídas de biópsias musculares de pacientes com doença de Pompe, que mostraram uma formação abundante de autofagossomos e áreas de acúmulo autofágico em uma ampla variação de tamanhos (Raben 2007).

Tanto em pacientes, como em modelo animal, observou-se a inabilidade das vesículas em fundir e descarregar seu conteúdo nos lisossomos. Isto levou ao acúmulo autofágico contínuo e a profunda desorganização da estrutura do microtúbulo com perpetuação do processo autofágico, causando grande dano ao músculo esquelético. Houve acúmulo de glicogênio fora dos lisossomos das regiões autofágicas o que impediu o tráfico eficiente da reposição enzimática aos lisossomos.

Estes resultados podem explicar porque a TRE está sendo insuficiente para reverter o processo da doença em alguns casos. Conseqüentemente, a abordagem para resolução do processo autofágico parece ser de importância para o sucesso da TRE na doença de Pompe. Desta forma, a análise da distribuição de fibras tipo I e II no músculo esquelético de paciente com doença de Pompe poderá predizer o tipo de resposta à TRE.

O presente estudo tem, portanto, como objetivo analisar a correlação da distribuição do tipo de fibras com a forma de apresentação clínica da doença de Pompe, seu genótipo correspondente e a quantidade residual da enzima GAA.

3. OBJETIVOS

Estudo de casos com doença de Pompe, objetivando:

1. Correlacionar os achados morfológicos e histoquímicos da biópsia muscular com a forma da apresentação clínica.
2. Analisar a distribuição do tipo de fibras de contração rápida e lenta em biópsia muscular.
3. Correlacionar a distribuição do tipo de fibras musculares com o polimorfismo do gene ACE.
4. Analisar a densidade capilar nos músculos das formas de início-precoc e início-tardio.
5. Correlacionar a quantidade de enzima residual com a forma de apresentação clínica.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. Casuística

Foram analisados pacientes submetidos a biópsia muscular e com diagnóstico de doença de Pompe na forma início-precoces e de início-tardio, acompanhados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), Departamento de Neurologia, Grupo de Miopatias.

As amostras foram coletadas no período de julho de 1993 à janeiro de 2008. A partir do banco de amostras, foram selecionados para este estudo três grupos: A) pacientes com glicogenose tipo II, diagnosticados histopatologicamente pelo Grupo de Miopatias; B) grupo controle, ou seja, sem alterações musculares aparentes e C) portadores da doença, familiar de paciente com a doença de Pompe, apresentando mutação em apenas um alelo.

Desenho do projeto:

4.1.1. Casos

Os pacientes foram selecionados segundo dados clínicos e laboratoriais. A confirmação do diagnóstico foi feita através da medida da atividade residual de GAA em papel filtro, da presença de miopatia vacuolar com depósitos intracelulares de grânulos PAS positivos e atividade à reação pela fosfatase ácida em biópsia do músculo esquelético e pela presença de mutação no gene GAA.

A casuística consiste: grupo A (casos) de 19 pacientes com GDSII divididos em: 10 FIP e 09 FIT (05 juvenil e 04 adulto), conforme a Tabela 6. Dados adicionais dos casos estão apresentados no Anexo I.

Tabela 6: Distribuição dos casos quanto ao gênero, a idade e a forma clínica da doença.

		Caso	Gênero		Idade		
		Nº	Feminino	Masculino	Mínima	Máxima	Média
Início Precoce	Infantil	10	4	6	1m	1 a 5m	6m
	Juvenil	5	2	3	10a	48a 10m	28a 10m
Início Tardio	Adulto	4	1	3	33a 4m	54a 5m	44a 8m
	Total	19	7	12			

4.1.2. Controle

O grupo B (controle) de 19 indivíduos com biópsia muscular dentro dos padrões de normalidade, pareados por idade e gênero (Tabela 7). Dados adicionais dos controles estão apresentados no Anexo II.

Tabela 7: Distribuição dos controles quanto ao gênero e a idade.

CTO	Gênero		Idade		
	Feminino	Masculino	Mínima	Máxima	Média
10	4	6	1m	2a 11m	1a 5m
5	2	3	11a 10m	36a 7m	25a 3m
4	1	3	40a 1m	49a 4m	44a 4m
19	7	12			

4.1.3. Portadores

O grupo C (portadores) de 04 indivíduos com biópsia muscular (Tabela 8). Dados adicionais dos portadores estão apresentados no Anexo III.

Tabela 8: Distribuição dos portadores quanto ao gênero e a idade.

Portador	Gênero		Idade		
	Feminino	Masculino	Mínima	Máxima	Média
4	1	3	20a 9m	47a 5m	39a 5m

4.1.4. Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Protocolo de Pesquisa 1056/05 - Anexo IV). Todos os pacientes foram informados da natureza do projeto de pesquisa e assinaram um

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Este termo foi preenchido pela pessoa envolvida no projeto e teve por meta esclarecer sobre os objetivos da pesquisa, sanar possíveis dúvidas sobre os procedimentos e ainda informar sobre a finalidade da coleta do material biológico. O termo de consentimento utilizado no projeto de pesquisa está apresentado no Anexo V.

Os tecidos considerados normais utilizados como controles normais foram colhidos com o mesmo rigor das amostras de pacientes com glicogenose tipo II que também assinaram o TCLE.

4.2. Métodos

4.2.1. Biópsia Muscular

Este procedimento foi realizado para diagnóstico, sob consentimento informado do paciente e do responsável quando necessário (Anexo V), no músculo bíceps braquial em 19 casos, em condições assépticas e sob anestesia local com Xylocaína 2%, sem vasoconstritor. Utilizou-se a técnica cirúrgica de biópsia em “céu aberto”, na qual, retirou-se em média dois fragmentos musculares longitudinais com aproximadamente 0,3 x 0,5 cm, transportados do centro cirúrgico ao laboratório de processamento em gaze levemente umedecida com solução fisiológica 0,9%.

O processo de congelação muscular foi realizado com o posicionamento do fragmento muscular, para obtenção de cortes transversais ao maior eixo das fibras musculares, congelados em nitrogênio líquido (-190°C), sendo guardados em eppendorfs devidamente identificados e em tambores de nitrogênio líquido. Os cortes histológicos sequenciais foram obtidos em criostato a uma temperatura de - 25°C com uma espessura de 6µm, fixados em lâminas previamente preparadas com polisina e armazenados em freezer com a temperatura de - 70°C até o uso.

4.2.2. Técnicas de Tipagem das Fibras

A tipagem das fibras foi realizada através de métodos histológicos, histoquímicos e imunoistoquímicos (Dubowitz, 1985).

Métodos Histológicos

O estudo histopatológico foi obtido através das seguintes colorações histológicas de rotina: Hematoxilina-eosina (H&E), Ácido periódico de Schiff (PAS), Tricrômio de Gomori modificado (Gomori). Através dessas técnicas podemos identificar a morfologia das fibras musculares e elementos não-contráteis como, tecido adiposo, tecido conjuntivo, nervos, vasos sanguíneos, núcleo e estruturas anormais nas fibras musculares (Dubowitz, 1985).

H&E é uma técnica de coloração histológica utilizada para avaliar o padrão geral das fibras musculares, tanto a organização básica do tecido, quanto as estruturas celulares. A coloração por HE mostra as fibras musculares em rosa, o tecido conjuntivo em rosa claro e o núcleo em azul (Dubowitz, 1985).

No PAS podemos identificar o glicogênio e as moléculas que contêm carboidrato corados positivamente, além de observar o padrão da rede intermiofibrilar. A reação PAS cora em rosa mais fortemente as fibras tipo II que as tipo I (Dubowitz, 1985).

No Tricrômio de Gomori modificado, observamos as fibras musculares em azul esverdeada, o colágeno um pouco mais claro e o núcleo em violáceo. A mielina do nervo em tons de vermelho e os axônios azulados. A rede miofibrilar distingue-se pela coloração vermelho escuro (Dubowitz, 1985).

Métodos Histoquímicos

Os métodos histoquímicos demonstram os tipos de fibras específicas, com reações de enzimas e a partir disto, mostram as alterações específicas nas doenças musculares. Podem também mostrar tanto a ausência de uma enzima, quanto ao excesso de um certo substrato, além de mudanças estruturais no músculo que não são visualizadas em uma reação histológica de rotina (Dubowitz, 1985).

As enzimas de interesse no estudo dos músculos têm sido aquelas relacionadas ao consumo e síntese de glicogênio, tais como: as fosforilases; a oxirredutase, incluindo várias dehidrogenases ligadas com o ciclo de Krebs; e a hidrólise, tais como a ATPase e várias esterases (Dubowitz, 1985).

A fosfatase ácida (F. ác.) está localizada principalmente nos lisossomos e pode assim ser usada para indicar focos de degeneração e necrose dentro das fibras musculares. Geralmente não é aparente em fibras normais, mas cora intensamente em doenças de depósito lisossomal, tais como a glicogenose tipo II, e em macrófagos ativados com relação às fibras necróticas (Dubowitz, 1985).

A fosfatase alcalina (F. alc.) é encontrada primeiramente nas membranas celulares onde os processos de transporte ativo ocorrem, como o endotélio das arteríolas e a parte arterial dos capilares, e igualmente encontrada no retículo endoplasmático, no Complexo de Golgi e nas vesículas pinocitóticas. A reação é geralmente negativa em fibras musculares, mas pode ser positiva em fibras necróticas focais em várias situações da doença (Dubowitz, 1985).

Estas reações foram realizadas por ocasião do diagnóstico, permitindo analisar a variação do calibre das fibras musculares e afastar alterações distróficas, inflamatórias, degenerativas e estruturais.

Estudo Imunoistoquímico

O estudo imunoistoquímico das fibras musculares foi realizado por método de imunoperoxidase StreptABComplex/ HRP, em 19 casos, através da utilização de anticorpos comerciais primários específicos para cada proteína do estudo.

A titulação para cada anticorpo foi determinada pela experimentação de várias diluições realizadas em músculos normais. As reações de imunoperoxidase foram feitas nos músculos dos pacientes deste estudo e nos casos controles normais pareados pela idade e sexo, foram sempre associados com um músculo normal para controle da reação.

As proteínas miosina e ulex foram estudadas por anticorpos comerciais e titulados como descreve a tabela a seguir.

Tabela 9: Anticorpos Monoclonais comerciais de miosina e ulex e as diluições utilizadas

Anticorpo monoclonal	Clone	Laboratório	Diluição
Proteínas filamento grosso			
- <i>anti-miosina rápida</i>	WB-MHCf	Novocastra	1:40
- <i>anti-miosina lenta</i>	WB-MHCs	Novocastra	1:80
Densidade capilar			
- <i>Ulex europaeus agglutinin I</i>		Vector	1:800

A técnica de imunoperoxidase StreptABComplex/ HRP foi realizada em material de biópsia muscular congelado segundo o protocolo a seguir:

1. Colocar as lâminas para fixação em acetona gelada por 10 minutos, seguida de lavagem com água corrente e água miliQ;
2. Realizar o bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada a 3% (10 volumes) ou água oxigenada a 6% (20 volumes), diluída volume a volume em metanol, em três banhos de 10 minutos;

3. Lavar em água corrente por 5 minutos, em seguida com água miliQ e após isso, mergulhar as lâminas em tampão PBS;
4. Incubar com anticorpo primário (específico para o antígeno), diluído em solução de albumina 1% e azida sódica 0,1% em PBS, em câmara úmida, por 30 minutos a 37°C e 18 horas (overnight) a 4 °C;
5. Lavar 3x durante 5 minutos em tampão PBS;
6. Incubar com anticorpo secundário (específico para a espécie animal em que foi produzido o anticorpo primário), em câmara úmida por 30 minutos a 37°C. Na reação com Complexo Avidina-biotina-peroxidase (ABS), o anticorpo secundário deve estar biotilado;
7. Lavar 3x durante 5 minutos em tampão PBS;
8. Incubar com Complexo ABS, em câmara úmida, por 30 minutos a 37°C.
9. Lavar 3x durante 5 minutos em tampão PBS;
10. Revelar com substrato cromogênico: diaminobenzidina 60mg em PBS + 1ml de dimetilsulfóxido + 1ml de água oxigenada 20 volumes, aguardando por 5 minutos, a 37°C;
11. Lavar em água corrente e água MiliQ;
12. Realizar contracoloração (leve) em Hematoxilina (de Harrys ou Mayer) durante 1 minuto;
13. Lavar em água corrente, em seguida em hidróxido de amônia;
14. Lavar em água corrente novamente e em seguida em água MiliQ;
15. Desidratar os cortes em: álcool 50%, álcool 80%, álcool 95%, álcool absoluto e xilol, montando as lâminas com Enterllan.

Análise Imunoistoquímica

Para a análise da expressão das isoformas de miosina e ulex foram contadas todas as fibras e capilares com marcação positiva na preparação imunoistoquímica, sendo utilizado um programa de computação (CELL), desenvolvido neste laboratório, especificamente para estudos morfométricos celulares.

O programa “CELL” foi desenvolvido pela MEVIS Consultoria de Informática Médica, São Paulo, Brasil, com o objetivo de automatizar o processamento quantitativo e morfométrico de fibras musculares, partindo de imagens obtidas diretamente do microscópio óptico com uma câmera digital (Nikon-Eclipse E800).

O “CELL” permitiu organizar as imagens em estudos, visualizá-las, calibrá-las e realizar a identificação e contagem de até três tipos de células diferentes num mesmo estudo, de forma automática ou semi-automática. As imagens foram processadas nos formatos .tif e .jpg.

O programa “CELL” foi desenvolvido adaptado para PC, com Windows 95/98, com processador Intel Pentium II, 64 Mbytes de RAM e placa de vídeo SVGA 1280x1024 True Color.

4.2.3. Estudo Morfométrico

Histograma da distribuição do tipo de fibras musculares

Este estudo foi realizado através da contagem das fibras musculares de cada paciente pela reação de imunoistoquímica para miosina lenta (tipo I), miosina rápida (tipo II) e ulex, com aumento de 200X, em todo o campo do corte transversal da biópsia muscular. A análise foi realizada por dois observadores (TG e EMM), sendo a diferença entre observadores menor que 10%.

O cálculo da proporção das fibras tipo I (lenta) ou tipo II (rápida) em relação ao número total de fibras (em média 600 fibras) foi obtido através da seguinte fórmula:

$$\text{Proporção (\%)} = \frac{\text{nº de fibras tipo I ou tipo II}}{\text{nº total de fibras contadas}}$$

O cálculo da densidade capilar (ulex) em relação ao número total de fibras (em média 600 fibras), foi obtido através da seguinte fórmula:

$$\text{Proporção (\%)} = \frac{\text{nº de capilares}}{\text{nº total de fibras contadas}}$$

Considerou-se a relação da média dos controles pareados por idade e gênero.

4.2.4. Genotipagem

A genotipagem do GAA foi realizada pelo Laboratório de Investigações em Neurologia (LIM-15) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), como previamente descrito (Oba-Shinjo, 2008) (Anexo VI).

4.2.5. Gene ACE (Enzima Conversora da Angiotensina)

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foram utilizadas amostras de DNA extraídas de leucócitos de sangue periférico e músculo, sendo aliquotadas em concentrações de 50 a 100 ng/μL de pacientes, controles e portadores.

Os parâmetros de amplificação das regiões estudadas, a sequência do *primer* e o tamanho do produto de PCR estão descritos abaixo:

Tabela 10: Sequência dos *primers* e tamanho do produto de PCR.

Gene	Intron 16	Sequência do gene ACE	Fragmento	Genótipo
ACE	Foward (sense) ^A	F: 5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3'	490 pb	I
	Reverse (antisense) ^A	R: 5'-GATGTCGCCATCACATTCGTCAGAT-3'	190 pb	D
DD→DI	Foward (sense) ^B	F: 5'-TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC-3'	335 pb	I
	Reverse (antisense) ^B	R: 5'-TCGCCAGCCCTCCCATGCCCATAA-3'		

A: Lin, 2001

B: Lindpaintner, 1995

As reações de PCR para o intron 16 do gene ACE foram realizadas utilizando-se em torno de 100ng de DNA em tampão Tris-HCl 10mM (pH 9,0), KCl 50mM, contendo 50mM de MgCl₂, 10mM de cada dNTP (Amersham), 10μM de cada *primer* e 0,2μL de enzima Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen) em um volume final de 20μL.

As reações de PCR foram realizadas no termociclador com sistema Peltier (PTC – 200, “MJ Research Peltier Thermal Cycler”, Watertown, EUA) e consistiram de uma denaturação inicial de 94°C durante 3 min., seguida por 35 ciclos de denaturação por 30 seg. a 94°C, anelamento de 30 seg. a uma temperatura de 58°C e uma extensão por 1 min. a 72°C. Por fim, foi realizada uma extensão final por 7 min. a 72°C. A reação foi mantida a 4°C até sua análise por eletroforese em gel de agarose 2%.

Os produtos de PCR foram analisados quanto às eficiências das reações e aos tamanhos dos produtos esperados por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TAE (Tris-acetato EDTA) e visualizados após coloração com brometo de etídio, luz UV (ultra-violeta) e respectiva captação de imagem em Image Master® (GE Healthcare). O padrão de tamanho molecular utilizado foi de 100 pb (Invitrogen). A Figura 05 mostra a análise dos produtos de PCR.

Figura 5a: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR

Produtos de amplificação do alelo de inserção do gene ACE correspondente a um tamanho de fragmento de 490pb (**I**), alelo de deleção do mesmo gene com um fragmento de 190pb (**D**). Foi utilizado o marcador de tamanho molecular de 100pb (M).

Os produtos de PCR apresentam 490pb (alelo de inserção) ou 190pb (alelo de deleção). O alelo D é amplificado nos heterozigotos causando um erro de ID como DD em aproximadamente 5% dos casos (Lin *et al.* 2001). Para evitar esse erro, as amostras com genótipo DD foram amplificadas por um segundo PCR independente com *primers* que reconhecem uma seqüência de inserção-específica. A reação de PCR rende um produto de DNA de 335pb na presença do alelo I (Lindpaintner *et al.* 1995).

Para isso, o mesmo protocolo do 1º PCR foi utilizado, modificando-se apenas a temperatura de anelamento para 67°C.

Figura 5b: Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR

Produto de amplificação de 335pb na presença do alelo I.

4.2.6. Estudo da proteína GAA

Extração de proteínas e Curva de Bradford

Foram feitos extratos de proteína, a partir de cultura de fibroblastos ou de 40 cortes de músculo bíceps (20 µm) em criostato e colocados numa solução para lise de proteínas adicionando um coquetel inibidor de protease (PIC). Em seguida, tudo foi homogeneizado várias vezes com a pipeta, aguardando durante 15 min. num agitador, em gelo. A amostra foi homogeneizada novamente e depois centrifugada a 4°C numa velocidade >10.000 rpm durante 12 min. e o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um outro tubo.

Para realizar a curva de Bradford, todas as amostras foram diluídas 1:10 e o reagente Bradford Mini Protean® 3 System (Bio-Rad) diluído 1:5. Foi realizada também uma diluição seriada de Soro Albumina-Bovina (BSA) a 1mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml e 0,125 mg/ml. Em seguida, uma placa de PCR foi utilizada para colocar, em duplicata, 3µl da diluição 1:10 das amostras com 200µl da diluição Bradford. O mesmo foi feito para a diluição seriada de BSA. Tudo foi homogeneizado e 100µl de todas as amostras foram colocadas em uma placa de Elisa, aguardando 15 minutos para a realização da leitura no aparelho leitor de Elisa (MultiskanEX Labsystems, Uniscience) utilizando o programa Genesis, com filtro no comprimento de onda 595. O cálculo da quantidade de proteína e a correlação com a curva de Bradford (entre 0.98 – 1.00) foi avaliada segundo o programa Origin 5.0 utilizando-se a fórmula: $Y = A + B * X$, sendo Y: concentração média da proteína menos o branco, A e B: parâmetros fornecidos da regressão linear e X: proteína em µg/µl.

Linear Regression for Data1_DO:

$$Y = A + B * X$$

Parameter	Value	Error	
A	0.02137	0.01029	
B	0.28273	0.01673	
<hr/>			
R	SD	N	P
0.99479	0.01198	5	4.51E-04

Figura 6. Fórmula para cálculo da quantidade de proteína e correlação com a curva de Bradford.

Metodologia do Western Blotting (WB)

Foi realizada a eletroforese com um gel 10% e sobre este um gel 4% (para facilitar o “empacotamento” das proteínas) com tampão de corrida SDS/Page1x.

Foram utilizadas amostras, com massa de 25µg, que foram fervidas por 5 minutos em banho maria para dissolução e denaturação das proteínas com quebra das pontes de sulfeto.

Foram aplicadas um total de 40µl das amostras e 10µl do BenchMark™ Protein Ladder 220Kda, marcador de peso molecular da proteína (Invitrogen). A corrida foi realizada inicialmente a 30mA até o empilhamento e em seguida, a 50mA até o final da corrida.

A transferência foi realizada em membrana de nitrocelulose com o tampão de transferência SDS 1x + metanol, em corrida a 150 mA por no mínimo 3 horas.

A eficiência da transferência foi analisada em coloração ponceau da membrana, seguida de bloqueio dos sítios inespecíficos da proteína em leite desnatado 5%.

O anticorpo primário Mouse anti-GAA IgG Monoclonal 15362-157, cedido pela empresa Genzyme (1:200) em leite 1%, foi incubado por 1 hora. Após lavagem em tampão T-TBS 6x por 5 minutos cada, a membrana foi incubada no anticorpo secundário anti-anticorpo IgG de *camundongos* conjugado com peroxidase 14673-181, da Genzyme (1:10.000) em leite 1%, por 1 hora, no agitador (REV/MIN=20). A lavagem com tampão T-TBS foi repetida 10x por 5 minutos cada e 2x com tampão TBS 1x.

A revelação foi feita com reagente Western Lightning Chemiluminescence Plus (PerkinElmer™) ou ECL™ Western Blotting Analysis System (Amersham Biosciences) com exposição de 15 minutos.

Figura 7. Bandas da proteína GAA no Western blotting (110kDa - forma precursora, 95kDa - forma intermediária e 76/70kDa – forma ativa da proteína).

4.2.7. Análise Estatística

A metodologia estatística (ANEXO VII) utilizada na análise dos dados foi:

As variáveis qualitativas foram representadas por frequência absoluta (n) e relativa (%) e as quantitativas por média, desvio padrão (dp), mediana, valores mínimo e máximo.

A presença de distribuição normal nas variáveis dentro de cada grupo de estudo foi avaliada pelo Teste de *Kolmogorov-Smirnov*.

Foi aplicado o teste *t* de *Student* para amostras independentes, na comparação entre os grupos Pompe e seus respectivos controles, quanto às médias das variáveis.

Foi utilizado o teste *t* de *Student* para amostras pareadas na avaliação da diferença entre a % de fibras rápidas e a % de fibras lentas.

Nas amostras feminina e masculina, a normalidade dos dados não foi testada devido ao pequeno número de casos. As análises comparativas foram semelhantes às aplicadas na amostra total.

Adotou-se o nível de significância de 0,05 ($\alpha = 5\%$) de níveis descritivos (p), sendo considerados estatisticamente significantes, quando $p < 0,05$, e representados por * (intervalo de confiança 95%).

5.1. População de estudo

A amostra do estudo consiste em 19 pacientes com GDSII, divididos em: 10 da forma início-precoces (FIP) e 09 da forma início-tardio (FIT) - 05 da forma juvenil e 04 da forma adulta, pareados por idade e gênero com 19 indivíduos controles e 04 portadores (Tabela 11).

Tabela 11. Casuística do estudo com a respectiva idade de início dos sintomas, ao diagnóstico e à biópsia.

Casuística					
	Caso	Gênero	Idade		
			início sintomas	ao diagnóstico	à biópsia
Início-precoces	1	F	Ao nascimento	1m	1m
	2	F	2m	3m 15d	7m
	3	F	Ao nascimento	6m	1a 5m
	4	F	Ao nascimento	4m	4m
	5	M	Ao nascimento	7m	7m
	6	M	Ao nascimento	4m	4m
	7	M	Ao nascimento	1a	10m
	8	M	Ao nascimento	8m	7m
	9	M	Ao nascimento	9m	4m
	10	M	Ao nascimento	7m	7m
Início-tardio	11	F	2a	10a	10a
	12	F	10a	36a	36a 2m
	12A*	F			48a 10m
	13	M	8a	23a	19a 7m
	13A*	M			24a 2m
	14	M	10a	24a	23a 3m
	14A*	M			23a 11m
	15	M	10a	33a	33a 6m
	15A*	M			40a 1m
	16	F	28a	41a	41a 2m
	17	M	27a	33a	33a 4m
	18	M	31a	40a	42a 1m
	19	M	35a	51a	45a 9m
	19A*	M			51a 7m
	19B**	M			54a 5m
Portador	20	F	-----	-----	45a
	21	M	-----	-----	20a 9m
	22	M	-----	-----	44a 6m
	23	M	-----	-----	47a 5m

* (2ª biópsia) e ** (3ª biópsia)

A idade ao diagnóstico da doença variou de 1m a 1a (na FIP), de 10a - 36a (na forma juvenil) e de 33a - 51a (na forma adulta).

E a idade à biópsia variou de 1m -1a 5m (na FIP). Observou-se grande variação no tempo de doença na FIT até a ocasião da realização da biópsia muscular: de 10a – 48a 10m (na forma juvenil) e de 33a 4m- 54a 5m (na forma adulta).

Os achados clínicos foram obtidos a partir de levantamentos de dados retrospectivos e prospectivos dos pacientes, com base nos aspectos clínicos relevantes da patologia em estudo (Tabela 12).

Foram identificadas duas famílias em 19 casos estudados, que apresentavam mais de um indivíduo acometido (família A – Figura 8, n=3; família B – Figura 9, n=2).

Família A

Figura 08. Heredograma da família A.

Família B

Figura 09. Heredograma da família B.

Fig. 8 e Fig. 9: Foram incluídos os casos 12, 13 e 15 e portador 21 e 23 da família A, e casos 16 e 19 e portador 22 da família B no presente estudo. Estão indicadas as idades de todos os membros das famílias por ocasião do estabelecimento do diagnóstico do afetado (a = anos e m = meses) e a genotipagem dos casos e dos portadores.

5.2. Análise dos dados clínicos

Clinicamente, a presença de hipotonia muscular foi observada em todos os casos FIP e de fraqueza muscular em 05 casos FIT, sendo de intensidade leve (+) em membros superiores (MMSS) e moderada (++) em membros inferiores (MMII).

Observou-se grande variabilidade da fraqueza muscular entre os pacientes, sendo de distribuição assimétrica.

Três pacientes (casos 13, 18 e 19) queixaram-se apenas de fadiga muscular, devido às atividades físicas, principalmente relacionadas ao trabalho, embora isto não tivesse conferido incapacidade à execução dos movimentos. Já os outros pacientes apresentaram limitações em suas atividades diárias, como subir e descer escadas, fazer caminhadas, levantar da cama ou até mesmo atividades de trabalho, tendo que parar por uns 30 minutos para recomeçar as atividades novamente.

A insuficiência respiratória esteve presente em todos os pacientes da FIP. Dos 10 casos FIP, 08 faleceram por insuficiência cardíaca e/ou respiratória e apenas os casos 2 e 5 continuam vivos.

Em apenas 02 casos da FIT (casos 11 e 14) a dificuldade respiratória esteve presente, sendo que os outros 07 casos da FIT, não se queixaram de dificuldade respiratória.

Observou-se fraqueza muscular de intensidade grave, tanto em MMSS, quanto em MMII no caso 11 (forma juvenil), estando a paciente restrita à cadeira de rodas. Esta paciente estava em uso contínuo de BIPAP, com alimentação por SNE (sonda naso-enteral) e sem condições de realizar as atividades diárias básicas.

Observou-se manifestações clássicas da FIT, como: fraqueza muscular de intensidade leve em MMSS e moderada em MMII, marcha instável na ponta dos pés, sinal de Gower, queixa de dores na parte lombar inferior, apnéia do sono e uso de BIPAP ao dormir, no caso 14 (juvenil), como também uso ocasional de cadeira de rodas para longas distâncias.

5.3. Análise da genotipagem

A genotipagem foi realizada em 19 casos de doença de Pompe e 04 portadores, pelo Laboratório de Biologia Molecular e Celular – LIM15, e estão detalhados no ANEXO VI.

As mutações do tipo *nonsense* (troca de base gerando códon de parada prematura) foram encontradas com maior frequência nos casos da FIP e as mutações do tipo *missense* (troca de base com troca de aminoácido) foram encontradas em maior número de casos na FIT.

Os cinco dos 10 casos da FIP apresentaram o genótipo em homozigose (quando os 2 alelos apresentam a mesma mutação) e todos os casos da FIT apresentaram genótipo em heterozigose (quando apresentam mutações diferentes em cada alelo).

As mutações mais encontradas na FIP foram localizadas no exon 14 (*missense*) e no exon 18 (*nonsense*), já na FIT foram as mutações intrônicas (c.-32-13 T>G e c.-32-3C>A) foram as mais frequentes seguida de mutações localizadas no exon 14.

Todos os indivíduos de ambas as famílias apresentaram a mutação intrônica c.-32-13T>G (IVS1). Além desta mutação, os três membros da família A, acometidos em idade juvenil (início dos sintomas 8a, 10a e 10a), apresentaram a mutação c.1927G>A, enquanto que os dois membros da família B, acometidos em idade adulta (início dos sintomas 28a e 35a), apresentaram c.2560C>T como segunda mutação.

Já o grupo de portadores apresentou apenas um alelo mutado e não apresentaram sintomas da doença.

Foram encontradas as seguintes mutações: 10 *missense* (2 mutações novas), 3 *nonsense*, 3 rearranjo e 2 *splice* nos 38 alelos estudados (Tabela 13).

Tabela 13. Mutações encontradas nos 19 pacientes estudados com doença de Pompe.

Mutações encontradas da Doença de Pompe				
	<i>missense</i>	<i>nonsense</i>	<i>rearranjo</i>	<i>splice</i>
Início-precoces	c.1912G>T (1)*	c.2608C>T (2)	c.236_246del (1)	
	c.1561G>C (1)	c.2560C>T (2)	c.2481+102_2646+31del (2)	
	c.1941C>G (1)	c.377G>A (1)	c.2501-2502delCA (1)	
	c.1913G>T (1)			
	c.784G>A (1)			
	c.1655T>C (1)			
	c.1905C>A (4)			
	c.1927G>A (1)			
Início-tardio	c.1655T>C (1)	c.377G>A (1)		c.-32-13T>G (5)
	c.1927G>A (3)	c.2560C>T (2)		c.-32-3C>A (1)
	c.1447G>A (1)			
	c.1941C>G (2)			
	c.1781G>C (2)			
Portador	c.1447G>A (1)			c.-32-13T>G (2)
	c.1927G>A (1)			
Total	10 (2 novas)	3	3	2

*Localização da mutação (número de alelos com a mutação).

5.4. Análise dos achados de biópsia muscular

5.4.1. Estudo histológico e histoquímico

A biópsia muscular foi realizada, pelo Grupo de Miopatias do Laboratório de Biologia Molecular e Celular – LIM15, em todos os pacientes por ocasião da investigação diagnóstica e os achados estão dispostos na Tabela 14.

Forma de início-precoc (FIP)

Observou-se a variação do calibre das fibras musculares, presença de miopatia vacuolar com grânulos PAS positivos na maioria das fibras (> 95%) e intensa atividade lisossomal à reação pela fosfatase ácida (Figura 10). Estes achados contrastam-se com o aspecto do músculo esquelético normal na mesma faixa etária (Figura 11).

A presença da completa distorção da citoarquitetura das fibras, dificultou a análise nas demais reações oxidativas e na distribuição dos tipos de fibras às reações pelas ATPases. Somente no caso 5, observa-se uma preservação maior da citoarquitetura das fibras, com presença de vacúolos em 89% das fibras (Tabela 14 e Figura 12).

Forma de início-tardio (FIT)

Na FIT, a arquitetura das fibras apresentaram-se mais preservadas e a porcentagem de fibras vacuoladas entre os casos foi variável (0-88%) (Figuras 13, 14, 16, 17 e 18).

Observou-se presença de aumento da atividade lisossomal à reação pela fosfatase ácida, caracterizada pelo aumento do pontilhado avermelhado no citoplasma das fibras musculares (Figuras 15, 19, 20 e 21). Similarmente, estes achados contrastaram-se com o aspecto do músculo esquelético normal da faixa etária adulta (Figura 22).

A biópsia serial foi realizada nos casos 12, 13, 14, 15 e 19, em que o diagnóstico não foi esclarecido na primeira biópsia.

O caso 19 foi biopsiado três vezes, pois no diagnóstico sugerido após a primeira biópsia foi de miopatia inflamatória tipo polimiosite e o paciente foi tratado com esquema de imunossupressão. Como não apresentou melhora ao tratamento foi submetido à segunda biópsia que também não esclareceu o diagnóstico, que só foi esclarecido através dos achados à biópsia de sua irmã, caso 16. A terceira biópsia foi realizada como parâmetro basal antes do início do protocolo de tratamento com reposição enzimática.

A variação no intervalo de tempo entre as biópsias seqüenciais foi detalhado na Tabela 15, a seguir.

Tabela 15. Idade dos pacientes na realização de biópsias seqüenciais.

Casos	1ª biópsia	2ª biópsia	3ª biópsia	Δt entre as biópsias
12	36 a 2m	48a 10m	-----	13a
13	19a 7m	24a 2m	-----	5a
14	23a 3m	23a 11m	-----	8m
15	33a 6m	40a 1m	-----	7a
19	45a 9m	51a 7m	54a 5m	6a / 3a

Os aspectos progressivos da doença quanto à patologia muscular esquelética está ilustrado pelo caso 15 (Figura 23), onde se observa inequivocamente o aumento das fibras vacuoladas de 48% para 60% no intervalo de 7 anos entre as duas biópsias.

Figura 23. Primeira e segunda biópsia do caso 15. Observa-se 48% de fibras musculares com vacúolos na primeira biópsia e 60% na segunda biópsia.

5.4.2. Estudo morfométrico

Distribuição do tipo de fibras musculares segundo análise das proteínas constituintes dos filamentos grossos por método imunoistoquímico

Os resultados dos estudos morfométricos estão apresentados na Tabela 16 com dados dos pacientes e na Tabela 17 com dados dos controles normais.

A distribuição do tipo de fibras musculares nos casos da FIP variou de 18% a 47% para fibras tipo I e de 37% a 81% para fibras tipo II.

Nos casos FIP, a média da distribuição do tipo de fibras foi de 37% para tipo I e de 64% para tipo II e o predomínio de fibras tipo II foi estatisticamente significativo ($p=0,001$) dentro deste grupo (Gráfico 1).

A distribuição do tipo de fibras musculares nos casos da FIT variou de 17 a 92% para fibras tipo I e de 21 a 85% para fibras tipo II.

Nos casos FIT, a média da distribuição do tipo de fibras foi de 43% para tipo I e 65% para tipo II e a diferença entre os dois tipos de fibras não foi significativa ($p=0,252$) dentro deste grupo (Gráfico 2).

A distribuição do tipo de fibras musculares no grupo controle da FIP variou de 40 a 58% para fibras tipo I e de 45 a 58% para fibras tipo II e a diferença entre os tipos de fibras não foi significativa ($p=0,183$) neste grupo controle infantil (Gráfico 3).

A distribuição do tipo de fibras musculares no grupo controle da FIT variou de 32 a 55% para fibras tipo I e de 51 a 78% para fibras tipo II, havendo um predomínio de fibras tipo II, estatisticamente significativa ($p=0,001$) neste grupo controle de adultos (Gráfico 4).

Houve um predomínio de fibras tipo II estatisticamente significativa ($p=0,015$) e redução na percentagem de fibras tipo I ($p=0,008$) nos casos FIP em relação ao grupo controle correspondente. A razão entre fibras tipo II e tipo I foi significativamente maior ($p=0,025$) nos casos FIP em relação ao grupo controle (Gráfico 5).

No gráfico de tendência, não se observou diferença estatisticamente significativa na percentagem das fibras tipo I ou II nos casos FIT quando comparados com o grupo controle correspondente (Gráfico 6).

O grupo de portadores apresentou um predomínio de fibras tipo II, estatisticamente significativa ($p=0,035$).

Gráfico 1. Distribuição do tipo de fibras na forma início-precoc (FIP)

Gráfico 2. Distribuição do tipo de fibras na forma início-tardio (FIT)

Gráfico 3. Distribuição do tipo de fibras em controle infantil

Gráfico 4. Distribuição do tipo de fibras em controle juvenil/adulto

Gráfico 5. Gráfico de tendência da distribuição do tipo de fibras em casos e controles da FIP

Gráfico 6. Gráfico de tendência da distribuição do tipo de fibras em casos e controles da FIT

Densidade capilar

Os resultados da capilarização do músculo dos casos encontram-se na Tabela 18 e dos controles na Tabela 19.

A densidade capilar nos casos da FIP variou de 0,28 a 0,78, com média 0,47 capilares/fibra, enquanto que os controles infantis apresentaram densidade capilar variando de 0,12 a 0,31 com média de 0,21 capilares/fibra (Gráficos 7 e 8).

Os casos da FIT apresentaram densidade capilar variando de 0,79 a 2,27, média de 1,56, enquanto os controles correspondentes de 0,6 a 1,35, com média de 1,02 capilares/fibra (Gráficos 9 e 10).

No gráfico de tendência, observou-se aumento da densidade capilar em ambas as formas da doença, sendo significativo quando comparados aos respectivos grupos controles, com $p=0,001$ na FIP e $p=0,034$ na FIT (Gráfico 11).

Tabela 18. Densidade capilar dos 19 casos estudados

Densidade capilar							
			Idade			Ulex	
Caso Gênero			início sintomas	ao diagnóstico	à biópsia	(nºcapilar/fibra)	
Início-precoce	1	F	Ao nascimento	1m	1m	0.28	
	2	F	2m	3m 15d	7m	0.50	
	3	F	Ao nascimento	6m	1a 5m	0.46	
	4	F	Ao nascimento	4m	4m	0.50	
	5	M	Ao nascimento	7m	7m	0.33	
	6	M	Ao nascimento	4m	4m	0.30	
	7	M	Ao nascimento	1a	10m	0.51	
	8	M	Ao nascimento	8m	7m	0.78	
	9	M	Ao nascimento	9m	4m	0.65	
	10	M	Ao nascimento	7m	7m	0.36	
Início-tardio	Juvenil	11	F	2a	10a	10a	0.90
		12	F	10a	36a	36a 2m	1.20
		12A	F			48a 10m	1.50
		13	M	8a	23a	19a 7m	0.79
		13A	M			24a 2m	1.23
		14	M	10a	24a	23a 3m	2.05
		14A	M			23a 11m	1.47
		15	M	10a	33a	33a 6m	0.95
		15A	M			40a 1m	1.30
	Adulto	16	F	28a	41a	41a 2m	2.08
		17	M	27a	33a	33a 4m	1.58
		18	M	31a	40a	42a 1m	2.27
		19	M	35a	51a	45a 9m	2.26
		19A	M			51a 7m	1.79
		19B	M			54a 5m	2.28
Portador	20	F	-----	-----	45a	1.20	
	21	M	-----	-----	20a 9m	0.86	
	22	M	-----	-----	44a 6m	1.33	
	23	M	-----	-----	47a 5m	1.58	

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

M (masculino), F (feminino)

Tabela 19. Densidade capilar dos controles dos 19 casos estudados

Densidade capilar em controles						
			Idade	Ulex		
			Caso Gênero à biópsia (nºcapilar/fibra)			
Controle	Infantil	24	F	2a 11m	0.31	
		25	F	2a	0.20	
		26	F	1a 6m	0.18	
		27	F	2a	0.31	
		28	M	1a 2m	0.22	
		29	M	2m	0.12	
		30	M	2a 1m	0.22	
		31	M	6m	0.19	
		32	M	1a 11m	0.19	média
		33	M			DP
	Juvenil	34	F	11a 10m	0.74	
		35	F	36a 7m	0.60	
		36	M	19a 6m	1.25	
		37	M	24a 1m	0.84	
		38	M	34a 7m	0.90	
	Adulto	39	F	40a 1m	1.35	
		40	M	40a 5m	1.06	
		41	M	49a 4m	1.35	média
		42	M	47a 9m	1.12	DP
	Portador	43	F	42a 10m	1.14	
		44	M	48a 9m	1.09	
					média	
					DP	

Ulex

0.21

0.0612

Ulex

1.02

0.2707

Ulex

1.11

0.0296

M (masculino), F (feminino)

M (masculino), F (feminino)

Gráfico 7. Densidade capilar na forma início-precocce

Gráfico 8. Densidade capilar em controle infantil

Gráfico 9. Densidade capilar na forma início-tardio

Gráfico 10. Densidade capilar em controle juvenil/adulto

Gráfico 11. Gráfico de tendência da densidade capilar em casos e controles da FIP e FIT

5.5. Correlação do polimorfismo do gene ACE com a distribuição do tipo de fibras

Os dados da genotipagem para o polimorfismo do gene ACE correlacionados com os dados da distribuição de fibras podem ser vistos na Tabela 20 com dados dos pacientes e na Tabela 21 com dados dos controles normais.

Tabela 20. Polimorfismo ACE dos pacientes, fenótipo preditivo pela genotipagem do gene ACE, resultado da distribuição de fibras tipo I e II, e a presença ou não da correspondência desta distribuição com o polimorfismo.

Gene ACE								
	Caso	Gênero	Pacientes		Distribuição de Fibras (%)			Compatibilidade genótipo e % fibras
			Genotipagem	Fenótipo	Tipo I	Tipo II	Total	
Início-precoce	1	F	I/I	Lento	42	81	123	N
	2	F	I/I	Lento	43	66	109	N
	3	F	D/D	Rápido	18	73	91	S
	4	F	I/I	Lento	46	52	98	N
	5	M	D/D	Rápido	27	74	101	S
	6	M	I/I	Lento	47	44	91	N
	7	M	I/D	Intermediário	35	62	97	S
	8	M	I/I	Lento	38	57	95	N
	9	M	I/I	Lento	35	71	105	N
	10	M	I/D	Intermediário	41	57	98	S
Início-tardio	11	F	I/I	Lento	43	61	105	N
	12	F	D/D	Rápido	87	60	147	N
	12A				65	42	107	N
	13	M	D/D	Rápido	31	85	116	S
	13A				47	54	102	S
	14	M	I/D	Intermediário	55	54	109	S
	14A				42	63	105	S
	15	M	D/D	Rápido	24	77	101	S
	15A				38	65	103	S
	16	F	I/D	Intermediário	92	21	113	N
	17	M	I/D	Intermediário	20	76	96	N
	18	M	I/D	Intermediário	27	77	104	N
	19	M	I/I	Lento	39	70	109	N
	19A				17	85	102	N
	19B				17	80	98	N
Portador	20	F	D/D	Rápido	45	58	102	S
	21	M	D/D	Rápido	29	73	102	S
	22	M	I/D	Intermediário	49	66	115	S
	23	M	I/D	Intermediário	37	66	103	S

M (masculino), F (feminino), Tipo I (fibras lentas), Tipo II (fibras rápidas), S (Sim) e N (Não)

Tabela 21. Polimorfismo ACE dos controles, fenótipo preditivo pela genotipagem do gene ACE, resultado da distribuição de fibras tipo I e II, e a presença ou não da correspondência desta distribuição com o polimorfismo.

Gene ACE									
				Controles		Distribuição de Fibras (%)		Compatibilidade	
	Caso	Gênero	Genotipagem	Fenótipo	Tipo I	Tipo II	Total	genótipo e % fibras	
Controle	Infantil	24	F	I/D	Intermediário	53	55	108	S
		25	F	I/D	Intermediário	44	56	99	S
		26	F	I/D	Intermediário	49	45	95	S
		27	F	I/D	Intermediário	49	52	101	S
		28	M	I/D	Intermediário	53	47	100	S
		29	M	D/D	Rápido	58	50	107	N
		30	M	I/D	Intermediário	40	58	99	N
		31	M	I/I	Lento	41	57	98	N
		32	M	I/D	Intermediário	44	54	98	S
		33	M						
	Juvenil	34	F	I/D	Intermediário	43	56	98	S
		35	F	I/I	Lento	38	62	101	N
		36	M	D/D	Rápido	35	65	100	S
		37	M	I/D	Intermediário	37	67	103	N
		38	M	I/D	Intermediário	32	70	101	S
	Adulto	39	F	I/D	Intermediário	55	51	106	S
		40	M	I/I	Lento	44	56	100	N
		41	M	I/D	Intermediário	37	64	101	S
		42	M	I/D	Intermediário	34	78	112	S
	Portador	43	F	I/I	Lento	54	51	104	S
44		M	I/D	Intermediário	39	62	101	N	

M (masculino), F (feminino), Tipo I (fibras lentas), Tipo II (fibras rápidas), S (Sim) e N (Não)

A distribuição do gene ACE nos grupos não permitiu uma análise estatística de associação entre o gene e a distribuição de fibras pelo pequeno número de casos do polimorfismo D/D dentro de cada grupo. Pode-se, no entanto, observar em uma análise qualitativa de que houve discordância entre os parâmetros analisados em apenas 33% nos grupos controles e de 60% nos casos de ambas as formas (FIP e FIT). Estes dados sugerem que a distribuição predominante de fibras tipo II se deva além do fator constitutivo genético atribuído pelo gene ACE, ao processo patológico da própria doença de Pompe.

5.6. Correlação da quantificação da enzima GAA no Western Blotting (WB) e o genótipo da doença

O WB foi realizado para avaliação da presença ou não da enzima residual de GAA e os resultados podem ser observados na Tabela 22. Estes se correlacionaram com o tipo de mutação no gene GAA.

A presença de mutação *nonsense* (mutação nula) em ambos os alelos foi observada em 3/10 casos da FIP, sendo que todos os 3 pacientes (casos 1, 2 e 9) apresentaram ausência total de enzima (CRIM negativo) no WB.

Os demais pacientes com uma mutação nula em combinação com outra mutação menos deletéria apresentaram presença de enzima residual GAA (CRIM positivo) (Figura 24).

Em resumo, os resultados globais de cada paciente estão apresentados na Tabela 23 para facilitar uma análise comparativa dos diversos parâmetros estudados.

Tabela 22. Western Blotting da proteína GAA dos casos estudados

Western Blotting						
			Forma		Enzima residual	
	Caso	Gênero	Ativa	Inativa	CRIM	
Início-precoce	1	F	N	N	-	
	2	F	N	N	-	
	3	F	N	S	+	
	4	F	N	S	+	
	5	M	S	S	+	
	6	M	N	S	+	
	7	M	N	S	+	
	8	M	N	S	+	
	9	M	N	N	-	
	10	M	S	S	+	
Início-tardio	Juvenil	11	F	S	S	+
		12	F	S	S	+
		12A	F			
		13	M	S	S	+
		13A	M			
		14	M	S	fraco	+
		14A	M			
		15	M	S	S	+
		15A	M			
	Adulto	16	F	S	S	+
		17	M	S	S	+
		18	M	S	S	+
		19	M	S	S	+
		19A	M			
		19B	M			
Portador	20	F	S	S	+	
	21	M	S	S	+	
	22	M	S	S	+	
	23	M	S	S	+	

M (masculino), F (feminino), S (Sim) e N (Não)

Figura 24. Western blotting dos pacientes estudados com doença de Pompe.

6. DISCUSSÃO

6.1. População de estudo

A população estudada foi constituída de 19 pacientes com GDSII, sendo 10 da forma início-precoce (FIP) e 09 da forma início-tardio (FIT) - 05 da forma juvenil e 04 da forma adulta.

Na literatura, a incidência geral da doença é de 1:40.000 nascidos-vivos, sendo a incidência menor na FIP (1:138.000) e maior na FIT (1:57.000) (Martiniuk 1998 e Ausems 1999), podendo variar em diferentes grupos étnicos.

A forma clínica encontrada no presente estudo foi diferente do que refere a literatura, pois observou-se mais casos da FIP (10) e menos que o previsto na literatura de casos da FIT (09). Isso provavelmente deve-se ao fato das manifestações clínicas na FIP serem mais graves com procura imediata do serviço de saúde, enquanto na FIT, os sinais/sintomas são mais brandos/inespecíficos, levando a uma demora no diagnóstico da doença e uma procura tardia da assistência médica.

6.2. Dados clínicos

O quadro clínico dos casos de FIP caracterizou-se pela presença de hipotonia muscular em todos os casos, variando o intervalo até o diagnóstico, caracterizando a forma clássica grave descrita na literatura (Martin 1973, DiMauro 1978).

A fraqueza muscular observada nos casos de FIT foi maior em membros inferiores do que nos superiores, concordando com o descrito na literatura. Apenas 03 pacientes queixaram-se de fadiga muscular com dificuldade na execução de alguns movimentos.

A insuficiência respiratória esteve presente em todos os pacientes da FIP. Em apenas 02 casos da FIT houve a necessidade de ventilação assistida pela dificuldade respiratória, não se detectando queixas ou sinais de insuficiência respiratória nos demais.

Confirmou-se a restrição do acometimento da musculatura esquelética, sem a extensão do comprometimento da musculatura cardíaca, com uma lenta progressão

clínica da miopatia proximal e envolvimento marcado dos músculos respiratórios nos casos FIT estudados, em acordo com o descrito na literatura (Hirschhorn 2001).

6.3. Genotipagem das mutações

Foram identificadas um total de 18 mutações genéticas diferentes no gene GAA, distribuídas ao longo do gene: 10 mutações do tipo *missense*, 03 do tipo *nonsense*, 03 rearranjos e 02 *splices*. Duas das mutações encontradas são novas (p.Gly638Val e p.Asn635Lys), descritas por Oba-Shinjo (2008). Nos 19 pacientes, ambos os alelos mutados foram identificados (5 em homozigose e 14 em heterozigose).

Nos casos da FIP foram mais freqüentes as mutações do tipo *nonsense* e genótipo em homozigose, já nos casos da FIT foram encontradas mutações do tipo *missense* e genótipo em heterozigose.

As mutações mais encontradas na FIP foram localizadas no exon 14 (*missense*) e no exon 18 (*nonsense*), já na FIT foram as mutações intrônicas (c.-32-13 T>G e c.-32-3C>A) e também as localizadas no exon 14.

Foram identificadas duas famílias em 19 casos estudados, que apresentavam mais de um indivíduo acometido. Todos os indivíduos de ambas as famílias apresentaram a mutação intrônica c.-32-13T>G (IVS1). Além desta mutação, os três membros da família A, acometidos em idade juvenil, apresentaram a mutação c.1927G>A, enquanto que os dois membros da família B, acometidos em idade adulta, apresentaram a mutação c.2560C>T.

Segundo a literatura, a mutação intrônica c.-32-13T>G (IVS1) representa a mutação mais freqüente de GAA em indivíduos caucasianos na FIT (Kroos 1995, Huie 1994, Hermans 2004). Algumas outras mutações são relativamente comuns, como: a deleção do exon 18, resultando em perda de 55 aminoácidos (Van der Kraan 1994), uma deleção de uma única-base no exon 2 (del T525) que conduz à parada prematura da síntese de GAA (Hermans 1994), e a substituição N645 (1935C>A) no exon 14 (Shieh 1994, Tsujino 2000).

A frequência dos tipos de mutações encontra-se em acordo com o descrito previamente, sendo mais frequentes as mutações do tipo *missense*, rearranjo, *splice* e *nonsense*, em ordem decrescente de frequência.

Em ambas famílias, apesar dos pacientes apresentarem o mesmo genótipo, observam-se diferenças marcantes quanto a velocidade de progressão, a atividade residual de GAA e o grau de acometimento muscular, sugerindo que fatores exógenos (nutritivo, físico, estilo de vida, outros genes moduladores) possam estar envolvidos na expressão do gene GAA, podendo alterar a taxa de biossíntese da enzima.

6.4. Achados de biópsia muscular

6.4.1. Análise histológica e histoquímica à biópsia muscular

Observou-se na FIP, a presença de miopatia vacuolar com grânulos PAS positivos na maioria das fibras (> 95%) e intensa atividade lisossomal à reação pela fosfatase ácida, caracterizada pela formação de vacúolos nas fibras musculares.

Houve uma completa distorção da citoarquitetura das fibras, o que dificultou a análise nas demais reações oxidativas e na distribuição dos tipos de fibras às reações pelas ATPases.

Somente em um caso (caso 5), observou-se uma preservação maior da citoarquitetura das fibras, com presença de vacúolos em 89% das fibras. Interessantemente, foi detectada neste caso duas mutações do tipo *missense*, menos deletéria que as mutações *nonsense*, com presença de pequena quantidade de enzima GAA, conforme discutiremos adiante.

Na FIT, observou-se grande variação no tempo de doença até a ocasião da realização da biópsia muscular, o que pode explicar em parte a grande variação na quantidade de fibras musculares vacuoladas (0-88%).

Ressalta-se que embora a morfologia da fibra apresentasse sem alteração no HE, observou-se discretas alterações na reação pela fosfatase ácida, caracterizadas pelo

pontilhado avermelhado intracitoplasmático. Este achado observado nos casos 13, 17, 18 e 19 denota a presença da ativação lisossomal e processo patológico muscular em evolução.

Há uma atenuação da gravidade do quadro clínico com o avançar da idade de início, que corresponde paralelamente aos achados histológicos à biópsia com menor número de fibras musculares acometidas. Esta observação é corroborada pelas determinações quantitativas do índice de glicogênio no músculo descritas na literatura variando do normal a três vezes do valor normal nos casos mais graves (Engel 1973).

As alterações progressivas em biópsias sequenciais dos casos 12, 13, 14, 15 e 19 com aumento dos vacúolos das fibras de 11% a 14% (caso 12), 46% a 50% (caso 14), 48% a 60% (caso 15) atestam o quadro progressivo desta doença.

6.4.2. Estudo morfométrico

A observação interessante e marcante foi predomínio de fibras tipo II em todos os casos de FIP, em ambos os gêneros e em todos os casos da FIT do gênero masculino. Surpreendentemente, os dois casos do gênero feminino da FIT apresentaram um predomínio tipo I.

Este predomínio é mais consistente na FIP, pois a distribuição das fibras rápidas e lentas está em proporção de 53% e 48%, respectivamente nos controles pareados por idade e gênero.

Não há estudo prévio de distribuição de fibras na literatura na faixa etária dos casos da FIP (abaixo de um ano de idade). Os controles foram escolhidos no banco de tecidos musculares do grupo de miopatias, sendo considerados como controles aqueles que não apresentavam alterações morfológicas ou histoquímicas à biópsia muscular. Há um fator limitante na análise destes controles, pois os pacientes foram biopsiados por apresentarem queixas ou sinais que apontavam potencial patologia muscular. A normalidade destes controles foi considerada do ponto de vista da estrutura muscular. A homogeneidade dos controles foi assegurada pelo desvio-padrão restrito de 0,044 para as fibras rápidas e 0,059 para as fibras lentas.

Portanto, considerando-se, que a distribuição das fibras rápidas e lentas na faixa etária infantil estudada é de praticamente 1:1, o predomínio de fibras tipo II acima de 60% observada em 6 /10 casos foi considerada estatisticamente significativa ($p=0,025$).

Interessantemente, no caso 6 observa-se a manutenção da porcentagem de fibras lentas (47%), mas queda na porcentagem das fibras rápidas (37%), o que permite especular que pudesse ter havido maior destruição das fibras tipo II.

É importante salientar que a determinação do tipo de fibra não foi uma tarefa fácil na FIP, uma vez que a vasta maioria das fibras musculares apresentavam destruição da citoarquitura interna. A designação do tipo de fibra foi realizada pela reação presente no arcabouço periférico remanescente da fibra. Há um fator de erro plausível, no entanto este foi minorado pela análise por dois observadores e controle intraobservador.

Foi possível comprovar o aumento das fibras tipo II em biópsias sequenciais do caso 19, onde o incremento foi de 70% para 85% de fibras tipo II em 6 anos de evolução da doença com estabilização em torno de 80% numa terceira biópsia realizada com 3 anos de intervalo da segunda biópsia.

Interessantemente, no caso 13, observou-se um predomínio de fibras tipo II na primeira biópsia (85%), com queda desta porcentagem para 54% na segunda biópsia realizada com intervalo de 5 anos da primeira. A distribuição de fibras observada nesta última biópsia era próxima a observada nos controles normais e o paciente se mantém assintomático, exceto por queixa de fadigabilidade aos esforços físicos.

A mudança no fenótipo das fibras musculares esqueléticas vem sendo estudada nos modelos de treinos aeróbicos e anaeróbicos, assim como em populações que habitam em altas altitudes (~4000m) como os Tibetanos e Peruanos. Estes estudos têm demonstrado que em condições de hipóxia aguda ou crônica há uma hiperexpressão do fator induzível pela hipóxia 1 (HIF-1) predominantemente a subunidade 1 alpha (HIF-1A) que aumenta os níveis de mRNA das enzimas oxidativas, fosfofrutoquinase

e proteína de choque térmico 70 com mudança da distribuição de fibras rápidas para lentas (Vogt M 2001, Hoppeler H 2001).

Surpreendentemente, a mudança esperada para predomínio de fibras tipo I não ocorreu pelo menos nos pacientes do gênero masculino nesta condição de hipóxia metabólica, onde falta o substrato para as vias metabólicas, principalmente para a via glicolítica. A pesquisa de outros fatores determinantes para esta mudança na distribuição de fibras com predomínio das fibras tipo II será mandatória para melhor compreensão dos mecanismos patológicos da doença de Pompe.

As duas pacientes do gênero feminino biopsiadas em idade adulta (casos 12 e 16) apresentaram franco predomínio de fibras tipo I. Observou-se a presença de fibras híbridas (Figura 25 e 26) na biópsia de ambos os casos.

Além do fator hipóxico, que favorece a mudança do tipo de fibra é provável que fatores hormonais acentuem esta tendência. É conhecido que hormônio tireoidiano e hormônios sexuais regulem a expressão do gene da miosina, havendo ainda evidências de que T_3 regule processos pós-transcricionais, transcrícioanis e pós-traducionais das isoformas da miosina (Yu F *et al.* 1999).

Assim, é conhecido que aumento da atividade neuromuscular, sobrecarga mecânica e hipotireoidismo são condições que induzem a transição de fibras rápidas para lentas (Pette D e Staron RS 2000).

Espera-se, portanto, que não somente a condição patológica da deficiência do GAA, mas também a intensidade, o tipo de atividade física e outros fatores internos da homeostase interfiram no fenótipo final das fibras musculares.

6.4.3. Densidade capilar

É interessante notar que a densidade capilar nos controles é menor na faixa etária infantil (0,21 capilares/fibra) que em adultos (1,02 capilares/fibra).

Entre os adultos, os homens apresentam uma densidade capilar discretamente maior (1,09 capilares/fibra) do que mulheres (0,89 capilares/fibra).

Schmalbruch (1985) demonstrou razões distintas das observadas no presente estudo, sendo 1,8 capilares/fibra em homens e 1,4 capilares/fibra em mulheres, e não há referência à faixa etária da série estudada, o que torna mais difícil a comparação.

O aumento da vascularização, em comparação com os controles, foi notada em ambas as formas: 214 % em FIP e 155% em FIT. Estes resultados foram estatisticamente significativos ($p=0,001$ na FIP, $p=0,034$ na FIT)

A formação de novos capilares a partir de capilares pré-existent é chamado de angiogênese. O processo de remodelação vascular é desencadeado por vários fatores (hipóxia, exercícios) devido às adaptações estruturais e funcionais. O óxido nítrico (NO) e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) são os principais agentes bioquímicos do processo de angiogênese. A angiogênese relacionada ao exercício sofre influência de variantes, como tipo de exercício realizado, o tipo de fibra

muscular estimulada e as condições dos indivíduos testados. Existe uma correlação positiva entre o exercício físico e a angiogênese.

O aumento da densidade capilar observada no presente estudo nos casos com doença de Pompe permite especular de que a angiogênese ocorreu por estímulo hipóxico. A observação do aumento de capilares particularmente ao redor das fibras tipo II vacuoladas (Figura 27 – caso 16), corrobora esta hipótese. O aumento capilar houve provavelmente por crise na produção de ATP, principalmente ao redor de fibras cuja via energética é a glicolítica e com falta de substrato, a glicose, por defeito na clivagem do glicogênio.

Figura 27. Densidade capilar aumentada ao redor das fibras tipo II vacuoladas no caso 16.

A via de estimulação da angiogênese mais provável nesta condição é via HIF-1A e VEGF, como descrito anteriormente nos estudos de adaptação molecular do músculo esquelético humano em treinamento de resistência em condições hipóxicas (Vogt 2001) e no estudo de populações habitantes de altas altitudes (Vogt 2001) como descrito anteriormente.

6.5. Correlação do polimorfismo do gene ACE com a distribuição de fibras

O polimorfismo do gene ACE foi considerado como um dos fatores constitucionais na distribuição do tipo de fibras para melhor valorizar os achados nos casos com doença de Pompe.

O polimorfismo I/D do ACE tem sido associado a performance física humana. Estudos recentes demonstraram que o alelo I é mais freqüente em atletas de resistência, enquanto que o alelo D, em atletas de força e explosão muscular (Myerson 1999; Hagberg 1998).

Como esperado, houve uma boa concordância (78%) entre o genótipo do gene ACE e a distribuição das fibras entre os controles na faixa infantil e adulta.

Desta forma, a ausência de concordância entre estes dois parâmetros (genótipo ACE e distribuição de fibras) de 60% entre os casos da FIP e FIT poderá ser atribuída com maior probabilidade à condição patológica da doença de Pompe.

Interessantemente, todos os quatro portadores, apenas com um alelo mutado para o gene GAA, apresentaram a distribuição de fibras esperada pelo tipo do genótipo do gene ACE.

Estes achados reforçam o resultado da presença de predomínio de fibras tipo II na grande maioria dos pacientes com doença de Pompe, independente da forma clínica.

6.6. Correlação do Western Blotting (WB) com a enzima residual de GAA e o genótipo da doença

A quantidade de enzima residual variou inversamente com a gravidade da doença, sendo relacionado com o quadro clínico do paciente. Assim, a presença de mutação *nonsense* (mutação nula) em ambos os alelos foi observada em 3/10 casos da FIP, sendo que todos os 3 pacientes (casos 1, 2 e 9) apresentaram ausência total de enzima (CRIM negativo) no WB.

Os demais pacientes da FIP apresentaram banda de GAA detectável no WB, no entanto, a proteína provavelmente não era funcional. Haverá necessidade de ensaios funcionais para confirmar este fato.

Os achados estão em conformidade aos descritos na literatura, onde a maior parte da FIP geralmente apresenta menos de 1% da atividade enzimática normal, enquanto a subforma juvenil apresenta 10% e a subforma adulta, menos de 40%.

A atividade de 25% do GAA parece ser suficiente para impedir a manifestação clínica evidente da doença (Van Meir 2003).

6.7. O impacto do achado de predomínio de fibras tipo II no prognóstico e na resposta terapêutica dos pacientes com doença de Pompe

As primeiras evidências de que as consequências do depósito de glicogênio na doença de Pompe eram distintas em diferentes tipos de fibra muscular foram detectadas nos estudos com modelo animal “knock-out” para GAA (camundongo GAA $-/-$).

Estes estudos demonstraram que a reposição enzimática de GAA retirava o glicogênio de modo mais eficiente das fibras tipo I, provavelmente porque estas fibras apresentavam maior número de receptores manose-6-fosfato (Raben 2003).

Estes experimentos também demonstraram que embora houvesse o clearance do glicogênio havia a persistência dos vacúolos autofágicos.

Com o desenvolvimento da terapia de reposição enzimática (TRE) usando enzimas produzidas no leite de coelhos transgênicos ou em células de ovário de *hamster* chinês (CHO) (Van Hove 1996, Bijvoet 1999, Amalfitano 2001, Kishnani 2002, Van der Ploeg 2002, Winkel 2004), abriu-se a possibilidade de tratamento para os pacientes com a doença de Pompe, o que ocorreu de fato pela aprovação do uso da proteína recombinante humana GAA pelos comitês de saúde governamentais dos EUA e Europa no início do ano de 2008.

A resposta a esta terapia mostrou eficácia variada nas FIP e FIT durante a fase III do ensaio clínico, sendo que a recuperação do músculo cardíaco e do músculo esquelético não ocorreu da forma esperada em algumas crianças.

Da mesma forma, a resposta terapêutica, na FIT, embora o tempo de seguimento ainda seja muito curto, não está ocorrendo do modo previsto.

Tornou-se urgente, portanto, conhecer melhor o mecanismo da ação da enzima recombinante no patomecanismo da doença.

Os estudos no modelo animal haviam demonstrado uma alteração na via da degradação do lisossomo com formação de vacúolos autofágicos com alteração no tráfego via endocítica da enzima terapêutica. Observou-se no modelo animal que a enzima administrada era retida nas áreas de autofagia e não alcançava o alvo final, o lisossomo (Fukuda 2006).

Demonstrou-se, no modelo animal, de que o acúmulo de glicogênio ocorria distintamente nas fibras tipo I e II e que apenas as fibras tipo II eram mais resistentes à TRE, por conter extensas áreas de autofagia ao longo da fibra, o que dificultava o tráfego da enzima ao lisossomo (Raben 2005 e Fukuda 2006).

Importantemente, em estudo colaborativo com o grupo do NIH, demonstramos que o mesmo ocorre nas fibras musculares dos casos FIT, confirmando de que há uma alteração profunda da via de degradação do lisossomo com formação de extensas áreas autofágicas (Raben 2007).

Foi demonstrado que os casos FIP que responderam pobremente a TRE apresentavam menos fibras tipo I (Thurberg 2006), como observado na presente casuística com predomínio de fibras tipo II nas FIP, incluindo três casos com forma grave, com deficiência completa de GAA (CRIM negativo) pela presença de mutação nula em homozigose (*nonsense* com formação de stop códon). Há, no entanto, um caso descrito na literatura com a forma infantil de 3 meses de idade, que recebeu TRE e as biópsias musculares realizadas antes e após 17 meses do início do tratamento demonstraram melhora das alterações morfológicas com redução das inclusões não-contráteis nas fibras musculares. Embora houvesse o relato da melhora de ambos os tipos de fibras, nas áreas de menor resposta terapêutica observou-se que as fibras tipo IIA permaneciam marcadamente alteradas (Drost *et al.* 2008), corroborando as hipóteses anteriores, que as fibras tipo II respondem menos à TRE.

Os achados do presente estudo demonstram de que há um desvio da distribuição de fibras musculares com predomínio de fibras tipo II em ambas as formas (FIP e FIT).

As evidências prévias em modelo animal da doença de Pompe demonstram que a falta do substrato glicose deflagra o processo de autofagia nas fibras tipo II e como consequência há uma dificuldade da enzima administrada chegar ao lisossomo para sua ação.

Os resultados no presente estudo quanto à densidade capilar sugerem que a enzima não terá dificuldades em alcançar a fibra muscular, pois há um aumento desta densidade capilar, no entanto, a resposta terapêutica poderá estar comprometida pela presença de maior quantidade de fibras musculares do tipo II.

Novas abordagens experimentais para compreender os mecanismos que levam esta transição do tipo de fibra, como por exemplo, a análise do perfil de expressão gênica para os estudos das vias de diferenciação celular e da expressão das isoformas de miosina, são necessárias para melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos e assim melhorar a eficácia do tratamento já vigente na doença de Pompe.

7. CONCLUSÃO

1. Houve uma correlação direta entre a gravidade do achado histológico mensurada pela quantidade de vacúolos e positividade da reação à fosfatase ácida, com a forma clínica FIP e FIT.
2. Observou-se predomínio de fibras tipo II em todos os casos analisados da FIP e homens da FIT.
Detectou-se predomínio de fibras tipo I nas mulheres com FIT.
3. A distribuição de fibras foi concordante com o previsto pelo polimorfismo do gene ACE em cerca de 80% dos controles e apenas 40% dos casos de FIP e FIT.
4. Observou-se aumento da densidade capilar muscular em ambas as formas (FIP e FIT).
5. Deficiência completa de GAA foi observada nos casos com dupla mutação *nonsense* e quantidade variável de GAA foi detectada nos demais casos, havendo uma correlação direta entre este parâmetro e a forma clínica da doença.

ANEXO IV

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 12.04.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1056/05** intitulado: "Análise funcional das mutações novas do gene da Alpha-glucosidase ácida em células COS-7" 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. Suely Kazue Nagahashi**

Pesquisador(a) Executante: **Sra. Erika Midoli Matsunaga**

CAPPesq, 12 de Abril de 2006.

PROF. DR. CLAUDIO LEONE

**Vice-Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa**

Anexo V

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :
- 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 (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Análise funcional das mutações novas do gene da Alpha- glucosidase Ácida em células COS-7.
2. PESQUISADOR: Profa. Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie
- CARGO/FUNÇÃO: Docente INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 36.452
- UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Neurologia, LIM15.
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
SEM RISCO ☐	RISCO MÍNIMO ☐	RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO X	RISCO MAIOR ☐	
- (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos.

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa
2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais
3. desconfortos e riscos esperados
4. benefícios que poderão ser obtidos
5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.

O presente projeto tem o objetivo de estudar as alterações genéticas observadas em pacientes com doença de depósito do glicogênio (GSDII) e preparar o material (biópsia) para estudo genético a fim de identificar os fatores que influenciam a gravidade da doença .

Para isso, estamos solicitando sua participação voluntária, com o compromisso de utilizar o material biológico exclusivamente para estudo do gene GAA deste projeto de pesquisa. O seu nome não será divulgado em nenhum momento do estudo, pois as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes.

O(a) senhor(a) será submetido a um procedimento cirúrgico ambulatorial, em que será realizado um corte de aproximadamente 1,5 cm na pele do braço, com anestesia local, sendo retirado um pequeno fragmento de músculo (biópsia), medindo 1,0 cm x 0,5 cm, para realização de diagnóstico. A sobra deste fragmento será utilizado para pesquisa e estudo de alterações do gene GAA (alpha-glucosidase ácida).

O(a) senhor(a) estando muito tenso(a) e ansioso(a) pode se mexer durante o procedimento, e isto pode ocasionar sangramento na hora da coleta da biópsia muscular. Isto é conhecido como acidente de coleta inevitável, mas que muito raramente causará algum problema para o(a) senhor(a).

O medo pode ocasionar distúrbios emocionais que são caracterizados pelo suor frio, tonturas, sensação de desmaio e sensação de falta de ar. Pode sentir um desconforto após a coleta da biópsia, como dor, vermelhidão, inchaço ou calor locais.

A biópsia pode apresentar mínimo risco, como pequeno sangramento e infecção. Quando acontecerem, existem tratamentos específicos que serão aplicados ao senhor(a) imediatamente após a detecção do problema.

Com a coleta de um pequeno fragmento de músculo serão estudados novos mecanismos, que poderão auxiliar a esclarecer as alterações descritas no gene causador da sua doença, e trazer um benefício futuro com tratamento mais eficaz.

O(a) senhor(a) ou seu responsável está sendo convidado a participar do protocolo de pesquisa com a liberdade de recusar ou retirar o seu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga qualquer prejuízo ou penalidades a continuidade da assistência oferecida no Hospital das Clínicas da FMUSP.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer momento do estudo, incluindo exames e consultas. Como também, não há compensação financeira relacionada a sua participação.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Qualquer dúvida sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa poderão ser esclarecidos com o pesquisador.
2. Você tem a liberdade de não participar do estudo ou retirar o seu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga qualquer prejuízo a continuidade da assistência oferecida no Hospital das Clínicas da FMUSP.
3. O seu nome não será divulgado em nenhum momento do estudo, pois as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes.
4. Para quaisquer danos à saúde decorrentes dos procedimentos necessários para a pesquisa (como por exemplo, a biópsia), você poderá contar com o atendimento no Hospital das Clínicas da FMUSP.
5. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada a sua participação.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Nome dos Pesquisadores:

- Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie
- Dra. Mary de Souza Carvalho Alegro
- Erika Midoli Matsunaga.

Endereço: Av. Dr. Arnaldo, nº455 (4º andar - sala 4110) – Departamento de Neurologia (LIM-15). São Paulo, SP.

CEP: 01246-903

Telefones: (11) 3061-4036, (11) 3062-0620

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 20 .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

ANEXO VI

Genotipagem dos 19 casos e 04 portadores estudados

Genotipagem						
Caso	Localização	Nucleotídeo	Aminoácido	Mutação	Alelo	Genótipo
Início-precocce	1 Exon 18	c.2608C>T	p.Arg870X	nonsense	Alelo 1	Ho
	Exon 18	c.2608C>T	p.Arg870X	nonsense	Alelo 2	
	2 Exon 18	c.2560C>T	p.Arg854X	nonsense	Alelo 1	Ho
	Exon 18	c.2560C>T	p.Arg854X	nonsense	Alelo 2	
	3 Intron17-18	c.2481+102_2646+31del	p.Gli828_Asn882del	deleção	Alelo 1	Ho
	Intron17-18	c.2481+102_2646+31del	p.Gli828_Asn882del	deleção	Alelo 2	
	4 Exon14	c.1905C>A	p.Asn635Lis	missense	Alelo 1	Ho
	Exon14	c.1905C>A	p.Asn635Lis	missense	Alelo 2	
	5 Exon14	c.1913G>T	p.Gli638Val	missense	Alelo 1	He
	Exon14	c.1912G>T	p.Gli638Trp	missense	Alelo 2	
	6 Exon4	c.784G>A	p.Glu262Lis	missense	Alelo 1	He
	Exon11	c.1561G>C	p.Glu521Gln	missense	Alelo 2	
	7 Exon12	c.1655T>C	p.Leu552Pro	missense	Alelo 1	He
	Exon14	c.1941C>G	p.Cis647Trp	missense	Alelo 2	
	8 Exon14	c.1905C>A	p.Asn635Lis	missense	Alelo 1	Ho
	Exon14	c.1905C>A	p.Asn635Lis	missense	Alelo 2	
Início-tardio	9 Exon2	c.377G>A	p.Trp126X	nonsense	Alelo 1	He
	Exon 18	c.2501-2502delCA	p.Thr834Argfs48X	del nonsense	Alelo 2	
	10 Exon 2	c.236_246del	p.Pro79X	del nonsense	Alelo 1	He
	Exon 14	c.1927G>A	p.Gli643Arg	missense	Alelo 2	
	11 Exon2	c.377G>A	p.Trp126X	nonsense	Alelo 1	He
	Exon12	c.1655T>C	p.Leu552Pro	missense	Alelo 2	
	12 Intron 1	c.-32-13T>G	leaky splice		Alelo 1	He
	Exon14	c.1927G>A	p.Gli643Arg	missense	Alelo 2	
	13 Intron 1	c.-32-13T>G	leaky splice		Alelo 1	He
	Exon14	c.1927G>A	p.Gli643Arg	missense	Alelo 2	
	14 Intron 1	c.-32-3C>A	splice		Alelo 1	He
	Exon10	c.1447G>A	p.Gli483Arg	missense	Alelo 2	
	15 Intron 1	c.-32-13T>G	leaky splice		Alelo 1	He
	Exon14	c.1927G>A	p.Gli643Arg	missense	Alelo 2	
	16 Intron 1	c.-32-13T>G	leaky splice		Alelo 1	He
	Exon 18	c.2560C>T	p.Arg854X	nonsense	Alelo 2	
Adulto	17 Exon13	c.1781G>C	p.Arg594Pro	missense	Alelo 1	He
	Exon14	c.1941C>G	p.Cis647Trp	missense	Alelo 2	
	18 Exon13	c.1781G>C	p.Arg594Pro	missense	Alelo 1	He
	Exon14	c.1941C>G	p.Cis647Trp	missense	Alelo 2	
	19 Intron 1	c.-32-13T>G	leaky splice		Alelo 1	He
	Exon 18	c.2560C>T	p.Arg854X	nonsense	Alelo 2	
Portador	20 Exon10	c.1447G>A	p.Gli483Arg	missense	Alelo 1	
	21 Exon14	c.1927G>A	p.Gli643Arg	missense	Alelo 1	
	22 Intron 1	c.-32-13T>G	leaky splice		Alelo 1	
	23 Intron 1	c.-32-13T>G	leaky splice		Alelo 1	

Ho (Homozigose) e He (Heterozigose)

ANEXO VII

Análise Estatística

Amostra Total

Variáveis	Grupos				
	Pompe	Controle	Pompe	Controle	Portador
	Infantil (n = 10)	Infantil (n = 9)	Juvenil/Adulto (n = 9)	Juvenil/Adulto (n = 9)	(n = 4)
Gênero – n (%)					
Feminino	4 (40,0%)	4 (44,4%)	3 (33,3%)	3 (33,3%)	1 (25,0%)
Masculino	6 (60,0%)	5 (55,6%)	6 (66,7%)	6 (66,7%)	3 (75,0%)
Idade (anos)					
média (dp)	0,6 (0,4)	1,6 (0,8)	31,7 (11,8)	33,9 (12,8)	39,5 (12,5)
mediana	0,6	1,9	33,6	36,6	45,0
mínimo – máximo	0,1 – 1,5	0,2 – 3,0	10,0 – 45,8	11,8 – 49,4	20,8 – 47,4
Fast (%)					
média (dp)	63,6 (11,3)	52,6 (4,5)	64,5 (19,0)	63,1 (8,1)	65,5 (6,2)
mediana	64,2	54,1	70,1	63,9	65,8
mínimo – máximo	44,0 – 80,6	45,3 – 58,2	21,0 – 84,8	51,1 – 77,5	57,6 – 72,7
Comparação	p = 0,015 *		p = 0,841		
Slow (%)					
média (dp)	37,3 (8,9)	47,9 (6,0)	46,5 (26,6)	39,4 (7,1)	40,0 (9,0)
mediana	39,5	49,4	38,7	37,2	40,8
mínimo – máximo	18,2 – 47,0	40,5 – 57,9	20,0 – 92,0	31,6 – 55,2	28,9 – 49,4
Comparação	p = 0,008 *		p = 0,460		
(continua)					

Variáveis	Grupos				
	Pompe	Controle	Pompe	Controle	Portador
	Infantil (n = 10)	Infantil (n = 9)	Juvenil/Adulto (n = 9)	Juvenil/Adulto (n = 9)	(n = 4)
Relação Fast/Slow					
média (dp)	1,89 (0,89)	1,12 (0,22)	1,96 (1,23)	1,67 (0,44)	1,73 (0,57)
mediana	1,66	1,04	1,81	1,72	1,56
mínimo – máximo	0,94 – 4,02	0,86 – 1,44	0,23 – 3,79	0,93 – 2,27	1,29 – 2,51
Comparação	p = 0,025 *		p = 0,516		
Fibra híbrida – n(%)					
Não			1 (11,1%)	0 (0,0%)	
Sim			8 (88,9%)	9 (100,0%)	
Ulex					
média (dp)	0,47 (0,16)	0,21 (0,06)	1,56 (0,62)	1,02 (0,27)	1,24 (0,30)
mediana	0,48	0,20	1,57	1,06	1,26
mínimo – máximo	0,28 – 0,78	0,12 – 0,31	0,79 – 2,27	0,60 – 1,35	0,86 – 1,58
Comparação	p = 0,001 *		p = 0,034 *		
ACE gene – n (%)					
D/D	2 (20,0%)	2 (22,2%)	3 (33,3%)	2 (22,2%)	2 (50,0%)
I/D	2 (20,0%)	6 (66,7%)	4 (44,4%)	5 (55,6%)	2 (50,0%)
I/I	6 (60,0%)	1 (11,1%)	2 (22,2%)	2 (22,2%)	0 (0,0%)

Nas amostras infantis, na comparação entre os grupos Pompe e Controle foram encontrados os seguintes resultados:

- diferença estatisticamente significativa na % de fibras Fast ($p = 0,015$), onde o grupo Pompe apresentou média significativamente maior do que a do grupo Controle;
- diferença estatisticamente significativa na % de fibras Slow ($p = 0,008$), onde o grupo Pompe apresentou média significativamente menor do que a do grupo Controle;
- diferença estatisticamente significativa na Relação Fast/Slow ($p = 0,025$), onde o grupo Pompe apresentou média significativamente maior do que a do grupo Controle;
- diferença estatisticamente significativa na Ulex ($p = 0,001$), onde o grupo Pompe apresentou média significativamente maior do que a do grupo Controle.

Nas amostras juvenis/adultos, na comparação entre os grupos Pompe e Controle foram encontrados os seguintes resultados:

- diferença não significativa na % de fibras Fast ($p = 0,841$);
- diferença não significativa na % de fibras Slow ($p = 0,460$);
- diferença não significativa na Relação Fast/Slow ($p = 0,516$);
- diferença estatisticamente significativa na Ulex ($p = 0,034$), onde o grupo Pompe apresentou média significativamente maior do que a do grupo Controle.

Apenas 1 caso do grupo Pompe juvenil/adulto não apresentou presença de fibras híbridas, não permitindo aplicação de teste estatístico.

A distribuição do ACE gene nos grupos não permite análise de associação entre o gene e a distribuição da % das fibras devido ao pequeno número de casos do tipo D/D dentro de cada grupo.

Na comparação dentro de cada grupo quanto à diferença entre a % de fibras Fast e a % de fibras Slow foram encontrados os seguintes resultados:

- diferença estatisticamente significativa no grupo Pompe Infantil ($p = 0,001$), com predomínio de fibras Fast;
- diferença não significativa no grupo Controle Infantil ($p = 0,183$);
- diferença não significativa no grupo Pompe Juvenil/Adulto ($p = 0,252$);
- diferença estatisticamente significativa no grupo Controle Juvenil/Adulto ($p = 0,001$), com predomínio de fibras Fast;
- diferença estatisticamente significativa no grupo Portador ($p = 0,035$), com predomínio de fibras Fast.

Amostra Feminina

Variáveis	Grupos				
	Pompe	Controle	Pompe	Controle	Portador (n = 1)
	Infantil (n = 4)	Infantil (n = 4)	Juvenil/Adulto (n = 3)	Juvenil/Adulto (n = 3)	
Fast (%)					
média (dp)	67,9 (12,1)	51,9 (4,7)	47,5 (22,9)	56,3 (5,6)	57,6
mediana	69,6	53,3	60,0	55,5	
mínimo – máximo	52,0 – 80,6	45,3 – 55,7	21,0 – 61,5	51,1 – 62,3	
Comparação	p = 0,049 *		p = 0,577		
Slow (%)					
média (dp)	37,4 (12,9)	48,9 (3,8)	74,2 (26,7)	45,4 (8,7)	44,6
mediana	42,7	49,4	87,0	42,8	
mínimo – máximo	18,2 – 46,0	43,7 – 52,9	43,5 – 92,0	38,3 – 55,2	
Comparação	p = 0,139		p = 0,151		
Relação Fast/Slow					
média (dp)	2,15 (1,29)	1,07 (0,15)	0,78 (0,60)	1,28 (0,35)	1,29
mediana	1,72	1,04	0,69	1,30	
mínimo – máximo	1,13 – 4,02	0,92 – 1,27	0,23 – 1,41	0,93 – 1,63	
Comparação	p = 0,192		p = 0,275		
Ulex					
média (dp)	0,43 (0,10)	0,25 (0,07)	1,39 (0,61)	0,89 (0,40)	1,20
mediana	0,48	0,25	1,20	0,74	
mínimo – máximo	0,28 – 0,50	0,18 – 0,31	0,90 – 2,08	0,60 – 1,35	
Comparação	p = 0,026 *		p = 0,304		

Nas amostras infantis, na comparação entre os grupos Pompe e Controle foram encontrados os seguintes resultados:

- diferença estatisticamente significativa na % de fibras Fast ($p = 0,049$), onde o grupo Pompe apresentou média significativamente maior do que a do grupo Controle;
- diferença não significativa na % de fibras Slow ($p = 0,139$);
- diferença não significativa na Relação Fast/Slow ($p = 0,192$);
- diferença estatisticamente significativa na Ulex ($p = 0,026$), onde o grupo Pompe apresentou média significativamente maior do que a do grupo Controle.

Nas amostras juvenis/adultos, na comparação entre os grupos Pompe e Controle foram encontrados os seguintes resultados:

- diferença não significativa na % de fibras Fast ($p = 0,577$);
- diferença não significativa na % de fibras Slow ($p = 0,151$);
- diferença não significativa na Relação Fast/Slow ($p = 0,275$);
- diferença não significativa na Ulex ($p = 0,304$).

Na comparação dentro de cada grupo quanto à diferença entre a % de fibras Fast e a % de fibras Slow foram encontrados os seguintes resultados:

- diferença não significativa no grupo Pompe Infantil ($p = 0,061$);
- diferença não significativa no grupo Controle Infantil ($p = 0,433$);
- diferença não significativa no grupo Pompe Juvenil/Adulto ($p = 0,408$);
- diferença estatisticamente significativa no grupo Controle Juvenil/Adulto ($p = 0,314$).

Amostra Masculina

Variáveis	Grupos				
	Pompe	Controle	Pompe	Controle	Portador
	Infantil (n = 6)	Infantil (n = 5)	Juvenil/Adulto (n = 6)	Juvenil/Adulto (n = 6)	(n = 3)
Fast (%)					
média (dp)	60,8 (10,7)	53,2 (4,7)	73,1 (10,3)	66,5 (7,1)	68,1 (4,0)
mediana	59,6	54,1	76,2	65,9	65,9
mínimo – máximo	44,0 – 73,8	47,3 – 58,2	54,3 – 84,8	56,1 – 77,5	65,7 – 72,7
Comparação	p = 0,182		p = 0,230		
Slow (%)					
média (dp)	37,2 (6,6)	47,2 (7,7)	32,7 (12,7)	36,4 (4,3)	38,4 (10,3)
mediana	36,6	44,1	29,1	35,6	36,9
mínimo – máximo	27,4 – 47,0	40,5 – 57,9	20,0 – 55,0	31,6 – 44,1	28,9 – 49,4
Comparação	p = 0,045 *		p = 0,521		
Relação Fast/Slow					
média (dp)	1,72 (0,60)	1,16 (0,27)	2,55 (1,00)	1,86 (0,36)	1,88 (0,60)
mediana	1,64	1,23	2,77	1,85	1,78
mínimo – máximo	0,94 – 2,69	0,86 – 1,44	0,99 – 3,79	1,27 – 2,27	1,33 – 2,51
Comparação	p = 0,089		p = 0,161		
Ulex					
média (dp)	0,49 (0,19)	0,19 (0,04)	1,65 (0,66)	1,09 (0,20)	1,26 (0,36)
mediana	0,43	0,19	1,81	1,09	1,33
mínimo – máximo	0,30 – 0,78	0,12 – 0,22	0,79 – 2,27	0,84 – 1,35	0,86 – 1,58
Comparação	p = 0,012 *		p = 0,091		

Nas amostras infantis, na comparação entre os grupos Pompe e Controle foram encontrados os seguintes resultados:

- diferença não significativa na % de fibras Fast ($p = 0,182$);
- diferença estatisticamente significativa na % de fibras Slow ($p = 0,045$), onde o grupo Pompe apresentou média significativamente menor do que a do grupo Controle;
- diferença estatisticamente significativa na Relação Fast/Slow ($p = 0,089$);
- diferença estatisticamente significativa na Ulex ($p = 0,012$), onde o grupo Pompe apresentou média significativamente maior do que a do grupo Controle.

Nas amostras juvenis/adultos, na comparação entre os grupos Pompe e Controle foram encontrados os seguintes resultados:

- diferença não significativa na % de fibras Fast ($p = 0,230$);
- diferença não significativa na % de fibras Slow ($p = 0,521$);
- diferença não significativa na Relação Fast/Slow ($p = 0,161$);
- diferença estatisticamente significativa na Ulex ($p = 0,091$).

Na comparação dentro de cada grupo quanto à diferença entre a % de fibras Fast e a % de fibras Slow foram encontrados os seguintes resultados:

- diferença estatisticamente significativa no grupo Pompe Infantil ($p = 0,020$), com predomínio de fibras Fast;
- diferença não significativa no grupo Controle Infantil ($p = 0,330$);
- diferença estatisticamente significativa no grupo Pompe Juvenil/Adulto ($p = 0,006$), com predomínio de fibras Fast;
- diferença estatisticamente significativa no grupo Controle Juvenil/Adulto ($p = 0,001$), com predomínio de fibras Fast;
- diferença não significativa no grupo Portador ($p = 0,064$).

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amalfitano A, Bengur AR, Morse RP, Majure JM, Case LE, Veerling DL, Mackey J, Kishnani P, Smith W, McVie-Wylie A, Sullivan JA, Hogansen GE, Phillips JA III, Schaefer GB, Charrow J, Ware RE, Bossen EH, Chen Y-T. Recombinant human acid alpha-glucosidase enzyme therapy for infantile glycogen storage disease type II: results of a phase I/II clinical trial. *Genet Med* 2001, 3:132-138.
- Andersen, P., and B. Saltin. Maximal perfusion of skeletal muscle in man. *J. Physiol.* 1985; London 366:233-249.
- Anderson SI, Whatling P, Hudlicka O, Gosling P, Simms M, Brown MD. Chronic transcutaneous electrical stimulation of calf muscles improves functional capacity without inducing systemic inflammation in claudicants. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2004; 27:201-9.
- Auricchio F, Bruni CB, Sica V. Further purification and characterization of the acid alpha-glucosidase. *Biochem J* 1968, 108:161-167.
- Ausems MGEM, Tem Berg K, Kroos MA, Van Diggelen OP, Wevers RA, Poorthuis BJHM, Niezen_Koning KE, Van der Ploeg AT, Beemer FA, Reuser AJJ, Sandkujl LA, Wokke JHJ. Glycogen storage disease type II: birth prevalence agrees with predicted genotype frequency. *Commun Genet* 1999, 2:91-96.
- Ausems MGEM, Verbiest J, Hermans MMP, Kroos MA, Beemer FA, Wokke JHJ, Sandkujl LA, Reuser AJJ, Van der Ploeg AT. Frequency of glycogen storage disease type II in the Netherlands: implications for diagnosis and genetic counselling. *Eur J Hum Genet* 1999, 7(6):713-716.
- Bebout, D.E., M.C. Hogan, S.C. Hempleman, and P.D. Wagner. Effects of training and immobilization on VO₂ and DO₂ in dog gastrocnemius muscle in situ. *J. Appl. Physiol.* 1993;74:1697-1703.
- Beratis NG, LaBadie GU, Hirschhorn K : Characterization of the molecular defect in infantile and adult acid alpha-glucosidase deficiency fibroblasts. *J Clin Invest* 62:1264-1274, 1978.
- Beratis NG, LaBadie GU, Hirschhorn K. An isozyme of acid alpha-glucosidase with reduced catalytic activity for glycogen. *Am J Hum Genet* 1980, 32:137-149.
- Bijvoet AG, Van Hirtum H, Kroos MA, Van de Kamp EHM, Schoneveld O, Visser P, Brakenhoff JPJ, Weggeman M, van Corven EJ, Van der Ploeg AT, Reuser AJJ.

- Human acid α -glucosidase from rabbit milk has therapeutic effect in mice with glycogen storage disease type II. *Hum Mol Genet* 1999, 8:2145-2153.
- Botinelli R, Reggiani C. Human skeletal muscle fibers: molecular and functional diversity. *Prog Bioph Mol Biol* 2000;73:195-262.
- Brook MH, Williamson E, Kaiser KK. The behavior of four fiber types in developing and reinnervated muscle. *Arch Neurol* 1971;25:360–366.
- Carpenter S, Karpati G. Pathology of skeletal muscle. 2^a ed. Oxford University Press; 2001.
- Carvalho CC, Moraes SRA, Chalegre ST, Tashiro T. Quantificação de capilares no tecido muscular esquelético em animais com insuficiência arterial periférica induzida submetidos a treinamento de endurance. *Acta Cir Bras*. 2004;19:487-94.
- Coates D. The angiotensin converting enzyme (ACE). *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;35:769-73.
- Colling-Saltin. Enzyme histochemistry on skeletal muscle of the human foetus, *J Neurol Sci* 1978;39:169-85.
- Costerousse O, Allegrini J, Lopez M, Alhenc-Gelas F. Angiotensin I-converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. *Biochem J*. 1993;290(Pt 1):33-40.
- Danser AH, Schalekamp MA, Bax WA, van den Brink AM, Saxena PR, Riegger GA, *et al*. Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism. *Circulation*. 1995;92:1387-8.
- Delp, M.D., R.M. McAllister, and M.H. Laughlin. Exercise training alters endothelium-dependent vasoreactivity of rat abdominal aorta. *J. Appl. Physiol*. 1993; 75: 1354-1363.
- DiMauro S, Stern LZ, Mehler M, Nagle RB, Payne C. Adult onset acid maltase deficiency: a postmortem study. *Muscle Nerve* 1978, 1:27-36.
- Douglas PS, O'Toole ML, Katz SE, Ginsburg GS, Hiller WD, Laird RH. Left ventricular hypertrophy in athletes. *Am J Cardiol*. 1997;80:1384-8.
- Dragovic T, Minshall R, Jackman HL, Wang LX, Erdos EG. Kininase II-type enzymes. Their putative role in muscle energy metabolism. *Diabetes*. 1996;45(Suppl 1):S34-7.

- Drost MR, Schaart G, van Dijk P, van Capelle CI, van der Vusse GJ, Delhaas T, van der Ploeg AT, Reuser AJ. Both type 1 and type 2a muscle fibers can respond to enzyme therapy in Pompe disease. *Muscle Nerve*. 2008 Feb;37(2):251-5.
- Dubowitz V, Brooke MH. *Muscle biopsy: a practical approach*. London: Baillière Tindall; 1985 p.19-81 e p.34-102.
- Dubowitz V, Pearce AGE. Reciprocal relationship of phosphorylase and oxidative enzymes in skeletal muscle. *Nature* 1960;185:701.
- Dzau VJ. Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation*. 1988;77:I4-13.
- Egginton S, Hudlicka O. Early changes in performance, blood flow and capillary fine structure in rat fast muscles induced by electrical stimulation. *J Physiol*. 1999;515(Pt 1):265-75.
- Egginton S, Hudlicka O. Selective long-term electrical stimulation of fast glycolytic fibres increases capillary supply but not oxidative enzyme activity in rat skeletal muscles. *Exp Physiol*. 2000;85:567-73.
- Engel AG, Gomez MR, Seybold ME, Lambert EH. The spectrum and diagnosis of acid maltase deficiency. *Neurology* 1973, 23:95-106.
- Eriksson PO. Muscle-fibre composition of the human mandibular locomotor system. Enzyme-histochemical and morphological characteristics of functionally different parts. *Swedish Dental Journal* 1982;12:1-44.
- Fukuda T, Ahearn M, Roberts A, Mattaliano RJ, Zaal K, Ralston E, Plotz PH, Raben N. Autophagy and mistargeting of therapeutic enzyme in skeletal muscle in Pompe disease. *Mol Ther*. 2006 Dec;14(6):831-9. Epub 2006 Sep 27.
- Fukuda T, Roberts A, Ahearn M, et al. Autophagy and Lysosomes in Pompe Disease. *Autophagy*; 2006; 2:4, 318-320.
- Gambke B, Rubinstein NA. A monoclonal antibody to the embryonic myosin heavy chain of rat skeletal muscle. *J Biol Chem* 1984; 259:12092-100.
- Ghosh P, Dahms NM, Kornfeld S. Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, 4(3):202-212.
- Ghosh S, Choot GK. Evidence for distinct fast and slow myogenic cell lineages in human foetal muscle. *J Muscle Res Cell Motility* 1998; 19:431-41.

- Green HJ, Pette D. Early metabolic adaptations of rabbit fast-twitch muscle to chronic low-frequency stimulation. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1997; 75:418-24.
- Hagberg JM, Ferrell RE, McCole SD, Wilund KR, Moore GE. VO₂ max is associated with ACE genotype in postmenopausal women. *J Appl Physiol*. 1998;85: 1842-6.
- Hagemans ML, Winkel LP, Van Doorn PA, *et al*. Clinical manifestation and natural course of late-onset Pompe's disease in 54 Dutch patients. *Brain* 2005;128:671-7.
- Hansen-Smith F, Egginton S, Hudlicka O. Growth of arterioles in chronically stimulated adult rat skeletal muscle. *Microcirculation*. 1998; 5:49-59.
- Hermans MM, De Graaff E, Kroos MA, Mohkamsing S, Eussen BJ, Joosse M, Willemsen R, Kleijer WJ, Oostra BA, Reuser AJ. The effect of a single base pair deletion (delta T525) and a C1634T missense mutation (pro545leu) on the expression of lysosomal alpha-glucosidase in patients with glycogen storage disease type II. *Hum Mol Genet*. 1994, 3:2213-2218.
- Hermans MM, Graaff E, Kroos MA, Wisselaar HA, Willemsen R, Oostra BA, Reuser AJJ. The conservative substitution Asp-645-Glu in lysosomal α -glucosidase affects transport and phosphorylation of the enzyme in an adult patient with glycogen-storage disease type II. *Biochem J* 1993, 289:687-693.
- Hermans MM, Wisselaar HA, Kroos MA, Oostra BA, Reuser AJ. Human lysosomal alpha-glucosidase: functional characterization of the glycosylation sites. *Biochem J*. 1993, 289:681-686.
- Hermans MMP, Kroos MA, van Beeumen J, Oostra BA, Reuser AJJ. Human lysosomal alpha-glucosidase: characterization of the catalytic site. *J Biol Chem* 1991, 266:13507-13512.
- Hermans MMP, Leenen D, Kroos MA, Beesley CE, Ploeg ATV, Sakuraba H, Wevers R, Kleijer W, Michelakakis H, Kirk EP, Fletcher J, Bosshard N, Basel-Vanagaite L, Beesley G, Reuser AJJ. Twenty-two novel mutations in the lysosomal α -glucosidase gene (GAA) underscore the genotype-phenotype correlation in glycogen storage disease type II. *Hum Mut* 2004, 23:47-56.
- Hernandez D, de la Rosa A, Barragan A, Barrios Y, Salido E, Torres A, *et al*. The ACE/DD genotype is associated with the extent of exercise-induced left ventricular growth in endurance athletes. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42:527-32.

- Higaki J, Aoki M, Morishita R, Kida I, Taniyama Y, Tomita N, *et al.* In vivo evidence of the importance of cardiac angiotensin-converting enzyme in the pathogenesis of cardiac hypertrophy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:428-34.
- Hirschhorn R, Reuser AJJ. Glycogen storage disease type II: Acid alpha-glucosidase (acid maltase) deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th Ed. New York: McGraw-Hill 2001:3389-3420.
- Hoefsloot LH, Hoogeveen-Westerveld M, Reuser AJJ, Oostra BA. Characterization of the human lysosomal alpha-glucosidase gene. *Biochem J* 1990;272:493-497.
- Hoppeler H, Vogt M. Muscle tissue adaptations to hypoxia. *J Exp Biol.* 2001;204(Pt 18):3133-9. Review.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29:577-580.
- Hudlicka O, Brown M, Cotter M, Smith M, Vrbova G. The effect of long-term stimulation of fast muscles on their blood flow, metabolism and ability to withstand fatigue. *Pflügers Arch.* 1977;369:141-9.
- Hudlicka O, Brown M, Egginton S. Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiol Rev.* 1992;72: 369-417.
- Hudlicka O, Brown MD, Egginton S, Dawson JM. Effect of long-term electrical stimulation on vascular supply and fatigue in chronically ischemic muscles. *J Appl Physiol.* 1994; 77:1317-24.
- Hudlicka O, Dodd L, Renkin EM, Gray SD. Early changes in fiber profile and capillary density in long-term stimulated muscles. *Am J Physiol.* 1982;243:H528-35.
- Hudlicka O, Milkiewicz M, Cotter MA, Brown MD. Hypoxia and expression of VEGF-A protein in relation to capillary growth in electrically stimulated rat and rabbit skeletal muscles. *Exp Physiol.* 2002;87: 373-81.
- Hudlicka O, Price S. The role of blood flow and/or muscle hypoxia in capillary growth in chronically stimulated fast muscles. *Pflügers Arch.* 1990; 417:67-72.
- Hudlicka O, Tyler KR. The effect of long-term high-frequency stimulation on capillary density and fibre types in rabbit fast muscles. *J Physiol.* 1984; 353:435-45.

- Huie ML, Chen AS, Tsujino S, Shanske S, DiMauro S, Engel AG, Hirschhorn R. Aberrant splicing in adult onset glycogen storage disease type II (GSDII): molecular identification of an IVS1 (-13T-->G) mutation in a majority of patients and a novel IVS10 (+1GT-->CT) mutation. *Hum Mol Genet.* 1994, 3:2231-2236.
- Huie ML, Menaker M, McAlpine PJ, Hirschhorn R. Identification of an E689K substitution as the molecular basis of the human acid alpha glucosidase type 4 allozyme (GAA*4). *Ann Hum Genet* 1996, 60:365-368.
- Jonsson JR, Game PA, Head RJ, Frewin DB. The expression and localization of the angiotensin-converting enzyme mRNA in human adipose tissue. *Blood Press.* 1994;3:72-5.
- Kauma H, Ikaheimo M, Savolainen MJ, Kiema TR, Rantala AO, Lilja M, *et al.* Variants of renin-angiotensin system genes and echocardiographic left ventricular mass. *Eur Heart J.* 1998;19:1109-17.
- Kelly AM, Rubinstein NA. The diversity of muscle fiber types and its origin during development. In: Engel GA, Franzini-Armstrong C Eds. *Myology 2.* New York: McGraw-Hill; 1994. p.119-33.
- Kinugawa T, Ogino K, Miyakoda H, Saitoh M, Hisatome I, Fujimoto Y, *et al.* Responses of catecholamines, renin-angiotensin system, and atrial natriuretic peptide to exercise in untrained men and women. *Gen Pharmacol.* 1997;28:225-8.
- Kishnani P, Voit T, Nicolino M, *et al.* Treatment of classical infantile Pompe disease (CIPD) with recombinant human acid α -glucosidase (rhGAA): preliminary 6 months data from a Phase 2 study. *Am J Hum Genet* 2002, 71:582.
- Kishnani PS, Howeli RR. Pompe disease in infants and children. *J Pediatr.* 2004;144(5):35-43.
- Kishnani PS, Steiner RD, Bali D, *et al.* Pompe disease diagnosis and management guideline. *Genet Med* 2006;8:267-288.
- Klumperman J, Fransen JAM, Tager JM, Ginsel LA. The cation-independent mannose 6-phosphate receptor is not involved in the polarized secretion of lysosomal alpha-glucosidase from Caco-2 cells. *Eur J Cell Biol* 1992, 57:147-154.
- Koeberl DD, Kishnani PS, Chen YT. Glycogen storage disease types I and II: Treatment updates. *J Inherit Metab Dis* 2007;30:159-164.

- Korfage JAM, Koolstra JH, Langenbach GEJ, Van Eijden TMGJ. Fiber-type composition of the human jaw muscles – (Part 1). Origin and functional significance of fiber-type diversity. *J Dent Res* 2005; 84 (9): 774-783.
- Kroos M, Pomponio RJ, Van Vliet L, Palmer RE, Phipps M, Van der Helm R, Halley D, Reuser A e GAA Database Consortium. Update of the Pompe disease mutation database with 107 sequence variants and a format for severity rating. *Human Mutation* 2008;29:E13-E26.
- Kroos MA, Van der Kraan M, Van Diggelen OP, Kleijer WJ, Reuser AJ, Van den Boogaard MJ, Ausems MG, Ploos van Amstel HK, Poenaru L, Nicolino M, *et al.* Glycogen storage disease type II: frequency of three common mutant alleles and their associated clinical phenotypes studied in 121 patients. *J Med Genet.* 1995, 32:836-837.
- Kuo W-L, Hirschhorn R, Huie ML, Hirschhorn K. Localization and ordering of acid alpha-glucosidase (GAA) and thymidine kinase (TK1) by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genetic* 1996, 97:404-406.
- Lin CY, Hwang B, Hsiao KJ, Jin YR. Pompe's disease in chinese and the prenatal diagnosis by determination of alpha-glucosidase activity. *J Inherit Metab Dis* 1987, 10:11-17.
- Lin MH, Tseng CH, Tseng CC, Huang CH, Chong CK, Tseng CP. Real-time PCR for rapid genotyping of angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism. *Clin Biochem* 2001; 34:661-6.
- Lindpaintner K, Pfeiffer MA, Kreutz R, Stampfer MJ, Grodstein F, LaMotte F *et al.* A prospective evaluation of an angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med* 1995; 332:706-11.
- Linhart A, Sedlacek K, Jachymova M, Jindra A, Beran S, Vondracek V, *et al.* Lack of association of angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen genes polymorphisms with left ventricular structure in young normotensive men. *Blood Press.* 2000;9:47-51.
- Martin JJ, De Barsey T, Van Hoof F, Palladini G. Pompe's disease: an inborn lysosomal disorder with storage of glycogen. A study of brain and striated muscle. *Acta Neuropathol (Berl)* 1973, 23:229-244.

- Martiniuk F, Bodlkin M, Tzall S, Hirschhorn R. Isolation and partial characterization of the structural gene for human acid α -glucosidase. *DNA Cell Biol* 1991, 10:283-292.
- Martiniuk F, Chen A, Mack A, Arvanitopoulos E, Chen Y, Romm WN, Codd WJ, Hanna B, Alcabes P, Raben N, Plotz P. Carrier frequency for glycogen storage disease type II in New York and estimates of affected individuals born with the disease. *Am J Med Genet* 1998;79(1):69-72.
- Martiniuk F, Mehler, Tzall S, Meredith G, Hirschhorn R. Sequence of the cDNA and 5'-flanking region for human acid α -glucosidase, detection of an intron in 5' untranslated leader sequence, definition of 18-nt polymorphisms, and differences with previous cDNA and amino acid sequences. *DNA Cell Biol* 1990, 9:85-94.
- McGuigan MR, Bronks R, Newton RU, et al. Muscle fiber characteristics in patients with peripheral arterial disease. *Med Sci Sports Exerc.* 2001;33: 2016-21.
- Mense S. Peripheral mechanism of muscle nociception and local muscle pain. *J Musculo Skeletal Pain* 1992; 1:101-28.
- Milkiewicz M, Hudlicka O, Verhaeg J, Egginton S, Brown MD. Differential expression of Flk-1 and Flt-1 in rat skeletal muscle in response to chronic ischaemia: favourable effect of muscle activity. *Clin Sci (Lond).* 2003;105: 473-82.
- Montalvo ALE, Cariati R, Deganuto M, Guerci V, Garcia R, Ciana G, Bembi B, Pittis MG. Glycogenosis type II: identification and expression of three novel mutations in the acid α -glucosidase gene causing the infantile form of the disease. *Mol Genet and Metab* 2004, 81:203-208.
- Montgomery HE, Clarkson O, Dollery CM, Prasad K, Losi MA, Hemingway H, Statters D, Jubb M, Girvain M, Varnava A, World M, Deanfield J, Talmud P, McEwan JR, McKenna WJ, Humphries S. Association of angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism with change in left ventricular mass in response to physical training. *Circulation* 1997;96:741-747.
- Montgomery HE, Marshall R, Hemingway H, Myerson S, Clarkson P, Dollery C, Hayward M, Holliman DE, Jubb M, World M, Thomas EL *et al.* Human gene for physical performance. *Nature* 1998;393:221-222.

- Moreland RJ, Jin X, Zhang XK, Decker RW, Albee KL, Lee KL, Cauthron, RD, Brewer K, Edmunds T, Canfield WM Lysosomal acid alpha-glucosidase consists of four different peptides processed from a single chain precursor." J Biol Chem 2005 280(8): 6780-91.
- Myerson S, Hemingway H, Budget R, Martin J, Humphries S, Montgomery H. Human angiotensin I-converting enzyme gene and endurance performance. J Appl Physiol. 1999;87:1313-6.
- Myerson SG, Montgomery HE, Whittingham M, Budget R, Martin J, Humphries S, *et al.* Left ventricular hypertrophy with exercise and ACE gene insertion/deletion polymorphism: a randomized controlled trial with losartan. Circulation. 2001; 103:226-30.
- Nickel BE, McAlpine PJ. Extension of human acid alpha-glucosidase polymorphism by isoelectric focusing in acrylamide gel. Ann Hum Genet 1982, 46: 97-103.
- Oba-Shinjo SM, Andrade FG, Silva R, Ciociola KM, Palmer, RE, Pomponio RJ, Porta G *et al.* Pompe disease in a Brazilian series: clinical ad molecular analyses with identification of 9 new mutations. *Submitted* in 2008.
- Oude-Elferink RPJ, Fransen JAM, Klumperman J, Ginsel LA, Tager JM. Secretion of a precursor form of lysosomal alpha glucosidase from the brush border of human kidney proximal tubule cells. Eur J Cell Biol 1989, 50:299-303.
- Paul MH & Sperling E. The cyclophorase system: correlation of cyclophorase activity and the mitochondrial density in striated muscle. Proceedings of the society for experimental biology and medicine 1952;79:352.
- Payne J, Montgomery H. The renin-angiotensin system and physical performance. Biochem Soc Trans. 2003;31:1286-9.
- Pearce SC, Hudlicka O, Brown MD. Effect of indomethacin on capillary growth and microvasculature in chronically stimulated rat skeletal muscles. J Physiol. 2000; 526 Pt 2:435-43.
- Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. Microsc Res Tech. 2000 Sep 15;50(6):500-9. Review.

- Pipo JR, Feng J-H, Yamamoto T, Ohsaki Y, Nanba E, Tsujino S, Sakuragawa N, Martiniuk F, Ninomiya H, Oka A, Ohno K. New GAA mutations in Japanese patients with GSDII (Pompe disease). *Pediatr Neurol* 2003, 29:284-287.
- Pittis MG, Montalvo ALE, Miocic S, Martini C, Deganuto M, Candusso M, Ciana G, Bembi B. Identification of four novel mutations in the alpha glucosidase gene in five Italian patients with infantile onset glycogen storage disease type II. *Am J Med Genet* 2003, 121A:225-230.
- Qu Z, Andersen JL, Zhou S. Visualisation of capillaries in human skeletal muscle. *Histochem Cell Biol* 1997; 107:169-174.
- Raben N, Danon M, Gilbert AL, et al. Enzyme replacement therapy in the mouse model of Pompe disease. *Molecular Genetics and Metabolism* 2003;80 159 –169.
- Raben N, Fukuda T, Gilbert AL, Jong D, Thurberg BL, Mattaliano RJ, Meikle P, Hopwood JJ, Nagashima K, Nagaraju K, Plotz PH. Replacing acid α -glucosidase in Pompe disease: recombinant and transgenic enzymes are equipotent, but neither completely clears glycogen from type II muscle fibers. *Mol Therapy* 2005, 11:48-56.
- Raben N, Nichols RC, Boerkoel C, Plotz P. Genetic defects in patients with glycogenosis type II (acid maltase deficiency). *Muscle Nerve* 1995; Suppl 3;S70-S74.
- Raben N, Plotz P, Byrne BJ. Acid α -glucosidase deficiency (glycogenosis type II, Pompe disease). *Curr Mol Med*. 2002;2:145-166.
- Raben N, Takikita S, Pittis MG, Bembi B, Marie SK, Roberts A, Page L, Kishnani PS, Schoser BG, Chien YH, Ralston E, Nagaraju K, Plotz PH. Deconstructing Pompe disease by analyzing single muscle fibers: to see a world in a grain of sand... *Autophagy*. 2007 Nov-Dec;3(6):546-52.
- Rankinen T, Perusse L, Gagnon J, Chagnon YC, Leon AC, Skinner JS, et al. Angiotensin-converting enzyme ID polymorphism and fitness phenotype in the HERITAGE Family Study. *J Appl Physiol*. 2000;88:1029-35.
- Saltin, B, and P.D. Gollnick. Skeletal muscle adaptability: significance for metabolism and performance. In: L.D. Peachey (ed.) *Handbook of Physiology*, Sec. 10, Skeletal Muscle, Baltimore, MD: Williams and Wilkins. 1983; pp. 555-631.

- Saltin, B., K. Nazar, D.L. Costill, E. Stein, E. Jansson, B. Essen, and P.D. Gollnick. The nature of the training response: peripheral and central adaptations of one-legged exercise. *Acta Physiol. Scand.* 1976;96:289-305.
- Schmalbruch H. Skeletal muscle. In: *Handbook of microscopic anatomy, Part 6. Vol. 2.* (editado por Oksche A, Vollrath L) Berlin: Springer-Verlag 1985.
- Schoser BGH, Müller-Höcker J, Horvath R, Gempel K, Pongratz D, Lochmüller H e Müller-Felber W. Adult-onset glycogen storage disease type 2: clinico-pathological phenotype revisited. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 2007; 33:544-559.
- Segal, S.S. Cell-to-cell communication coordinates blood flow control. *Hypertension* 1994; 23:1113-1120.
- Sehested M, Hou-Jensen K. Factor VIII related antigen as an endothelial cell marker in benign and malignant diseases. *Virchows Arch* 1981;391:217-225.
- Shieh J-J, Lin C-Y. Frequent mutation in Chinese patients with infantile type of GSDII in Taiwan: evidence for a founder effect. *Hum Mutat* 1998, 11:306-312.
- Shieh JJ, Wang LY, Lin CY. Point mutation in Pompe disease in Chinese. *J Inher Metab Dis.* 1994;17:145-148.
- Sipos J, McFarlane BM, Williams R, McFarlane IG. Sensitive avidin biotin based technique for identifying liver membrane antigens in tissue sections. *J Clin Pathol* 1988; 41:1217-1222.
- Skorjanc D, Jaschinski F, Heine G, Pette D. Sequential increases in capillarization and mitochondrial enzymes in low-frequency-stimulated rabbit muscle. *Am J Physiol.* 1998; 274 (3 Pt 1):C810-8.
- Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J Neurosci.* 1999;19: 5731-40.
- Stal P, Eriksson PO, Eriksson A, Thornell LE. Enzyme-histochemical differences in fibre type between the human major and minor zygomatic and first dorsal interosseus muscle. *Archives of Oral Biology* 1987;32:833-841.
- Stephenson TJ, Griffiths DWR, Mills PM. Comparison of Ulex europaeus I lectin binding and factor VIII-related antigen as markers of vascular endothelium in follicular carcinoma of the thyroid. *Histopathology* 1986; 10:251-260.

- Thurberg BL, Maloney CL, Vaccaro C, Afonso K, et al. Characterization of pre- and post-treatment pathology after enzyme replacement therapy for pompe disease. *Laboratory Investigation* (2006) 86, 1208–1220.
- Tinball JG. Desmin at myotendinous junctions. *Exper Cell Res*, v.199, p.206-12; 1992.
- Touyz RM, Deng LY, He G, Wu XH, Schiffrin EL. Angiotensin II stimulates DNA and protein synthesis in vascular smooth muscle cells from human arteries: role of extracellular signal-regulated kinases. *J Hypertens*. 1999;17:907-16.
- Tsuji A, Omura K, Suzuki Y. Intracellular transport of acid alpha-glucosidase in human fibroblasts: evidence for involvement of phosphomannosyl receptor-independent system. *J Biochem (Tokyo)* 1988, 104:276-278.
- Tsujino S, Huie M, Kanazawa N, Sugie H, Goto Y, Kawai M, Nonaka I, Hirschhorn R, Sakuragawa N. Frequent mutations in Japanese patients with acid maltase deficiency. *Neuromuscul Disord*. 2000;10 :599-603.
- Umapathysivam, K.; Hopwood, J.J.; Meikle, P.J. Determination of acid α -glucosidase activity in blood spots as a diagnostic test for Pompe disease. *Clin. Chem* 2001;47(8): 1378-83.
- Van der Kraan M, Kroos MA, Joosse M, Bijvoet AG, Verbeet MP, Kleijer WJ, Reuser AJ. Deletion of exon 18 is a frequent mutation in glycogen storage disease type II. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994, 203:1535-1541.
- Van der Ploeg AT, Hoefsloot LH, Hoogeveen-Westerveld M, Petersen EM, Reuser AJJ. Glycogenosis type II: protein and DNA analysis in five South African families from various ethnic origins. *A M J Hum Genet* 44:787-793, 1989.
- Van der Ploeg AT, Winkel LPF, van Diggelen OP et al. Preliminary findings in patients with late onset Pompe's disease treated with recombinant human α -glucosidase from rabbit milk. *J Inherit Metab* 2002, 25:118.
- Van Hove JL, Yang HW, Wu JY, Brady RO, Chen YT. High-level production of recombinant human lysosomal acid α -glucosidase in Chinese hamster ovary cells which targets to heart muscle and corrects glycogen accumulation in fibroblasts from patients with Pompe disease. *PNAS USA* 1996, 93:65-70.
- Van Meir N, De Smet L. Carpal tunnel syndrome in children. *Acta Orthop Belg* 2003; 69 5):387-95.

- Vogt M, Puntschart A, Geiser J, Zuleger C, Billeter R, Hoppeler H. Molecular adaptations in human skeletal muscle to endurance training under simulated hypoxic conditions. *J Appl Physiol*. 2001;91(1):173-82.
- Wang X, Kochetkova I, Haddad A, Teri H, Hone DM, Pascual DW. Transgene vaccination using *Ulex europaeus* agglutinin I (UEA-1) for target mucosal immunization against HIV-1 envelope. *Vaccine* 2005;23:3836-3842.
- Willemsen R, Brunken R, Sorber CWJ, Hoogeveen AT, Wisselaar HA, Van Dongen JM, Reuser AJJ. A quantitative immunoelectron-microscopic study on soluble, membrane-associated with membrane-bound lysosomal enzymes in human intestinal epithelial cells. *Histochem J* 1991, 23:467-473.
- Williams AG, Rayson MP, Jubb M, World M, Woods DR, Hayward M, *et al*. The ACE gene and muscle performance. *Nature*. 2000;403:614.
- Winkel LPF, Van den Hout JM, Kamphoven JH, *et al*. Enzyme replacement therapy in late-onset Pompe's disease: a three-year follow-up. *Ann Neurol* 2004, 55:495-502.
- Wisselaar HA, Kroos MA, Hermans MM, van Beeumen J, Reuser AJ. Structural and functional changes of lysosomal acid alpha-glucosidase during intracellular transport and maturation. *J Biol Chem*. 1993, 268:2223-2231.
- Yang, H.T., R.W. Ogilve, and R.L. Terjung. Peripheral adaptations in trained aged rats with femoral artery stenosis. *Circ. Res*. 1994;74:223-243.
- Yu F, Degens H, Larsson L. The influence of thyroid hormone on myosin isoform composition and shortening velocity of single skeletal muscle fibres with special reference to ageing and gender. *Acta Physiol Scand*. 1999;167(4):313-6. Review.
- Zhang B, Tanaka H, Shono N, Miura S, Kiyonaga A, Shindo M, *et al*. The I allele of the angiotensin-converting enzyme gene is associated with an increased percentage of slow-twitch type I fibers in human skeletal muscle. *Clin Genet*. 2003; 63:139-44.
- Zhao G, Bernstein RD, Hintze TH. Nitric oxide and oxygen utilization: exercise, heart failure and diabetes. *Coron Artery Dis*. 1999;10:315-20.