Clara Gontijo Camelo

Estudo clínico e molecular de pacientes com distrofia muscular relacionada ao gene LAMA2

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

Programa de Neurologia

Orientadora: Profa. Dra. Umbertina Conti Reed

São Paulo

2022

Clara Gontijo Camelo

Estudo clínico e molecular de pacientes com distrofia muscular relacionada ao gene LAMA2

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

Programa de Neurologia

Orientadora: Profa. Dra. Umbertina Conti Reed

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Camelo, Clara Gontijo
Estudo clínico e molecular de pacientes com distrofia muscular relacionada ao gene LAMA2 / Clara Gontijo Camelo. -- São Paulo, 2022.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Neurologia.
Orientadora: Umbertina Conti Reed.

Descritores: 1.Distrofias musculares 2.Distrofia muscular congênita 3.Merosina 4.Sistema nervoso central 5.Genótipo 6.Fenótipo 7.Epilepsia 8.Deficiência intelectual 9.História natural das doenças

USP/FM/DBD-473/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Dedico esse trabalho ao ***Dudu***, cuja companhia leve e feliz preenche meus dias com amor.

Aos meus pais, ***Suzana*** e ***Felipe***, por sempre apoiarem meus sonhos, me encherem de carinho, valorizarem minha educação e abdicarem do próprio conforto para me verem bem.

À ***Laura***, ***Fernanda*** e ***Jeff*** por sempre torcerem por mim e serem a melhor companhia

À ***Deus*** pela vida e pelos pequenos milagres do dia a dia.

Por fim, mas não menos importante, dedico essa tese aos ***pacientes e suas famílias***. Obrigada por confiarem em mim e no meu trabalho.

Agradecimentos

Agradeço ao ***Prof. Edmar***, meu coorientador e amigo, cuja generosidade sempre me surpreende. Obrigada pelo acolhimento e por tantas portas abertas. Serei sempre grata pelo conhecimento e felicidade compartilhados.

À ***Prof.ª Umbertina***, por ser o exemplo de capacidade técnica, humildade e retidão de caráter. Sou muito feliz e honrada por ser sua aluna.

À ***Mari,*** por ter participado ativamente deste trabalho, avaliando em conjunto os pacientes e sendo essencial no cuidado deles. Mais do que isso, por ter sido a minha primeira grande amiga em São Paulo.

À ***Cris***, por pacientemente ter me ensinado genética e por ter se tornado mais que parceira de vários projetos, mas uma amiga.

Ao ***André,*** por sempre ter me dado oportunidades de crescer profissionalmente, por ser uma ótima companhia e um excelente sócio.

Agradeço aos meus colegas e amigos do ambulatório de doenças neuromusculares que participaram ativamente da minha formação e tornaram a Universidade de São Paulo a minha segunda casa: ***Drª. Mary, Alulin***, ***Ana Lucila***, ***Rodrigo, Pedro, Dr. Marco***, ***Eliene***, ***Wagner Cid***, ***Ciro, Lucas, José Pedro***, ***Karlla*** e ***Michelle***.

Agradeço aos vários Neurologistas Infantis, Neurologistas e Pediatras essenciais para a minha formação, em especial: ***André, Karina, Dr. Luis Fernando, Dr. Fernando Kok, Dra. Susana Quijano-Roy, Dr. Sidnei, Renata Paolilo, Paty Takahashi e Polly*** e às minhas amigas dessa caminhada: ***Rai, Ju, Ana, Raquel e Camila.***

Agradeço ao ***Dudu***, por ser sempre paciente e amoroso e por ter me apoiado de forma inquestionável nesses últimos quatro anos. Cada linha e estatística desse trabalho levam você junto! Te amo!

Agradeço à minha família sensacional, que sempre preencheu minha vida com amor e apoio incondicionais. ***Pai e mãe***, amo vocês!

Agradeço à minha irmã, ***Laura***, por ser minha grande amiga, melhor companhia e alma gêmea.

Agradeço também à ***Fernanda***, minha amiga-irmã, por estar sempre ao meu lado, ser a amiga mais fiel, com quem eu mais gosto de dividir risadas e perrengues.

Agradeço ao ***Jeff*** e meus amigos de Belo Horizonte e de São Paulo por tornarem minha vida mais feliz!

A todos os ***pacientes e suas famílias***, obrigada pela confiança e ensinamentos que vão além da Medicina.

“Success is not final; failure is not fatal: it is the courage to continue that counts”

Winston Churchill

Normatização adotada

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

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

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

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

Sumário

Lista de Siglas
Lista de Abreviaturas
Lista de Figuras
Lista de Tabelas
Lista de Gráficos
Resumo
Abstract
1 Introdução
1.1 Distrofia muscular congênita: conceito e classificação..... 1
1.2 Base etiopatogênica..... 1
1.3 Características fenotípicas da distrofia muscular por mutação no *LAMA2* (DM-LAMA2)..... 4
1.4 Epidemiologia..... 6
1.5 Biópsia muscular..... 7
1.6 Alterações do sistema nervoso central e periférico..... 7
1.7 Fisiopatologia
1.7.1 Sistema Nervoso Central..... 8
1.7.2 Músculo e matriz extracelular..... 9
1.8 Correlação Genótipo-Fenótipo..... 12

2 Justificativa do Estudo..... 14

3 Objetivos
3.1 Geral..... 15
3.2 Específico..... 15

4 Métodos
4.1 Critérios de inclusão..... 16
4.2 Critérios de exclusão..... 16
4.3 Quadro clinico
4.3.1 Escalas Motoras..... 17
4.3.2 Avaliação respiratória..... 19
4.3.3 Avaliação da cognição e epilepsia..... 20
4.4 Exames subsidiários
4.4.1 RNM de Encéfalo..... 20
4.5 Análise histológica..... 21
4.6 Teste genético..... 23
4.7 Análise estatística..... 25

5 Resultados
5.1 Aspectos clínicos..... 27
5.1.1 Sintomas perinatais..... 28
5.2 Características clínicas da doença..... 29
5.3 Avaliação da epilepsia e deficiência intelectual..... 32
5.4 Alterações gastrointestinais..... 33
5.5 Alterações cardíacas..... 33

5.6 Internações, infecções respiratórias e óbitos..... 34
5.7 Avaliação respiratória..... 34
5.8 Avaliação da força muscular..... 37
5.8.1 Força da musculatura extrínseca dos olhos e da face..... 41
5.9 Goniometria..... 42
5.10 Escoliose..... 44
5.11 Exames complementares
5.11.1 CPK..... 45
5.11.2 Eletroneuromiografia..... 45
5.12 Ressonância magnética de encéfalo..... 46
5.13 Bióspia muscular..... 50
5.14 Genótipo..... 53
5.15 Correlação genótipo-fenótipo..... 64

6 Discussão
6.1 Quadro clínico e exames prévios..... 70
6.2 DM-LAMA2 e a progressão da doença..... 72
6.3 DM-LAMA2 e alterações no SNC..... 76
6.4 DM-LAMA2 e alterações histológicas..... 80
6.5 Genótipo..... 81
6.6 Relação genótipo-fenótipo..... 83
6.7 DM-LAMA2 e hipoglicemia..... 85

7 Conclusões..... 90

8 Anexos..... 91

9 Referências..... 102

Lista de Abreviaturas

ATPase	Adenosina trifosfatase
BAM	Do inglês, binary alignment map
BiPAP	Do inglês, bilevel positive airway pressure
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CNV	Do inglês*, copy number variation*
COX	Citocromo oxidase
CPK	Creatina fosfoquinase
CPT	Capacidade pulmonar total
CVF	Capacidade vital forçada
DG	Distroglicana
DM	Distrofia muscular
DMC	Distrofia muscular congênita
DP	Desvio Padrão
DNA	Do inglês, deoxyribonucleic acid
ECG	Eletrocardiograma
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EVS	Do inglês, Exome Variant Server
FLAIR	Fluid attenuated inversion recovery
GO	Tricrômico de Gömöri
GTPase	Guanina trifosfatase
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
HE	Hematoxilina e eosina
HGMD	Do inglês, Human Genome Mutation Database
HLA	Do inglês, human leukocyte antigen
IC	Intervalo de Confiança
LIM	Laboratório de Investigações Médicas
LOVD	Do inglês, Leiden Open Variation Database
MFM	Do Inglês, Motor Function Measure
MLPA	Do inglês, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MRC	Do inglês, Medical Research Council
MOCA	Montreal Cognitive Acessment
NADH-TR	Nicotinamida adenina trinucleotídeo tetrazolium redutase
NGS	Sequenciamento de nova geração
OMIM	Do inglês, Online Mendelian Inheritance in Men
OR	Odds Ratio
PAS	Do inglês, periodic acid Schiff
PCR	Do inglês, polymerase chain reaction
PSB	Solução tampão salina
RNA	Ribonucleic acid
RNM	Ressonância Magnética
RULM	Do Inglês, Revised Upper Limp Module
SDH	Succinato desidrogenase
SG	Sarcoglicana

TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEA	Transtorno do espectro do autismo
TFP	Teste de função pulmonar
VCF	Do inglês, Variant Call Format
VNI	Ventilação não invasiva

Lista de Siglas

µg	Micrograma
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
pmol	Picomolar
U	Unidade de medida
µL	Microlitro
µM	Micromolar

Lista de Figuras

Figura 1 Complexo protéico distrofina-glicoproteínas associadas ao sarcolema e a matriz extracelular. SG (Sarcoglicana); DG (Distroglicana); SSPN (Sarcospan); (Holmberg and Durbeej 2013)..... 3

Figura 2 (A) Representação gráfica da proteína Laminina-211 (Fonte: Yurtchenko 2019), em vermelho está a porção alpha-2, em verde a beta-1 e em azul a gama-1. Os domínios estão representados por LN, LCC e LG. (B) Diferentes tecidos em que a laminina-α2 se expressa (Fonte: The Human Protein Atlas), (C) Os quatro transcritos conhecidos do gene *LAMA2*, sendo três muito semelhantes entre si (Fonte: Ensembl)..... 11

Figura 3 Fluxograma da seleção de pacientes para o estudo..... 27

Figura 4 Manifestações perinatais dos pacientes com DM-LAMA2... 29

Figura 5 Número de pacientes com DM-LAMA2 de acordo com a habilidade motora..... 30

Figura 6 Diferentes apresentações fenotípicas dos pacientes com DM-LAMA2. A) Paciente de 8 anos que nunca se sentou. B) Paciente com a forma de apresentação mais comum; capaz de sentar-se sem apoio. C) Paciente com a forma congênita que adquiriu a marcha. D) Paciente com a forma de apresentação de distrofia muscular de cinturas, assemelhando-se a um fenótipo de distrofia muscular de Emery-Dreifuss..... 31

Figura 7 Comparação da idade de aquisição de marcos motores entre os dois grupos de pacientes. A) Idade de aquisição do sustento cefálico (p=0.003), e B) Idade de aquisição da habilidade de sentar-se sem apoio (p<0.001). Os pontos fora da curva representam pacientes com fenótipo mais grave. Os dados foram transformados em log para tornar a distribuição normal (Teste t de Welch)..... 32

Figura 8 Fluxograma dos pacientes que realizaram avaliação de função pulmonar através da espirometria..... 35

Figura 9 (A) Redução da CVF de acordo com a idade entre os pacientes DM-LAMA2 não deambulantes (p=0.006, com

redução de 1,85% da CVF/ano) (B) Redução da CVF de acordo com a idade entre os pacientes deambulantes (p=0.028, com redução de 0.98% da CVF/ano)..... 36

Figura 10 Necessidade de ventilação não invasiva, de acordo com a idade, em pacientes com DM-LAMA2 não deambulantes.. 37

Figura 11 Piora progressiva da força na dimensão D2 da MFM (Função motora proximal e axial) de acordo com a idade (2-25 anos) em pacientes com DM-LAMA2 não deambulantes (com redução de 4,2% de função/ano, p<0.00001)..... 38

Figura 12 Piora progressiva da força na dimensão D3 da MFM (Função motora distal) em pacientes com DM-LAMA2 não deambulantes de acordo com a idade (2-25 anos) com redução de 2.6% de função/ano (p<0.0001)..... 39

Figura 13 Piora progressiva da força muscular no total da MFM de pacientes com DM-LAMA2 não deambulantes de acordo com a idade (5-25 anos, média 10,8) (redução 2,7% de função/ano, p<0.0001)..... 39

Figura 14 Pontuação de força na escala MFM32, de acordo com a idade, entre os pacientes com DM-LAMA2 deambulantes. (A) domínio D1 (+1,64%/ano, p=0.40); (B) domínio D2 (-0.09%/ano, p=0.85); (C) domínio D3 (+1,84%/ano, p=0.16); (D) Total (+0.55%/ano, p=0.4)..... 40

Figura 15 Pontuação na escala RULM de pacientes com DM-LAMA2 não deambulantes de acordo com a idade (p=0.244, redução 0.36 pontos de função/ano)..... 41

Figura 16 Progressão da piora das retrações de cotovelos e joelhos, de acordo com a idade e com a capacidade motora máxima. (A) Piora de 3,22 graus/ano nos cotovelos (p=0,00087) e de (B) 1,92 graus/ano nos joelhos (p=0,1) dentre os pacientes não deambulantes. (C) Piora de 1,41 graus/ano nos cotovelos (p=0.0003) e de (D) 1,95 graus/ano nos joelhos (p=0,01) dentre os pacientes deambulantes..... 43

Figura 17 Evolução da escoliose, de acordo com a idade, em pacientes com DM-LAMA2 não deambulantes..... 44

Figura 18 Progressão da escoliose nos pacientes com DM-LAMA2 não deambulantes de acordo com a idade. (A) paciente de 4 anos, (B) paciente de 9 anos e (C) paciente de 12 anos... 45

Figura 19 Comparação do envolvimento da substância branca encefálica com quadro motor na DM-LAMA2 comprometimento variável de regiões periventricular, central e subcortical (FLAIR), de acordo com a função motora - maior envolvimento no fenótipo motor mais grave. Paciente capaz de andar (A), incapaz de andar (B) e incapaz de sentar-se (C)..... 47

Figura 20 Malformações cerebrais na RM da DM-LAMA2: (A) Lisencefalia-paquigiria no lobo occipital (seta) (T2-WI), (B) Polimicrogiria e *cobblestone* no lobo occipital (seta) (T1-WI), e (C) Paquigiria no lobo occipital e lobos temporais (setas) (T2-WI)..... 48

Figura 21 Malformações cerebrais na RM DM-LAMA2: (A) Cistos temporais (setas) (T2-WI), (B) Paquigiria-lisencefalia no lobo occipital (setas) (T2-WI), (C) polimicrogiria em região perisilviana/temporal (seta) (T2-WI)..... 49

Figura 22 Biópsia muscular normal e de pacientes com DM-LAMA2..... 51

Figura 23 Biópsia muscular de paciente com DM-LAMA2 e fenótipo de distrofia muscular de cinturas. (A) Aspecto distrófico do tecido muscular (H&E 20x); (B) Presença de vacúolos citoplasmáticos no H&E 40x (C) e no Tricrômio de Gomory (40x). (D) Marcação reduzida para merosina..... 52

Figura 24 Marcação imuno-histoquímica da merosina e capacidade de aquisição de marcha ($p<0.001$)..... 52

Figura 25 Variantes encontradas na coorte de DM-LAMA2. (A) Mutações de ponto de acordo com a localização do éxon e domínio da proteína. O número de pontos representa o número de vezes que essa variante foi encontrada na coorte. Pontos pretos revelam variantes com perda de função, pontos verdes variantes *missense* ou *inframe*. (B) Mutações do tipo CNV..... 54

Figura 26 Presença de ao menos uma variante não nula (*missense* e *inframe*) e a capacidade de se adquirir marcha. ($p<0.0001$, OR:6.48)..... 65

Figura 27 Envolvimento do SNC e a localização das variantes na proteína laminina-α2. (A) Presença de variantes afetando o domínio LG e malformações corticais, (B) Presença de variantes afetando o domínio LG e epilepsia e (C)

Presença de malformações corticais e deficiência intelectual..... 67

Figura 28 Tipo de variante e envolvimento do SNC. (A) ocorrência de epilepsia (B) ocorrência de deficiência intelectual..... 68

Figura 29 Presença de duas variantes nulas e gravidade clínica da DM-LAMA2: (A) necessidade de alimentação por gastrostomia, (B) presença de escoliose e (C) presença de constipação intestinal..... 69

Lista de Tabelas

Tabela 1 Características gerais e clínicas dos pacientes com DM-LAMA2..... 28

Tabela 2 Características clínicas da DM-LAMA2..... 30

Tabela 3 Descrição das *missense* encontradas na coorte de pacientes com DM-LAMA2..... 57

Tabela 4 Variantes não missense e que não haviam sido previamente reportadas..... 60

Tabela 5 Todas variantes encontradas na coorte..... 61

Resumo

Camelo CG. Estudo clínico e molecular de pacientes com distrofia muscular relacionada ao gene LAMA2 [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Introdução: A distrofia muscular por deficiência de merosina (DM-LAMA2) é uma doença genética de herança autossômica recessiva causada por mutações no gene *LAMA2.* Pode apresentar-se de forma variável que vai desde uma forma congênita grave até uma forma mais leve de início tardio. Os pacientes apresentam, além da fraqueza muscular, alterações osteoesqueléticas e distúrbio ventilatório. A maior parte dos pacientes não adquire a capacidade de andar. Os pacientes também apresentam manifestações no SNC caracterizadas por alteração na substância branca cerebral e, mais raramente, malformações corticais na RNM, déficit cognitivo e epilepsia. As alterações genéticas que levam às formas mais graves ou mais leves da doença, assim como presença ou ausência de manifestações do SNC ainda não estão completamente estabelecidas. Também faltam estudos relevantes de história natural que permitam compreender aspectos essenciais da evolução da doença. **Objetivo**: Avaliar os aspectos clínicos, moleculares e manifestações do SNC de pacientes com DM-LAMA2. **Métodos:** Foram incluídos pacientes com diagnóstico genético ou histológico de DM-LAMA2. Os pacientes foram avaliados segundo protocolo clínico/neurológico geral, além de escalas motoras, avaliação respiratória, goniometria, RNM de encéfalo e biópsia muscular. O gene *LAMA2* foi avaliado através de sequenciamento de nova geração. **Resultados**: Foram incluídos 63 pacientes com DM-LAMA2 que se distribuíram em dois grupos distintos. O primeiro composto de 52 pacientes (82.5%) que nunca adquiriram a marcha e o segundo, de 11 (17.5%) pacientes que foram capazes de andar. Cinquenta e dois pacientes realizaram RNM de encéfalo, e em todos havia algum grau de alteração da substância branca cerebral; 10 (19.2%) apresentaram malformações corticais cerebrais. Dentre os 52 pacientes que realizaram RNM cerebral, dez (19,2%) tinham epilepsia e oito (15,4%) deficiência intelectual. Todos os pacientes com malformação cortical e epilepsia pertenciam ao grupo de pacientes não deambulantes. Entre os pacientes com malformações corticais não foram observadas mutações com variantes *missense.* Malformações corticais foram mais frequentes entre pacientes com variantes que afetam o domínio LG (região que se liga a α-distroglicana e integrinas) (p=0,016). Os pacientes não deambulantes apresentaram queda progressiva da função respiratória de 1,85%/ano (p=0.006) enquanto os que adquiriram a capacidade para marcha tiveram queda de 0,98%/ano (p=0.028). O domínio D2 da escala motora MFM foi o mais sensível para medir a progressão da doença entre não

deambulantes, com piora de 4.2% da função motora/ano. A goniometria também mostrou uma piora progressiva do grau das retrações de joelhos e cotovelos ao longo do tempo. Dentre as mutações, foram identificadas 45 variantes diferentes, das quais 21 nunca foram previamente publicadas. Quatorze pacientes (22.6%) apresentaram uma variante nova fora de fase (c.1255del; p. Ile419Leufs*4) que parece ser um efeito fundador brasileiro. Pudemos observar uma relação entre a presença de ao menos uma variante não nula e a capacidade de se adquirir a marcha ($p<0.0001$). **Conclusão**: A DM-LAMA2 é uma doença de amplo espectro de gravidade com alterações que vão além do músculo esquelético. Existe uma relação entre a gravidade motora e o acometimento do SNC e existe uma relação entre o genótipo, força muscular e presença de malformação cortical. Esse estudo trouxe dados robustos e reprodutíveis que vão auxiliar na assistência e na antecipação dos cuidados ao paciente, contribuindo para o planejamento de estudos clínicos de tratamento.

Descritores: Distrofia muscular, Merosina, Sistema nervoso central, Genótipo, Fenótipo, Epilepsia, Deficiência intelectual, História natural da doença

Abstract

Camel C.G. Clinical and molecular study of patients with LAMA2-related muscular dystrophy. [thesis]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo; 2022.

Introduction: LAMA2 related muscular dystrophy (LAMA2-RD) is an autosomal recessive genetic disease caused by mutations in the *LAMA2* gene. It can present itself in a variable form, ranging from a severe congenital form to a milder form of late onset. Patients present, in addition to muscle weakness, joint contractures, scoliosis, and respiratory insufficiency. Most patients do not acquire the ability to walk. Patients also have CNS manifestations characterized by changes in the cerebral white matter on imaging tests and, more rarely, cortical malformations on MRI, cognitive impairment, and epilepsy. The genetic alterations that lead to more severe or milder forms of the disease, as well as the presence or absence of CNS manifestations, are not yet fully established. There is also a lack of relevant natural history studies that allow us to understand essential aspects of the disease evolution. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the clinical, molecular and CNS manifestations of patients with LAMA2-RD. **Methods:** Patients with genetic or histological diagnosis of LAMA2-RD, under regular medical follow-up, were included. The patients were evaluated according to a general clinical/neurological protocol, in addition to motor scales, respiratory assessment, goniometry, brain MRI and muscle biopsy. The LAMA2 gene was evaluated through next generation sequencing. **Results**: 63 patients with LAMA2-RD were included, distributed into two distinct groups. The first comprised 52 patients (82.5%) who never acquired the gait and the second, 11 (17.5%) patients who were able to walk. Fifty-two patients underwent brain MRI, and all of them had some degree of alteration in the cerebral white matter; and 10 (19.2%) had cerebral cortical malformations. Among the 52 patients who underwent brain MRI, ten (19.2%) had epilepsy and eight (15.4%) intellectual disabilities. All patients with cortical malformation and epilepsy belonged to the non-ambulatory group. Among patients with cortical malformations, mutations with missense variants were not observed. Cortical malformations were more frequent among patients with variants that affect the LG domain (region that binds α-dystroglycan and integrins) (p=0.016). Non-ambulatory patients had a progressive decrease in forced vital capacity of 1.85%/year (p=0.006) while those who acquired the ability to walk had a decrease of 0.98%/year (p=0.028). The D2 domain of the MFM motor scale showed a statistically significant reduction of 4.2% in motor function per year among non-ambulatory patients. The goniometry measurement showed a progressive worsening of the degree of knee and elbow retractions over time. Among the mutations, 45 different variants were identified, of which 21 were never previously published. Fourteen patients (22.6%) had a novel out-of-phase variant (c.1255del; p. Ile419Leufs*4) that appears to be a

Brazilian founder effect. We could observe a relationship between the presence of at least one non-null variant and the ability to acquire gait ($p<0.0001$). **Conclusion**: DM-LAMA2 is a disease with a broad spectrum of severity with symptoms that go beyond skeletal muscle. There is a relationship between motor severity and CNS involvement and there is a relationship between genotype, muscle strength and the presence of cortical malformation. This study brought robust and reproducible data that will help patients assistance and contribute to the planning of clinical trials.

Descriptors: Muscular dystrophy, Merosin, Central nervous system, Genotype, Phenotype, Epilepsy, Intellectual disability, Natural history of the disease

1- Introdução

1.1 Distrofia muscular congênita: conceito e classificação

As distrofias musculares congênitas (DMCs) são clinicamente e geneticamente um grupo heterogêneo de miopatias. Clinicamente, manifestam-se ao nascimento ou no primeiro ano de vida e são caracterizadas por hipotonia e fraqueza muscular, retardo do desenvolvimento motor, atrofia muscular e, ao longo do tempo, contraturas musculares e deformidades esqueléticas. Histopatologicamente, obedecem a um padrão distrófico inespecífico comum a todas as formas de distrofia muscular. (Tome, Evangelista et al. 1994), Reed (2009). A maioria das DMCs mostra padrão de herança autossômica recessiva, porém há subtipos com herança autossômica dominante. A doença tem uma incidência de 1:25000 a 1:40000 e prevalência de 0,7:100000 a 2,5:100000 (Bonnemann, Wang et al. 2014). Alguns subtipos mostram nítida influência regional (Toda, Kobayashi et al. 2000).

1.2 Base etiopatogênica

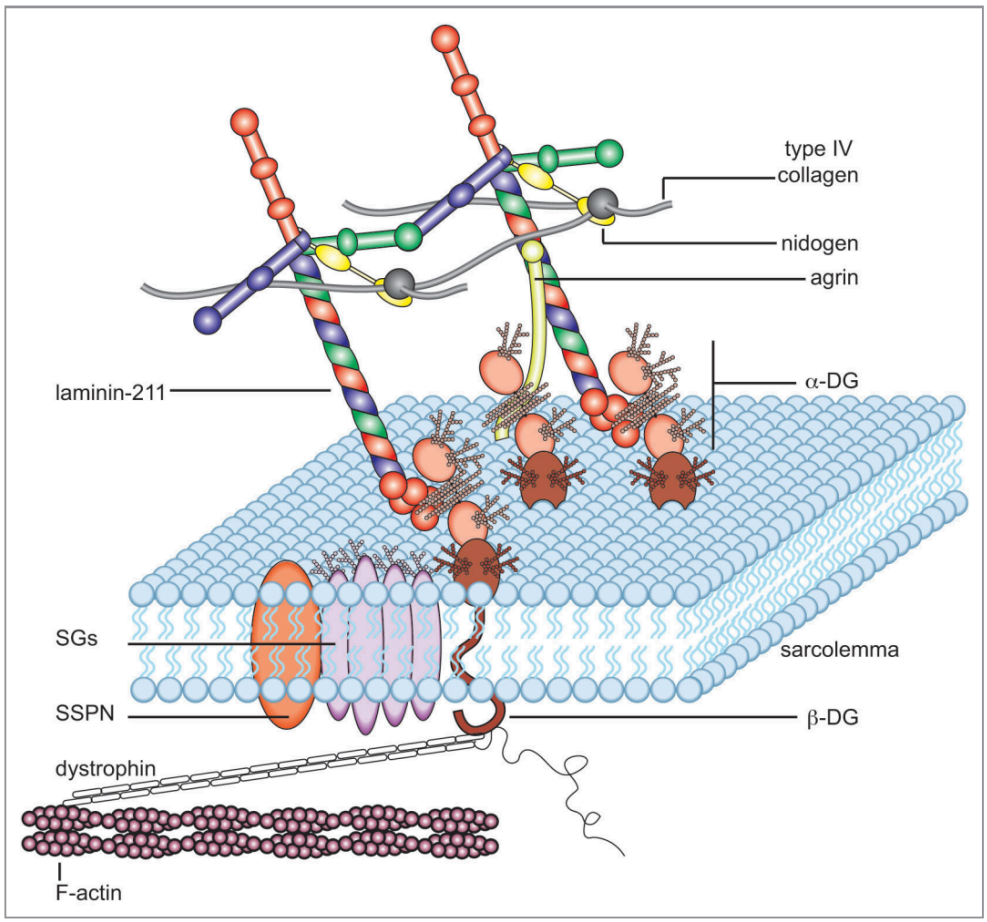
As formas mais frequentes de DMC decorrem de alterações funcionais do complexo distrofina-glicoproteínas associadas do sarcolema e da matriz extracelular: DMC por deficiência de laminina α-2, também chamada de DMC por deficiência de merosina, as DMCs tipo Ullrich e Bethlem, por deficiência das diferentes subunidades do colágeno VI, e as DMCs caracterizadas como alfadistroglicanopatias, causadas por deficiência de diferentes

glicosiltransferases que adicionam açucares à alfa-distroglicana (α-DG) (Figura 1). O déficit de qualquer uma destas proteínas altera a estabilidade mecânica da membrana da fibra muscular (sarcolema) que é determinada por uma cadeia de ligações que vão desde a unidade contrátil da fibra muscular até a lâmina basal e matriz extracelular. O primeiro elo desta cadeia é a distrofina, próxima ao lado interno do sarcolema, que através de um terminal se liga à F-actina e através do outro à β-distroglicana (DG) que é uma proteína transmembrana. Esta, por sua vez, liga-se à α -DG que se encontra justaposta ao lado externo do sarcolema e que, para proceder às suas ligações com os componentes da matriz extracelular, precisa ser glicosilada, ou seja, receber acúcares, o que ocorre através da ação de enzimas denominadas glicosiltransferases. Depois de glicosilada, a α-DG liga-se com diferentes proteínas da matriz extracelular, das quais a mais abundante é a laminina α-2, que por sua vez estabelece ligações indiretas com a rede de miofibrilas formada pelas três unidades do colágeno VI. A laminina α-2 também se ancora à membrana da fibra muscular através da ligação com a integrina α7-β1 que é uma proteína transmembrana. A alteração da estabilidade mecânica da fibra muscular, através de uma série de mecanismos fisiopatogênicos complexos que se iniciam com influxo de íons de Ca^{++}, leva à degeneração da fibra muscular (Ervasti and Sonnemann 2008, Gumerson and Michele 2011, Carmignac and Durbeej 2012).

Entretanto, há outros subtipos de DMC que decorrem de mecanismos fisiopatogênicos diferentes, tais como alterações de proteínas da membrana nuclear (DMCpor deficiência de lamina A/C e deficiência de nesprina), de proteínas integrantes do complexo da unidade contrátil (DMC por deficiência de telotonina), de enzimas citoplasmáticas (DMC tipo espinha rígida por deficiência

da selenoproteína) e DMC com alterações mitocondriais (Bonnemann, Wang et al. 2014). Os avanços contínuos da genética molecular vêm evidenciando interrelações entre a DMC e outras formas de miopatias, tais como miopatias congênitas e distrofias de cinturas de início precoce. Com exceção da DMC com déficit de merosina, de algumas alfa-DGs e das DMCs por deficiência de colágeno, os demais subtipos são bastante raros (Graziano, Bianco et al. 2015).

Figura 1 - Complexo protéico distrofina-glicoproteínas associadas ao sarcolema e a matriz extracelular



Legenda: SG (Sarcoglicana); DG (Distroglicana); SSPN (Sarcospan)
Fonte: (Holmberg and Durbeej 2013)

1.3 Características fenotípicas da distrofia muscular por mutação no *LAMA2* (DM-LAMA2)

As manifestações clínicas da DM-LAMA2 variam desde a forma congênita grave até a forma adulta de distrofia muscular de cinturas dos membros. Indivíduos afetados são frequentemente categorizados clinicamente de acordo com a capacidade ou não de deambular. Crianças com deficiência completa de laminina-α2 na análise imuno-histoquímica da biopsia muscular tipicamente têm fraqueza ao nascimento ou nos seis primeiros meses de vida e não atingem o marco motor de andar sem apoio (Reed 2009). Por outro lado, os pacientes com deficiência parcial de laminina-α2 podem ter uma apresentação mais leve com início mais tardio da doença e adquirir a deambulação (Bonnemann, Wang et al. 2014). Tanto os pacientes com início precoce, quanto aqueles de apresentação mais tardia mostram níveis altos de creatinofosfoquinase (CPK). No entanto, com a evolução da doença, a perda de massa muscular acarreta redução dos níveis de CPK ao longo do tempo (Sarkozy, Foley et al. 2020).

Pacientes com a forma mais grave apresentam hipotonia desde o nascimento, baixa movimentação espontânea e choro fraco. Baixo ganho de peso, alterações gastrointestinais e infecções pulmonares de repetição com necessidade de hospitalização podem acompanhar esse quadro clínico (Jones, Morgan et al. 2001, Gilhuis, ten Donkelaar et al. 2002). Observa-se precocemente fraqueza facial e, com a progressão da doença, nota-se contraturas na articulação temporomandibular e, mais raramente, alterações da movimentação extraocular (Oliveira, Parente Freixo et al. 1993).

O envolvimento respiratório nos pacientes com DM-LAMA2 ocorre por alteração progressiva da musculatura respiratória levando a distúrbio ventilatório restritivo (Oliveira, Gruber et al. 2018). Já na infância o tórax se torna rígido e a complacência pulmonar se reduz, contribuindo para hipoventilação pulmonar, atelectasias, formação de rolhas de secreção e obstrução brônquica. Essas alterações se manifestam como baixa capacidade vital forçada na espirometria. A baixa capacidade de higiene brônquica pela tosse ineficaz predispõe a infecções pulmonares de repetição. A necessidade de suporte ventilatório aparentemente ocorre já na primeira década de vida (Geranmayeh, Clement et al. 2010). Os pacientes com fenótipo mais grave necessitam precocemente de suporte ventilatório não invasivo noturno podendo evoluir, no decorrer da doença, com necessidade de suporte ventilatório diurno (Wallgren-Pettersson, Bushby et al. 2004). Embora a maioria das crianças com a forma congênita não apresente sinais típicos de hipercapnia como cefaleia matinal, desatenção ou sonolência diurna, outros sinais mais sutis como infecções respiratórias de repetição, dificuldade de ganho de peso e cansaço ao se alimentar podem ser observados (Philpot, Bagnall et al. 1999, Reed 2009). Philpot et al [1990] reportaram pacientes com peso abaixo do percentil 3 e distúrbios alimentares do tipo disfagia, dificuldade na mastigação e tempo de alimentação prolongado (Philpot, Bagnall et al. 1999). Retrações osteotendíneas ocorrem precocemente nas grandes articulações tais como ombros, quadris, joelhos e, mais tardiamente, articulação temporomandibular, coluna e pescoço. As contraturas frequentemente resultam em alta morbidade e interferem com a funcionalidade do paciente (Jain, Meilleur et al. 2019).

Desde a identificação do gene *LAMA2* e da proteína merosina em meados da década de 90, embora a grande maioria dos pacientes fosse não deambulante, já se reconhecia uma pequena proporção de pacientes com deficiência parcial de merosina na biópsia muscular que adquiria a marcha e manifestava fraqueza de predomínio proximal mais leve e de início mais tardio, pseudohipertrofia muscular e espinha rígida semelhante ao que se observa em pacientes com alguns subtipos de distrofia de cinturas dos membros (Løkken, Born et al. 2015). Podem evoluir também com distúrbio ventilatório restritivo grave (Geranmayeh, Clement et al. 2010). Arritmia cardíaca ou cardiomiopatia dilatada são muito raras, porém já foram descritas (Carboni, Marrosu et al. 2011, Nelson, Stojkovic et al. 2015). A alteração da substância branca cerebral também era referida nestes pacientes. Assim como na forma congênita, nível de CPK alto, alterações distróficas na biópsia muscular e, frequentemente, sinais de neuropatia desmielinizante na eletroneuromiografia (Quijano-Roy, Renault et al. 2004) podiam ocorrer.

1.4 Epidemiologia

A prevalência exata da DM-LAMA2 é desconhecida. A prevalência geral das distrofias musculares congênitas é estimada em 2,5/100.000 (Darin and Tulinius 2000), existindo prevalência regional variável: por exemplo, a DM-LAMA2 é responsável cerca de 30% dos casos de distrofia muscular congênita nos países europeus, porém por apenas 6% dos casos do Japão (Toda, Kobayashi et al. 2000, Allamand and Guicheney 2002). Já a frequência de

pacientes com mutações no gene *LAMA2* entre os fenótipos de distrofia muscular de cinturas é mais raro, em torno de 2% (Messina, Bruno et al. 2010).

1.5 Biópsia muscular

No passado, em que a análise molecular não estava disponível, em pacientes com o fenótipo clássico de DM-LAMA2, o diagnóstico definitivo era feito por biópsia muscular ou, mais raramente por biópsia de pele, visto que a pele normal também expressa laminina-α2 na membrana basal na junção da derme com a epiderme. Na avaliação histopatológica, observa-se fibrose endo e perimisial, variação no tamanho das fibras musculares, necrose e adipose. Além disso, ocorre uma relação entre a gravidade clínica e a marcação da laminina-α2 na análise imuno-histoquímica.

1.6 Alterações do sistema nervoso central e periférico

Tanto na forma congênita como na forma tardia a cognição é normal na maioria dos pacientes, não havendo relação com as alterações na ressonância magnética cerebral (Leite, Lucato et al. 2005, Messina, Bruno et al. 2010). No entanto, uma pequena proporção de indivíduos manifesta deficiência intelectual e epilepsia, associadas ou não a alterações corticais como, por exemplo, paquigiria occipital (Natera-de Benito, Muchart et al. 2020). Epilepsia, manifestada por crises focais perceptivas e não perceptivas com ou sem evolução para crise tônico-clônica bilateral, pode acometer de 8 a 20% dos pacientes (Salvati, Bonaventura et al. 2021). Pacientes com displasia cortical são

mais suscetíveis a apresentar deficiência intelectual e desenvolver crises convulsivas refratárias (Natera-de Benito, Muchart et al. 2020).

Neuropatia sensitivo-motora progressiva com sinais de desmielinização pode ser detectada na infância (Quijano-Roy, Renault et al. 2004). As anormalidades em geral são leves e sem significado clínico. No registro a eletroneuromiográfico é possível notar-se potenciais miopáticos mesmo quando o exame é realizado ainda no primeiro ano de vida (Di Muzio, De Angelis et al. 2003).

1.7 Fisiopatologia

1.7.1 Sistema Nervoso Central

Distrofia muscular por mutação no gene *LAMA2* determina na ressonância magnética de encéfalo um hipersinal na substância branca, observável nas sequências T2 e FLAIR. Não se trata de uma leucodistrofia. Apesar da fisiopatologia dessa anormalidade não ser completamente elucidada, estudos com espectroscopia e alteração de difusão identificaram aumento da quantidade de água na substância branca (Leite, Lucato et al. 2005, Mohassel, Foley et al. 2018), com possível edema, além de baixa quantidade de N-acetilaspartato, N-acetilas par-glutamato, creatina e dosdocreatina, achados que sugerem uma astrocitose relativa. Esses achados possivelmente decorrem de um aumento da passagem de água para a substância branca devido a alteração na barreira hemato-encefálica, secundária à ausência de laminina alfa2 na lâmina basal dos vasos sanguíneos cerebrais (Leite, Lucato et al. 2005, Mohassel, Foley et al.

2018). Em autópsias, a substância branca é pálida e espongiforme e observa-se astrocitose e desmielinização (Taratuto, Lubieniecki et al. 1999).

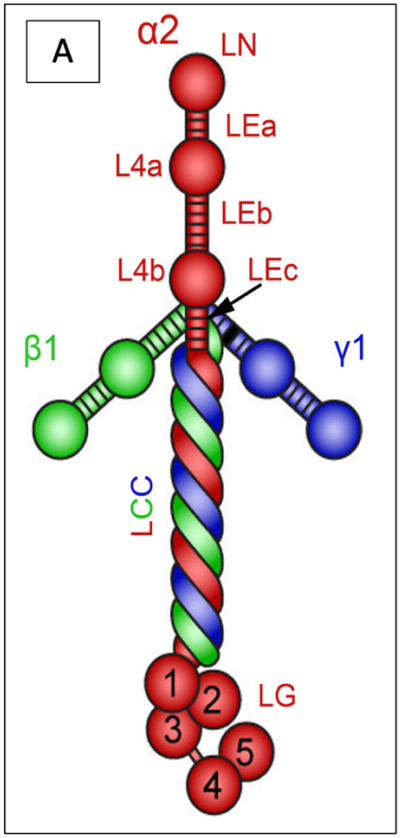
1.7.2 Músculo e matriz extracelular

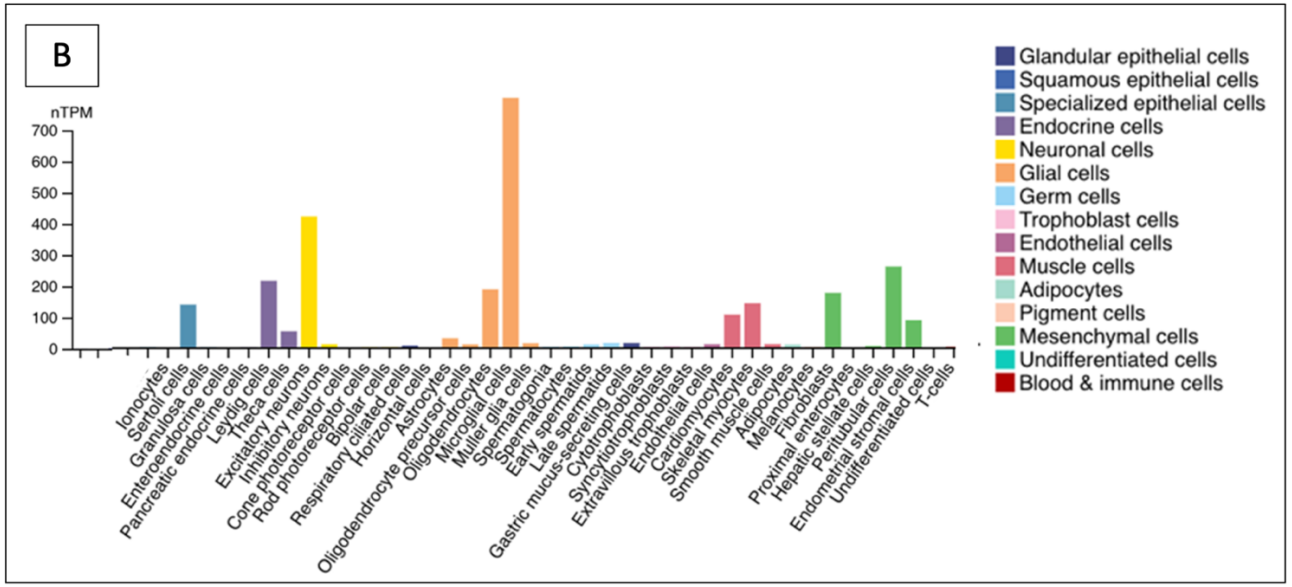
O gene *LAMA2* está presente no cromossomo 6 e codifica a proteína laminina α2, principal componente da proteína heterotrimérica laminina-211, ou merosina (Helbling-Leclerc, Zhang et al. 1995).

A laminina-α2 é essencial para a estrutura da membrana basal, conectando-se a outras proteínas que se ligam ao aparato contrátil e a receptores de superfície (Reinhard, Lin et al. 2017). A laminina-α2 é formada por um domínio LN, um domínio central LCC e um domínio LG. O domínio LN é responsável pela polimerização das três partes da Laminina 211 (alfa2, gama1, beta1), o domínio LCC por unir de forma circular as três cadeias e o domínio LG por interagir na superfície celular com a alfa-DG e com a integrina (Yurchenco, McKee et al. 2018). Embora a Laminina211 também esteja ancorada às sarcoglicanas, é a alfa-DG e a integrina que fornecem estabilidade à membrana basal (Ervasti and Sonnemann 2008, Yurchenco, McKee et al. 2018).

Apesar da laminina-α2 ser sabidamente essencial para o funcionamento do músculo esquelético, ela também é expressa em vários outros tecidos, como neurônio excitatórios, oligodendrócitos, micróglia, cardiomiócitos e fibroblastos, onde sua função ainda não teve uma descrição aprofundada. Embora seja expressa em vários tecidos, são conhecidas apenas quatro isoformas, sendo as três principais extremamente semelhantes entre si (Sewry, D'Alessandro et al.

1997, Uhlen, Fagerberg et al. 2015, Yurchenco, McKee et al. 2018, Yurchenco and McKee 2019) . (Figura 2)





Name	Transcript ID	bp	Protein	Biotype	CCDS	UniProt Match	RefSeq Match
LAMA2-201	ENST00000421865.3	9696	3122aa	Protein coding	CCDS5138	P24043	NM_000426.4
LAMA2-206	ENST00000618192.4	9687	3121aa	Protein coding	-	A0A087WX80	-
LAMA2-205	ENST00000617695.4	9678	3118aa	Protein coding	-	A0A087WYF1	-
LAMA2-207	ENST00000645154.1	552	184aa	Protein coding	-	A0A2R8YDM5	-

Figura 2: (A) Representação gráfica da proteína Laminina-211 (Fonte: Yurtchenko 2019), em vermelho está a porção alpha-2, em verde a beta-1 e em azul a gama-1. Os domínios estão representados por LN, LCC e LG. (B) Diferentes tecidos em que a laminina-α2 se expressa (Fonte: The Human Protein Atlas), (C) Os quatro transcritos conhecidos do gene *LAMA2*, sendo três muito semelhantes entre si (Fonte: Ensembl)

1.8 Correlação Genótipo-Fenótipo

A determinação da correlação genótipo-fenótipo na DM-LAMA2 ainda é uma área de conhecimento em expansão. Em casos típicos de distrofia muscular congênita há, usualmente, deficiência total de laminina-α2, o que está geralmente relacionado a mutações com perda de função em ambos os alelos (Oliveira, Santos et al. 2008, Geranmayeh, Clement et al. 2010, Xiong, Tan et al. 2015, Tan, Ge et al. 2021). A perda de função da proteína geralmente ocorre devido a mutações do tipo nulas – variantes que levam a *stop códon* prematuro, alterações fora de fase (*frameshift*) e algumas variantes que interferem no sítio de *splicing*. As variantes nulas resultam em uma proteína pequena, instável e disfuncional e contribuem para um sarcolema instável e, portanto, um músculo distrófico. Acredita-se que mutações no domínio LN, que interfere na polimerização da Laminina-211, ou mutações no domínio LG que levam a interferências na interação da Laminina-211 com a alfa-DG e com a integrina sejam responsáveis por quadros mais graves (Oliveira, Santos et al. 2008, Geranmayeh, Clement et al. 2010, Xiong, Tan et al. 2015, Tan, Ge et al. 2021) . Mutações no domínio LN estão localizadas nos éxons 1-30, ao passo que mutações no domínio LG estão localizadas nos éxons 46-64 (Oliveira, Santos et al. 2008, Geranmayeh, Clement et al. 2010, Xiong, Tan et al. 2015, Oliveira, Gruber et al. 2018, Tan, Ge et al. 2021).

A combinação genética mais frequentemente encontrada em pacientes com DM-LAMA2 é mutação nula em um alelo, associada a uma segunda variante diferente no outro, ou seja, em heterozigose composta (Oliveira, Gruber et al. 2018).

Variantes nulas bialélicas tipicamente resultam em deficiência completa de laminina-α2 e um fenótipo de apresentação grave, que é a forma mais comum da doença. Por outro lado, a associação de uma variante nula a uma variante *missense* ou *in frame* é a típica causa de deficiência parcial de laminina-α2 (Mohassel, Foley et al. 2018).

Variantes do tipo grandes deleções e duplicações também já foram referidas. Apesar do aperfeiçoamento do sequenciamento de nova geração (NGS) para identificar esse tipo de variante, em algumas situações ainda há necessidade de se lançar mão das técnicas de MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) ou do *Array*. Assim, a procura por uma variante no gene *LAMA2* deve ser expandida nos casos de apresentação clínica típica em que o NGS encontra apenas uma variante em heterozigose, ou não encontra nenhuma variante (Oliveira, Goncalves et al. 2014, Ge, Liu et al. 2018).

2. Justificativa do Estudo

Este estudo se justifica pelo fato de não haver nenhum estudo no Brasil que identifique o perfil clínico e genético dos pacientes com DM-LAMA2 e se esses se comportam diferentemente de populações de outros países ou regiões.

Também não há estudos com N suficiente que mostrem o acometimento de outros sistemas além do musculoesquelético nos pacientes com DM-LAMA2, nem tampouco a correlação desse acometimento com o fenótipo e o genótipo.

Ainda, a literatura médica é escassa em estudos de história natural dos pacientes com DM-LAMA2, o que representa um obstáculo para a assistência adequada aos pacientes e para a criação de *trials* de tratamento.

3. Objetivos

3.1 Geral

Conduzir estudo clínico, molecular e de imagem de SNC em pacientes com DM-LAMA2.

3.2 Específicos

- Analisar o gene *LAMA2* nos pacientes com diagnóstico clínico e ou histológico de DM-LAMA2 para determinar os tipos de variantes na nossa população;
- Descrever o fenótipo clínico dos pacientes com mutações no gene *LAMA2* e traçar um perfil de história natural dos pacientes com a doença no nosso meio;
- Caracterizar os achados de RNM do SNC dos pacientes com DM-LAMA2
- Correlacionar os tipos de variantes com aspectos clínicos mais relevantes, tais como força muscular, capacidade motora máxima, presença de epilepsia e de deficiência intelectual e de ocorrência de malformações corticais.

4. Métodos

Trata-se de estudo longitudinal retrospectivo e prospectivo, observacional, não-intervencionista de pacientes com diagnóstico de DM-LAMA2, realizado no Ambulatório de Doenças Neuromusculares da Infância do Serviço de Neurologia Infantil da Divisão de Clínica Neurológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HC-FMUSP) entre março de 2018 e julho de 2022. Os pacientes participantes e seus familiares leram, compreenderam e assinaram de forma voluntária o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo A). O projeto foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética do HC-FMUSP (CAAE: 87782318.2.0000.0068) (Anexo B).

4.1 Critérios de inclusão

1- Diagnóstico molecular e/ou histológico de DM-LAMA2;

2- Diagnóstico clínico de DM-LAMA2 e consentimento do paciente/familiar para coleta de DNA para teste genético confirmatório;

3- Seguimento regular no ambulatório de doenças neuromusculares do Hospital das Clínicas (HC-FMUSP)

4.2 Critérios de exclusão

1- Diagnóstico histopatológico e/ou molecular para outros tipos de miopatias;

2- Pacientes em que o teste genético não encontrou nenhuma variante para o gene LAMA2
3- Não assentimento de TCLE.

4.3 Quadro clínico

Os pacientes foram avaliados segundo protocolo clínico/neurológico que inclui história clínica (gestacional, neonatal, desenvolvimento e evolução), história familiar, exame físico e exame neurológico. Foram aplicadas as seguintes escalas para avaliar força e função motora: Medical Research Council (MRC), Medida de Função Motora (MFM) e *Revised Upper Limp Module (RULM)*. A avaliação respiratória foi feita através de espirometria. Foi usada goniometria para detectar a presença de deformidades ortopédicas e foi usado a medida do ângulo de Cobb para avaliar progressão da escoliose.

4.3.1 Escalas motoras

Escalas motoras foram usadas para avaliação da força e função motora, de forma estruturada e como medida de progressão e do curso da história natural da doença. A escala MFM32 (Motor Function Measure 32) foi utilizada em pacientes com idade igual ou maior a dois anos de idade. Essa escala avalia função motora axial, proximal e distal, já tendo sido validada para indivíduos com distrofia muscular congênita (Vuillerot, Rippert et al. 2014, Meilleur, Jain et al. 2015). A escala inclui três dimensões: (1) De pé e transferências (13 itens); (2) Função motora proximal e axial (12 itens) e (3) Função motora distal (7 itens). Cada item foi avaliado duas vezes e o melhor desempenho apresentado foi

pontuado de 0 a 3, onde 0 significa que o paciente não realizou aquela atividade motora (Anexo C). Essa escala foi inicialmente aplicada em pacientes maiores de cinco anos de idade, mas foi, posteriormente, considerada confiável e reaplicável também em crianças entre 2-5 anos de idade com distrofia muscular congênita (Trundell, Le Scouiller et al. 2020).

Uma vez que a maior parte dos pacientes é não deambulante, foi usada uma escala de medida de força e funcionalidade de membros superiores, a escala RULM *(Revised Upper Limb Module)* que é uma medida padronizada para avaliação da função e força das mãos, punhos, cotovelos e ombros. A pontuação varia de 0 a 37, com pontuações mais altas indicando melhor função (Mazzone, Mayhew et al. 2017) (Anexo D).

Foi usada goniometria para analisar o alcance de movimentos das articulações dos ombros, cotovelos, punhos, quadris, joelhos e tornozelos. Extensão completa pontua 0 (zero) grau. Se o paciente não consegue alcançar a extensão completa, a medida é subtraída da posição de 0 grau, resultando em um valor negativo. Devido a frequente simetria das retrações musculares, foi feita uma média entre as medidas dos lados esquerdo e direito e esse valor foi usado para análise dos dados.

As escalas foram realizadas por fisioterapeuta experiente em doenças neuromusculares (Dra. Mariana Cunha Artilheiro) que utilizou o mesmo material padronizado para todos os pacientes.

4.3.2 Avaliação respiratória

Todos os pacientes capazes de colaborar e de compreender as orientações do exame foram submetidos ao teste de função pulmonar (TFP), de acordo com as normas previstas pelo Consenso Europeu de Espirometria (Roca, Burgos et al. 1998). Todos foram avaliados pelo mesmo fisioterapeuta (Dra. Mariana Cunha Artilheiro) que possui treinamento especializado para a realização da técnica.

A espirometria mensura o volume de ar inspirado e expirado, além dos fluxos respiratórios durante as manobras expiratórias forçadas. Através dela foi mensurada a capacidade vital forçada (CVF), que avalia a capacidade pulmonar, sendo definida pelo volume de ar expirado durante a manobra expiratória forçada desde a capacidade pulmonar total (CPT) até o volume residual pulmonar. Para obtenção da CVF, o paciente foi instruído a realizar a inspiração até a CPT e, na sequência, expirar o mais rápido e o mais intenso possível em um bucal descartável, fazendo uso de clip nasal descartável para concentrar a saída do fluxo pela cavidade oral. O espirômetro utilizado, Microquark COSMED®, foi conectado a um computador com licença do software OMNIA® para obtenção dos dados e resultados do exame. Para aceitação do exame, de acordo com os critérios de reprodutibilidade e qualidade, foram obtidas pelo menos duas manobras aceitáveis (em até 5 tentativas) com os dois maiores valores de CVF e diferindo menos do que 0,15 L entre elas.

Distúrbio ventilatório restritivo foi caracterizado após constatação de valores de CVF menores que 80% do predito (Gartman 2018).

4.3.3 Avaliação da cognição e epilepsia

A deficiência intelectual foi avaliada por meio do mini-exame do estado mental e da Escala de Avaliação Cognitiva de Montreal (MOCA). Valores abaixo de 27 entre 35 pontos na mini avaliação mental sugeriram deficiência intelectual (Jain and Passi 2005), e valores abaixo de 26 entre 30 pontos na escala MOCA foram considerados anormais (Pike, Poulsen et al. 2017). O paciente foi considerado com deficiência intelectual quando ambas as escalas pontuavam de forma alterada. A definição e classificação de epilepsia seguiram os critérios da *International League Against Epilepsy* (Specchio, Wirrell et al. 2022)

4.4 Exames subsidiários

Foram registrados os resultados de exames complementares realizados rotineiramente, tais como: nível sérico de CPK, função cardíaca (eletrocardiograma e ecocardiograma) e eletroencefalograma, quando havia suspeita ou diagnóstico de epilepsia. Os resultados do exame de eletroneuromiografia foram incluídos no registro dos pacientes que tinham sido submetidos ao exame.

4.4.1 RNM de encéfalo

A RNM de encéfalo foi realizada em máquinas de 1,5 ou 3,0 Tesla durante a investigação clínica. As imagens tridimensionais ponderadas em T1, em difusão, T2 gradiente-eco, T2-WI e FLAIR foram realizadas. As imagens foram avaliadas em conjunto por três neuroradiologistas experientes (Dra. Suelly

Ferracioli, Dr. Leandro Lucato, Dr. Antônio José Rocha), juntamente com a autora do trabalho.

A alteração da substância branca foi classificada em leve, moderada ou severa. Leve quando o acometimento era exclusivamente periventricular; moderada quando o acometimento era periventricular, com acometimento parcial da substância branca central; severa, quando havia acometimento da substância branca periventricular, da substância branca central, com ou sem alteração da substância branca subcortical.

As malformações corticais foram classificadas de acordo com o tipo e a localização.

4.5 Análise histológica

Os pacientes que tinham sido submetidos a biópsia muscular em nossa Instituição antes do início do estudo, dispunham de fragmentos musculares estocados a 80°C no Laboratório de Investigação Médica (LIM) 15 da Divisão de Clínica Neurológica do HC-FMUSP. Os achados histológicos foram apresentados analisando-se as lâminas já processadas através das reações de rotina hematoxicilina-eosina (HE), tricrômio de Gomori, Ácido Periódico de Schiff (PAS) e histoquímicas (NADH, SDH, e ATPase em diferentes pHs). Os critérios histológicos fundamentais avaliados foram: variabilidade no tamanho das fibras, infiltração conjuntivo-gordurosa endomisial e perimisial, aumento da centralização nuclear, presença de necrose com macrofagia, presença de fibras em regeneração, reação inflamatória endomisial ou perivascular, alterações da arquitetura interna das fibras (aspecto em mordida de traça, turbilhonamento,

"minicores"), predominância de tipo de fibra, formação de agrupamento de fibras e fibras positivas às fosfatases ácida e alcalina. A alteração na análise histológica foi graduada da seguinte forma: 0 (sem alteração), + (leves), ++ (moderadas) e +++ (graves). As avaliações histológicas foram revisadas por médico experiente na análise histológica do tecido muscular (Dr. Edmar Zanoteli) juntamente com a autora do estudo.

A análise da biopsia muscular no Laboratório de Investigação em Medicina (LIM 15) da FMUSP, inclui estudo imuno-histoquímico para as proteínas distrofina, merosina, caveolina-3, disferlina, sarcoglicanas e colágeno VI, com o objetivo de identificar dentre os casos com alterações distróficas na biopsia muscular aqueles com diagnóstico de distrofinopatias, distrofias de cinturas e deficiência de merosina. Fragmentos musculares estocados são utilizados para estudo imuno-histoquímico. Na técnica de imunofluorescência indireta, fragmentos musculares não fixados são mantidos por 10 minutos em ar ambiente e em seguida são bloqueados com tampão de bloqueio (2% BSA em PBS, soro normal e 0.2% triton-X 100) por 30 min em temperatura ambiente. Os fragmentos são então incubados com anticorpo primário (NCL-MEROSIN monoclonal, espécie mouse; marca: Leica, código: MEROSIN-CE), diluído em tampão de bloqueio por 1-3 horas em temperatura ambiente. As lâminas são lavadas com PBS por 3 vezes (10 minutos cada), e bloqueados novamente com tampão de bloqueio por 20 minutos. Em seguida, os fragmentos são incubados com anticorpo secundário por uma hora em temperatura ambiente, lavados com PBS por 4 vezes (10 minutos cada), e montados com Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). As lâminas são examinadas em microscópio de

fluorescência. Como controle interno, cortes de tecido são incubados apenas com anticorpo secundário.

4.6 Teste genético

Foi coletada uma amostra de 10 ml de sangue periférico dos pacientes e dos familiares na Divisão de Laboratório Central do HCFMUSP**,** utilizando tubos com o anticoagulante EDTA. Esse material foi enviado para o LIM45 da Disciplina de Neurologia Translacional do Departamento de Neurologia da FMUSP onde foi realizada a extração de DNA linfocitário usando protocolo descrito por Miller et al (Miller, Dykes et al. 1988). Parte das amostras foi enviada para o Laboratório Mendelics para o estudo molecular. Parte dos pacientes foi admitida no ambulatório e no estudo com o sequenciamento do gene já realizado e parte foi submetida a coleta de DNA através do exame de *swab* em programa patrocinado pela indústria farmacêutica.

Inicialmente, por meio do *Nextera Rapid Capture Custom Enrichment Kit* (Illumina), o DNA genômico (previamente extraído) foi fragmentado, marcado e ligado aos adaptadores em suas extremidades. Em seguida o DNA resultante foi purificado e o produto foi amplificado por PCR com 10 ciclos. Nesse passo, as sequências index 1 (i7) e o index 2 (i5), necessárias para sequenciar, foram adicionadas, assim como os adaptadores (P5 e P7), requeridos para geração de *cluster* e sequenciamento.

A biblioteca de DNA foi purificada pelo kit *Sample Purification Beads* e, posteriormente, misturada com as sondas de captura para marcação das regiões de interesse. A primeira captura foi então realizada utilizando *beads* de

streptavidina a fim de capturar as sondas hibridadas para a marcação das regiões de interesse. Dois procedimentos de lavagem removeram as *beads* que não estavam ligadas especificamente. A biblioteca enriquecida foi então eluída e combinada com a primeira etapa de enriquecimento às sondas de captura para marcação de regiões de interesse. A streptavidina foi utilizada para segunda captura que prendeu as sondas hibridadas para marcar as regiões de interesse. Duas lavagens removeram as ligações não específicas com as *beads*. A biblioteca enriquecida foi novamente eluída e preparada para o sequenciamento. A amostra foi então purificada, amplificada por PCR e purificada novamente.

As regiões específicas foram sequenciadas pelo *MiSeq Desktop Sequencer* (Illumina®) em laboratório multiusuário parceiro. A análise dos dados foi realizada pelo software RTA. Para os processamentos adicionais dos dados, foi utilizado o *Picard data-processing pipeline*. O alinhamento foi realizado pelo software BWA, usando o genoma referência hg19/GRCh38. A identificação de variantes foi feita utilizando a ferramenta de bioinformática GATK, e as variantes encontradas foram comparadas com o banco de variantes *Human Mutation Database (HGMD)* e com os bancos de mutações dos genes que causam distrofia muscular, disponíveis na plataforma *Leiden Open Variation Database* (LOVD) em www.dmd.nl. Eventuais variantes novas foram analisadas pelas ferramentas de predição de patogenicidade SIFT, *PolyPhen, PhastCons*, associadas aos critérios da Academia Americana de Genética.

A interpretação de variantes seguiu os padrões e diretrizes para a classificação de variantes de sequência propostos pelo *American College of Medical Genetics and Genomics* (Richards, Aziz et al. 2015). Foram anotadas

variantes usando ANNOVAR *(http://annovar.openbioinformatics.org)* e as filtramos com scripts personalizados. Usamos o banco de dados Clinvar *(https://www.ncbi.nlm.nih.gov)* e Pubmed *(https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gob)* para identificar mutações previamente relatadas. Usamos o UCSC Genome Browser *(https://genome.ucsc.edu)* e o Gnomad *(https://gnomad.broadinstitute.org)* para determinar a frequência de cada mutação na população geral. Usamos conservação de espécies, conservação de aminoácidos, preditores bioinformáticos *(Polyphen (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/)*e SpliceAI *(https://spliceailookup.broadinstitute.org)* para prever os efeitos missense e *splice* das mutações de sítio.

As variantes foram classificadas de acordo com o efeito no RNA mensageiro, posição da proteína e domínio do gene.

4.7 Análise estatística

As variáveis contínuas foram apresentadas como média (DP) e as variáveis discretas e categóricas como contagens e porcentagens. Para comparar duas populações (de pacientes deambulantes e não deambulantes) foi usado Teste t de Welch (teste que não assume variâncias similares unicaudal) e os dados foram transformados em log para que a distribuição ficasse mais próxima do normal.

Foi realizada análise univariada para descrever e calcular a prevalência das características dos pacientes. O teste exato de Fisher foi usado para dados de contagem com intervalo de confiança de 95% (IC 95%) e as razões de chances (ORs) foram calculadas. Todos os testes foram bilaterais e consideramos um

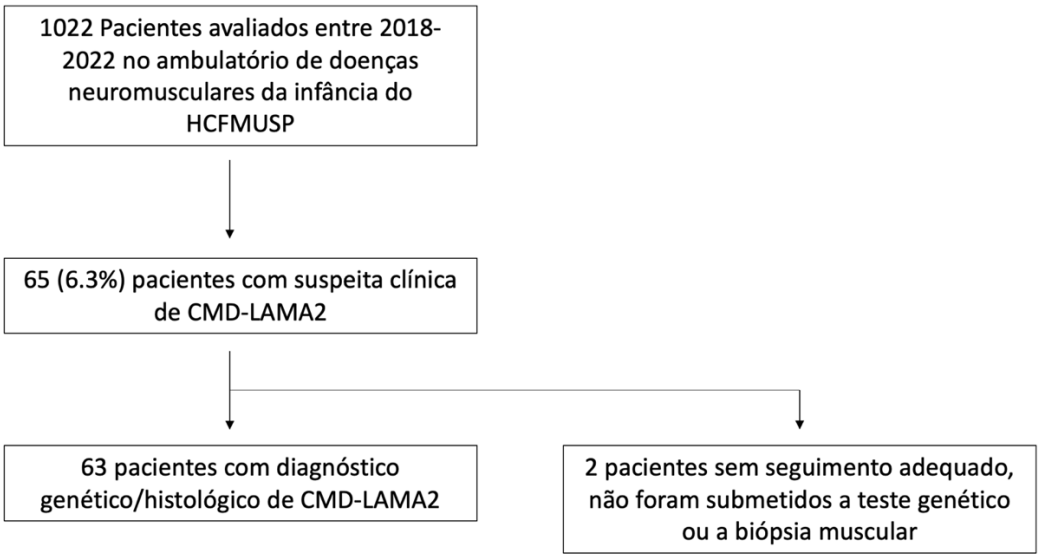
valor de P de 0,05 como limite para significância estatística. Análises estatísticas foram feitas usando R versão 3.5.0.

Uma vez que se trata de uma doença rara, para não haver perda de dado, foi feita comparação dos dados dos pacientes de acordo com a idade, e não seguimento longitudinal de cada um. A análise de regressão de efeitos mistos foi usada para avaliar a tendência longitudinal para flexão do cotovelo (média do direito e esquerdo), flexão do joelho (média do direito e esquerdo), CVF% e MFM32 com teste de Wald com distribuição t da estatística de teste, considerando estatisticamente significativo o $p<0.05$.

5 Resultados

De março de 2018 até julho de 2022, sessenta e cinco pacientes com DM-LAMA2 foram identificados e convidados a participar do estudo. Dois pacientes não tiveram seguimento adequado e não realizaram teste genético ou histológico e foram excluídos. Dessa forma, 63 pacientes foram incluídos (Figura 3).

Figura 3 - Fluxograma da seleção de pacientes para o estudo



Fonte: Autoria própria

5.1 Aspectos clínicos

Dos 63 pacientes com DM-LAMA2, 33 pacientes eram do sexo feminino (52.4%) e 31 do sexo masculino (47.6%). Os 63 pacientes eram de 60 famílias diferentes e 8 (12.7%) eram filhos de pais consanguíneos.

Os pacientes seguidos tinham idade entre 2 e 38 anos, média de idade de 11,4 anos (Tabela 1).

Tabela 1 - Características gerais e clínicas dos pacientes com DM-LAMA2

Características da população	**N=63**
Idade (anos) na última visita, média	11.4 (2-38*)
Sexo feminino, n(%)	33 (52.5)
Sexo masculino, n(%)	31 (47.6)
Pais consanguíneos, n(%)	8 (12.7)

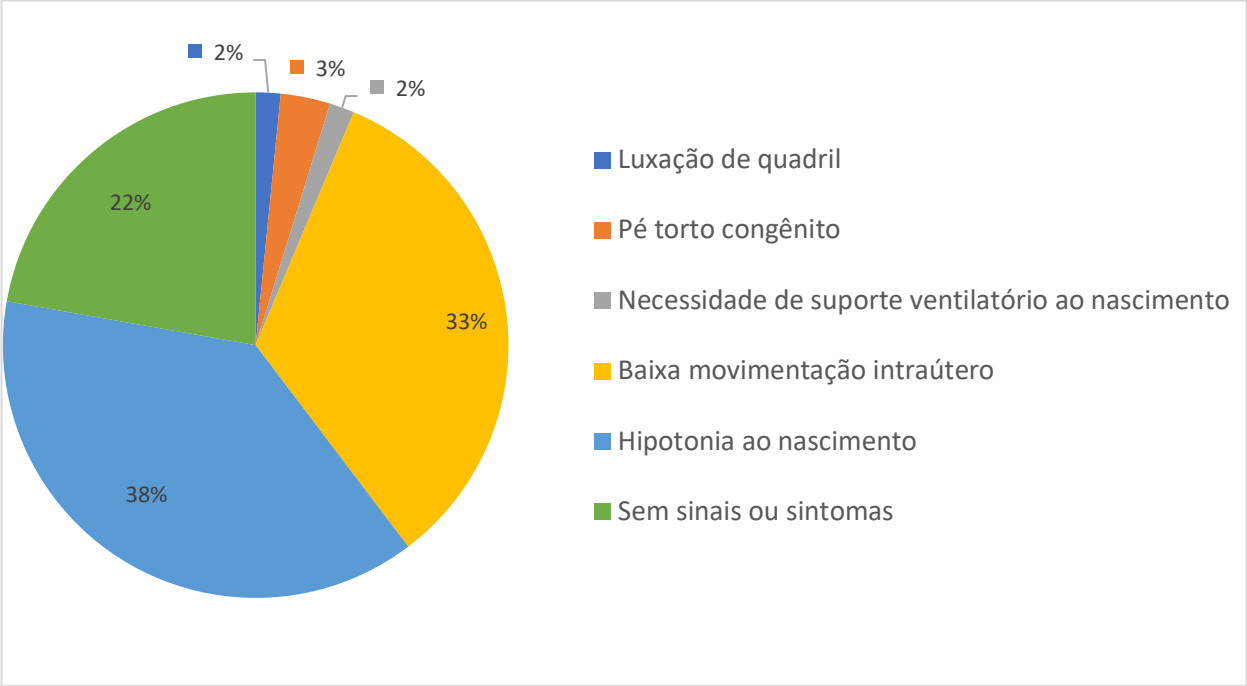
N= número, % = porcentagem

*Intervalo

5.1.1 Sintomas perinatais

Vinte e um pacientes (33.3%) tiveram baixa movimentação intraútero. Dois pacientes (3.1%) nasceram com pé torto congênito, um (1.6%) paciente necessitou ser intubado imediatamente após nascimento e um (1.6%) paciente apresentou luxação de quadril ao nascimento (Figura 4).

Figura 4 - Manifestações perinatais dos pacientes com DM-LAMA2



Fonte: Autoria própria

5.2 Características clínicas da doença

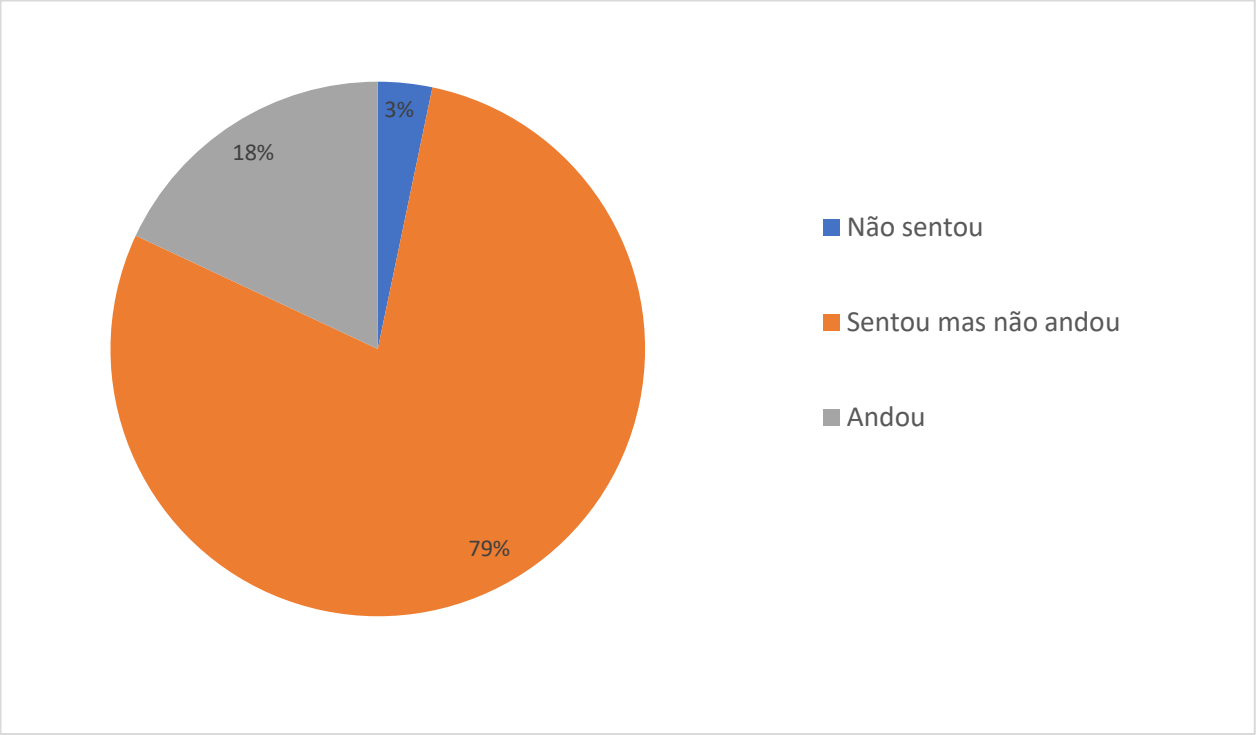
Em relação as características clínicas da DM-LAMA2, foi observada a presença de dois grupos distintos de pacientes. O primeiro grupo, mais grave, composto de 52 pacientes (82.5%), nunca adquiriu a marcha, e o segundo grupo, composto de 11 (17.5%) pacientes, adquiriu a capacidade de andar (Tabela 2, Figura 5). Dentro do primeiro grupo, dois pacientes apresentaram fenótipo ainda mais grave e nunca adquiriram a capacidade de sentar-se sem apoio. Dentro do segundo grupo, foi possível uma subdivisão: (A) pacientes com quadro congênito, e atraso na aquisição da marcha (n=7), e (B) pacientes com quadro de distrofia muscular de cinturas (n=4) (Figura 6).

Tabela 2 – Características clínicas da DM-LAMA2

Características dos pacientes	N=63
Obtiveram sustento cefálico, n(%)	61 (96.8)
Sentaram sem apoio, n(%)	61 (96.8)
Deambularam, n(%)	11 (17.5)

*Idade e DP em meses N= número, %= porcentagem

Figura 5 - Número de pacientes com DM-LAMA2 de acordo com a habilidade motora

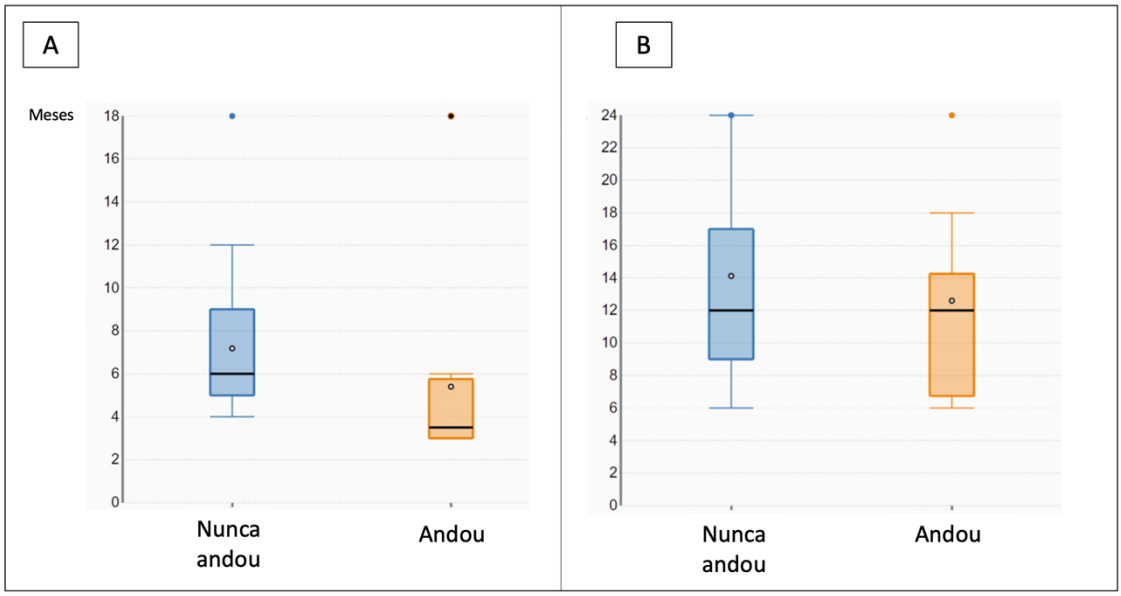


Fonte: Autoria própria

Figura 6 - Diferentes apresentações fenotípicas dos pacientes com DM-LAMA2. A) Paciente de 8 anos que nunca se sentou. B) Paciente com a forma de apresentação mais comum; capaz de sentar-se sem apoio. C) Paciente com a forma congênita que adquiriu a marcha. D) Paciente com a forma de apresentação de distrofia muscular de cinturas, assemelhando-se a um fenótipo de distrofia muscular de Emery-Dreifuss.

O primeiro grupo, composto por pacientes que nunca adquiriram a marcha, adquiriu marcos motores de forma tardia e mais atrasados que o grupo que foi capaz de adquirir marcha. A média de idade para aquisição de sustento cefálico dentre os pacientes incapazes de deambular foi de 7.8 meses (DP: 4.3; 3-14), enquanto entre os pacientes capazes de andar foi de 3.5 meses (DP:2.7; 3-6) (p=0.003). Já a média de idade de sentar-se sem apoio entre os pacientes incapazes de deambular foi de 12.8 (DP: 7.2; 3-30) meses e dos que adquiriram a marcha foi de 7.8 meses (DP: 5,1; 5-18) (p<0.001) (Figura 7). A Idade média de aquisição de marcha dos deambulantes foi de 24 meses (DP: 13.7; 15-48).

Figura 7 - Comparação da idade de aquisição de marcos motores entre os pacientes com DM-LAMA2 que deambulam e que não deambulam



Comparação da idade de aquisição de marcos motores entre os dois grupos de pacientes. A) Idade de aquisição do sustento cefálico dos dois grupos de pacientes (p=0.003), e B) Idade de aquisição da habilidade de sentar-se sem apoio dos dois grupos de pacientes (p<0.001). Os pontos fora da curva representam pacientes com fenótipo mais grave. Os dados foram transformados em log para tornar a distribuição normal (Teste t de Welch)
Fonte: Autoria própria

5.3 Avaliação de epilepsia e deficiência intelectual

Dez pacientes (15.9%) tiveram epilepsia com idade média de 8,1 anos (6-13 anos). Todos eles tiveram crises de início focal com ou sem perda de consciência. Desses pacientes, oito alcançaram o controle das crises usando monoterapia antiepiléptica, e o paciente 36 (p36), que tinha a malformação cortical mais extensa, desenvolveu epilepsia refratária e necessitou de multiterapia antiepiléptica (vigabatrina, lamotrigina, clobazam).

Nove pacientes (14.3%) apresentavam deficiência intelectual. Todos tinham idade ≥ 8 anos. Todos tiveram menos de 27 pontos no mini-exame mental (mediana = 24) e menos de 26 pontos na escala MOCA (mediana = 23). Apenas um paciente ambulante apresentou deficiência intelectual, e essa foi associada ao transtorno do espectro do autismo (TEA).

5.4 Alterações gastrointestinais

Trinta e cinco dos 63 pacientes (55.5%) apresentaram constipação intestinal e quatro (6.3%) apresentaram doença do refluxo gastro-esofágico (DRGE), todos os quatro não deambulantes. Apenas um paciente do grupo deambulante apresentou constipação intestinal (p=0.0015).

Quinze pacientes (15/48 - 31,2%) apresentaram pelo menos um episódio de hipoglicemia sintomática e 8/48 (16,6%) tiveram dois ou mais episódios.

5.5 Alterações cardíacas

Todos os pacientes foram submetidos a ecocardiograma e eletrocardiograma. Sete (11.1%) apresentaram alterações no ecocardiograma: refluxo tricúspide em quatro, refluxo mitral em três e disfunção sistólica de ventrículo esquerdo em dois. Um paciente apresentou distúrbio de condução do ramo direito. No entanto, apenas dois pacientes necessitaram de medicação cardiológica.

Dos sete pacientes com alguma alteração cardíaca, seis nunca adquiriram marcha. No entanto, não houve diferença estatística entre a presença de alteração cardíaca e a capacidade de adquirir marcha. Houve diferença estatística entre acometimento cardíaco e a idade; e todos os pacientes com alteração cardíaca tinham mais de oito anos de idade (p=0.046).

5.6 Internações, infecções respiratórias e óbitos

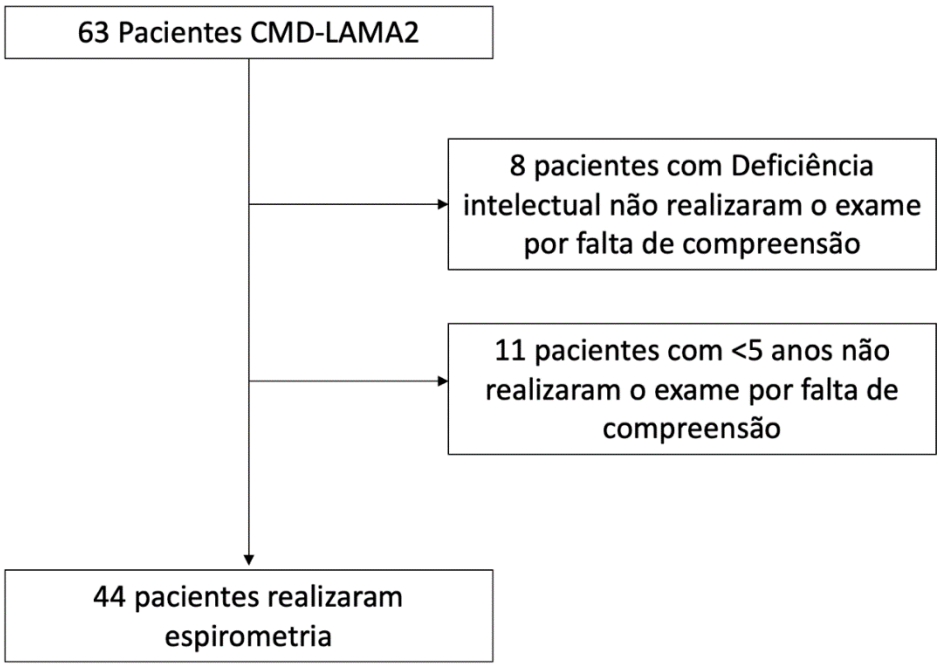
Dentre os 63 pacientes, quarenta e seis (73%) foram internados ao menos uma vez por infecção de vias aéreas inferiores. Dentre os 17 pacientes que nunca foram internados, seis eram crianças abaixo de 5 anos de idade, e quatro eram pacientes com a forma mais leve da doença, que apresentavam marcha. Um paciente necessitou de internação devido a infecção por covid 19.

Durante o estudo, quatro pacientes faleceram em decorrência de pneumonia, todos com a forma mais grave da doença (grupo 1).

5.7 Avaliação respiratória

Quarenta e quatro pacientes foram submetidos a avaliação de espirometria. Dentre esses 44 pacientes, 33 estavam no grupo de pacientes não deambulantes e 11 no grupo de pacientes deambulantes. Com o resultado das espirometrias de acordo com a idade, foi realizado gráfico de dispersão com teste de Wald com distribuição t (Figura 8).

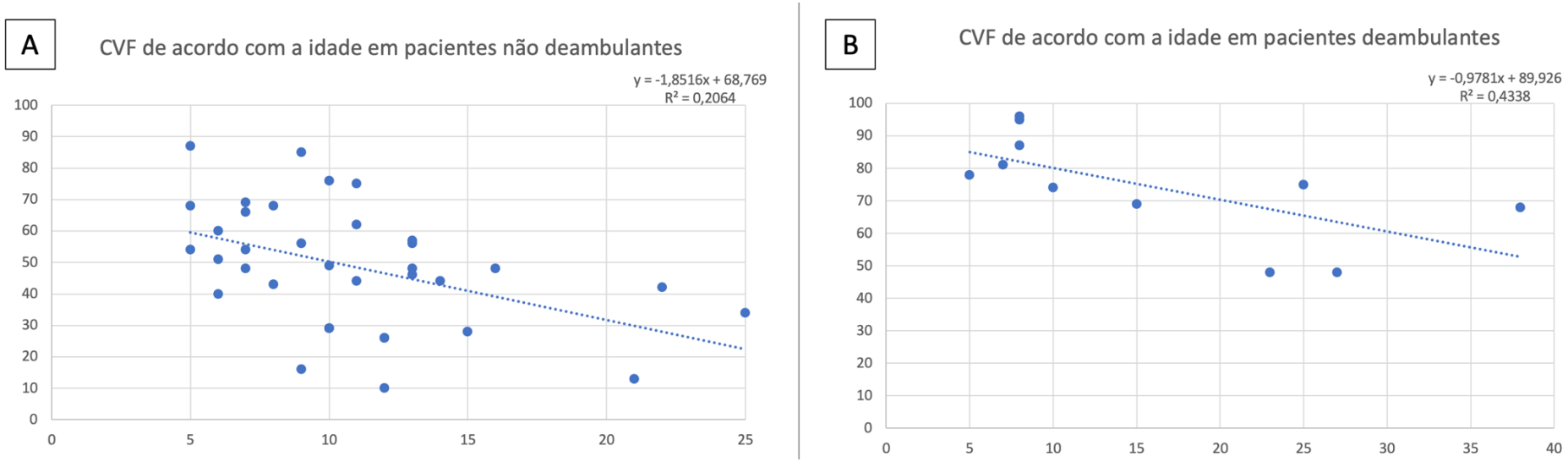
Figura 8 - Fluxograma dos pacientes que realizaram avaliação de função pulmonar através da espirometria



Fonte: Autoria própria

Os pacientes com DM-LAMA2 incapazes de deambular apresentaram queda progressiva da função respiratória de 1,85%/ano (p=0.006) e os pacientes capazes de adquirir a marcha apresentaram queda também progressiva, mas em ritmo menor, de 0,98%/ano (p=0.028) (Figura 9).

Figura 9 – Comportamento da Capacidade vital forçada (CVF) de acordo com o tempo dentre os pacientes com DM-LAMA2

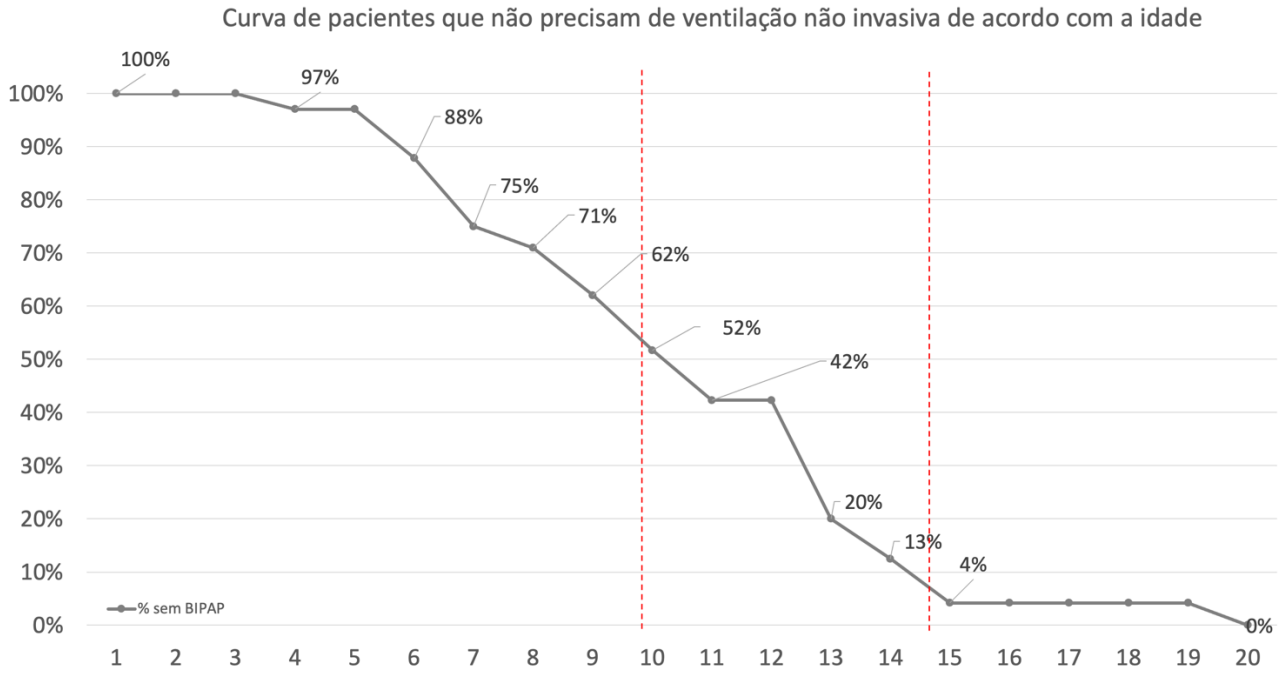


(A) Redução da CVF de acordo com a idade entre os pacientes DM-LAMA2 não deambulantes (p=0.006, com redução de 1,85% da CVF/ano) (B) Redução da CVF de acordo com a idade entre os pacientes deambulantes (p=0.028, com redução de 0.98% da CVF/ano)

Fonte: Autoria própria

Aos 10 anos de idade, metade dos pacientes com DMC-LAMA2 não deambulantes já tinha necessidade de ventilação não invasiva (VNI) noturna, e aos 15 anos de idade, quase a totalidade dos pacientes fazia uso de VNI noturna (Figura 10).

Figura 10 - Necessidade de ventilação não invasiva, de acordo com a idade, em pacientes com DM-LAMA2 não deambulantes



Fonte: Autoria própria

Dentre os pacientes com DM-LAMA2 capazes de deambular, dois estavam em uso de ventilação noturna não invasiva: um paciente que perdeu a marcha e um paciente com mais de 20 anos de idade.

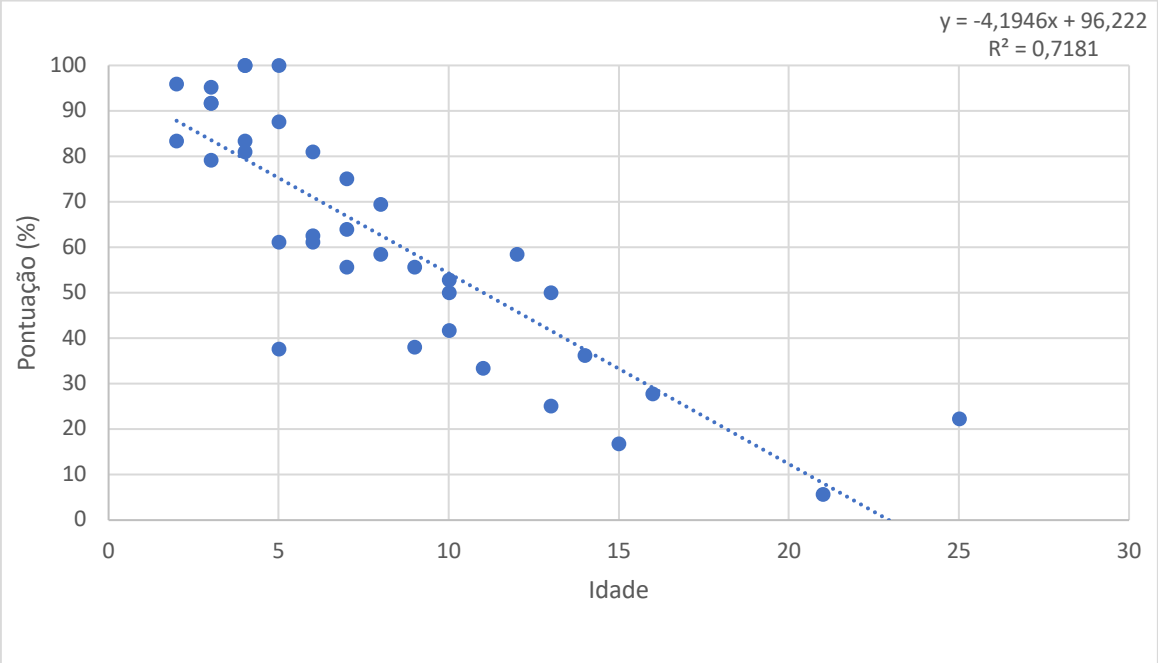
Quatro pacientes faziam uso de VNI intermitente diurna: um incapaz de sentar; um com malformação cerebral; e dois com mais de 16 anos de idade.

5.8 Avaliação da força muscular

Para avaliação das escalas motoras, os pacientes foram separados em dois grupos: os que deambulavam (N=36) e os que não deambulavam (N=8). Foram feitos, então, gráficos de dispersão para avaliar a variação da força muscular, através das escalas MFM e RULM, de acordo com a idade.

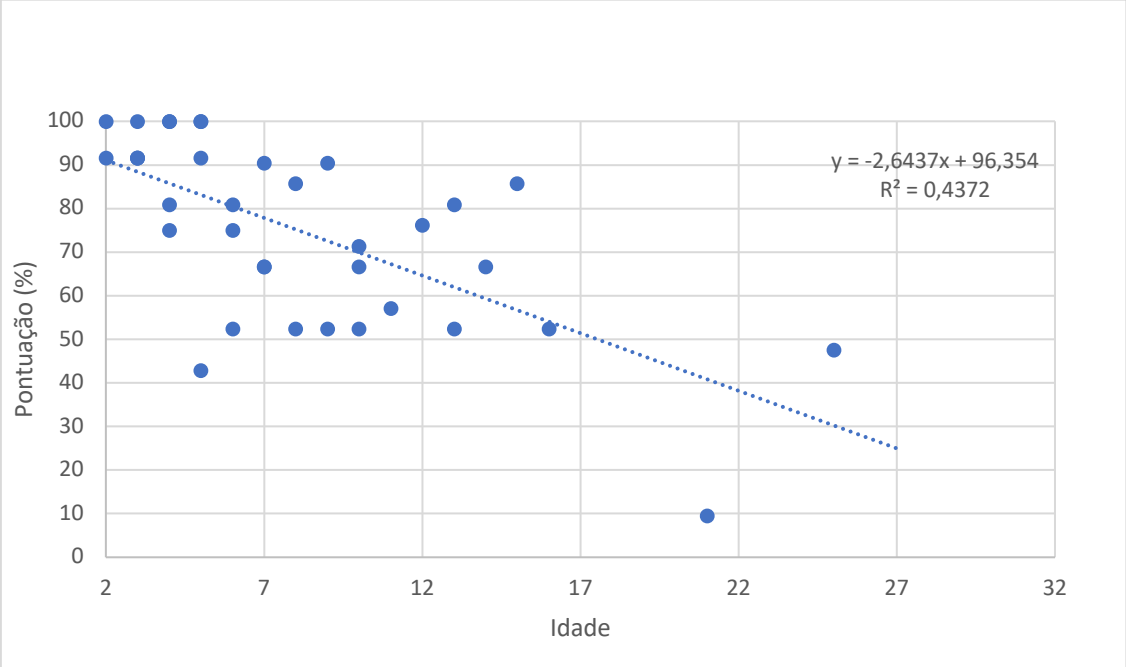
Na dimensão D1 da MFM, que avalia a posição de pé e transferências, a força muscular não mudou de acordo com o tempo dentre os não deambulantes, uma vez que eles nunca adquiriram essa habilidade. Já os domínios D2 – que avalia força proximal e axial - e o domínio D3 - força distal - evidenciaram uma redução estatisticamente significativa de função motora de acordo com a idade. Houve uma queda de 4.2% da força/ano no domínio D2 ($p<0.00001$), uma queda de 2.6% da força/ano no domínio D3 ($p<0.0001$) e uma queda de 2.7% da força/ano na avaliação global ($p<0.0001$) (Figuras 11,12 e 13). O domínio D2 foi o mais sensível à mudança para os não-ambulantes.

Figura 11 - Piora da força no domínio D2, de acordo com a idade, em pacientes com DM-LAMA2 não deambulantes



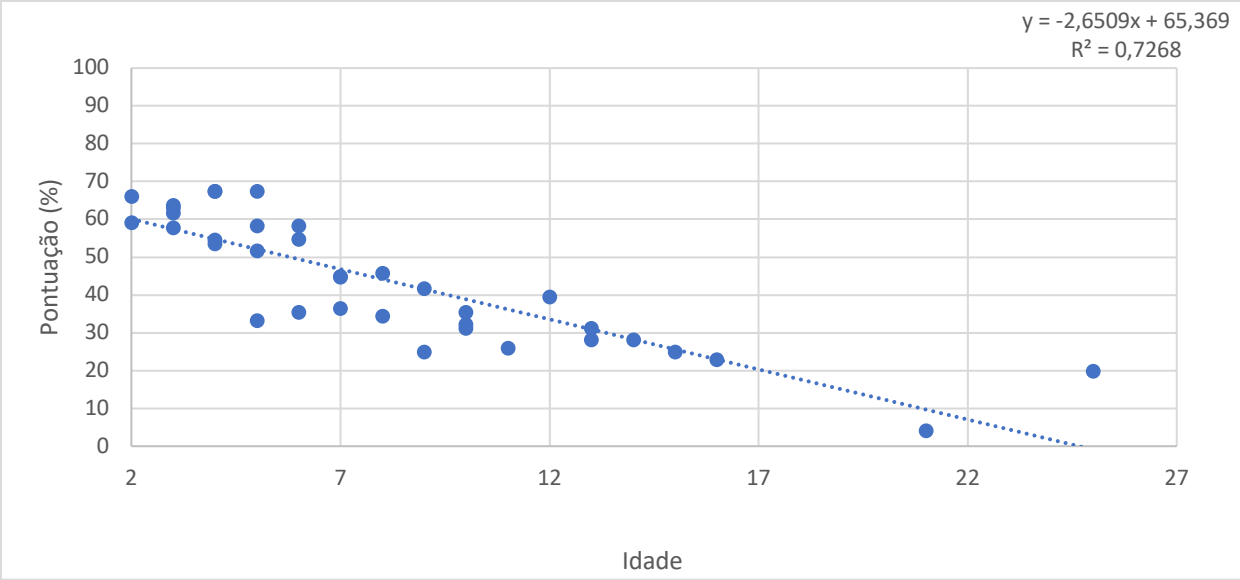
Dimensão D2 da MFM (Função motora proximal e axial) de acordo com a idade (2-25 anos) em pacientes com DM-LAMA2 não deambulantes (com redução de 4,2% de função/ano, p<0.00001)

Figura 12 - Piora da força no domínio D3, de acordo com a idade, em pacientes com DM-LAMA2 não deambulantes



Dimensão D3 da MFM (Função motora distal) em pacientes com DM-LAMA2 não deambulantes de acordo com a idade (2-25 anos) com redução de 2.6% de função/ano (p<0.0001)

Figura 13 - Piora da força na MFM total, de acordo com a idade, em pacientes com DM-LAMA2 não deambulantes



Idade 5-25 anos, média 10,8) (redução 2,7% de função/ano, p<0.0001)

Dentre os pacientes deambulantes, nenhum dos domínios da escala MFM apresentou diferença estatística de acordo com a idade (Figura 14).

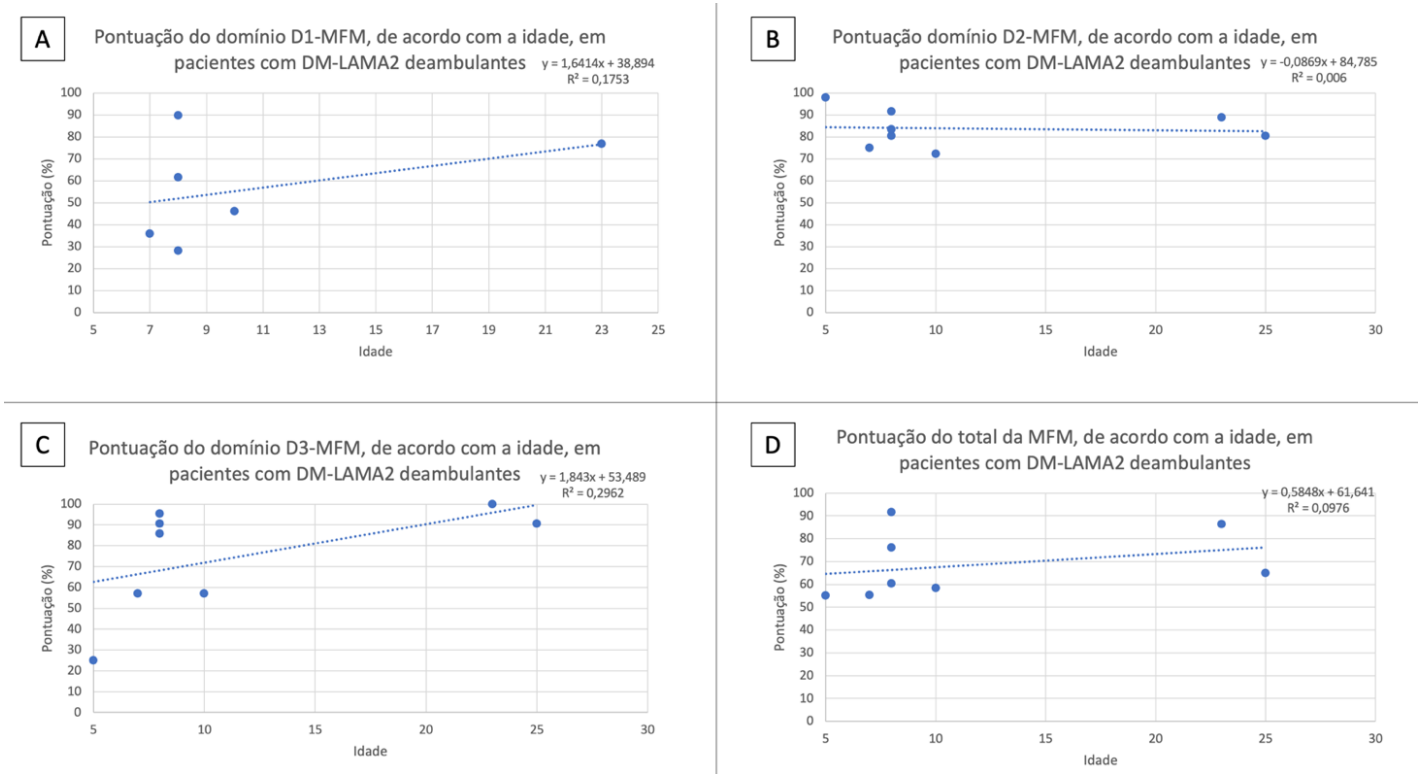
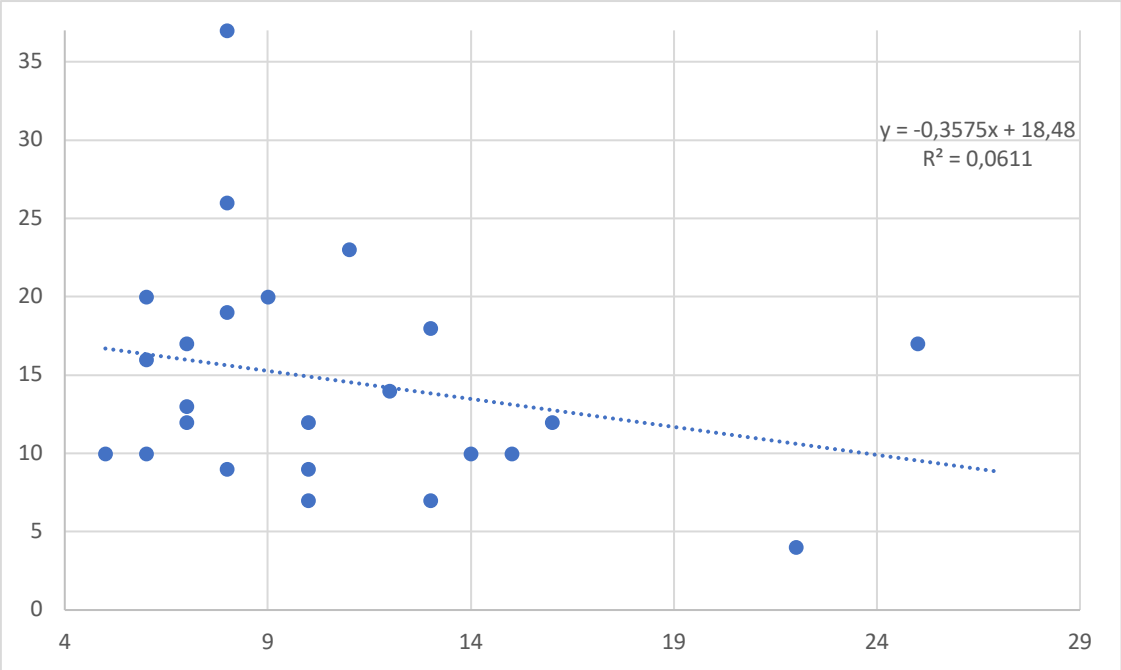


Figura 14 - Pontuação de força na escala MFM32, de acordo com a idade, entre os pacientes com DM-LAMA2 deambulantes. (A) domínio D1 (+1,64%/ano, p=0.40); (B) domínio D2 (-0.09%/ano, p=0.85); (C) domínio D3 (+1,84%/ano, p=0.16); (D) Total (+0.55%/ano, p=0.4).

A escala RULM, para membros superiores, mostrou uma redução de força de acordo com a idade dentre os não deambulantes. No entanto essa redução não teve significância estatística (p=0.244, redução 0.36 pontos de função/ano) (Figura 15).

Figura 15 – Pontuação na escala RULM de pacientes com DM-LAMA2 não deambulantes de acordo com a idade



(p=0.244, redução 0.36 pontos de função/ano)

5.8.1 Força da musculatura extrínseca dos olhos e da face

Sessenta e um pacientes dos 63 (96.8%) apresentaram fraqueza facial. Todos os pacientes que não adquiriram marcha, e 9/11 (81.8%) dos pacientes capazes de deambular.

Vinte nove pacientes (46%) apresentaram limitação na movimentação ocular (oftalmoparesia). Não houve diferença estatística em relação à presença

de oftalmoparesia e a capacidade de marcha (p=0.201). Porém, houve uma diferença estatisticamente significativa entre a presença de oftalmoparesia e a idade, sendo esse achado mais comum em pacientes com mais de 7 anos de idade (p=0.0001). A oftalmoparesia não levou a queixa de diplopia em nenhum dos pacientes.

5.9. Goniometria

Em 43 dos 52 pacientes não deambulantes utilizou-se goniometria. Foi possível observar piora das retrações ao longo do tempo de 3,22 graus/ano dos cotovelos (p=0,00087) (Figura 16A), e de 1,92 graus/ano dos joelhos (p=0,1) (Figura 16B). Em 10 dos 11 pacientes que adquiriram marcha, a utilização da goniometria também mostrou piora das retrações de cotovelos e joelhos ao longo do tempo, de 1,41 graus/ano (p=0.0003) (Figura 16C) e de 1,95 graus/ano (p=0.01), respectivamente (Figura 16D).

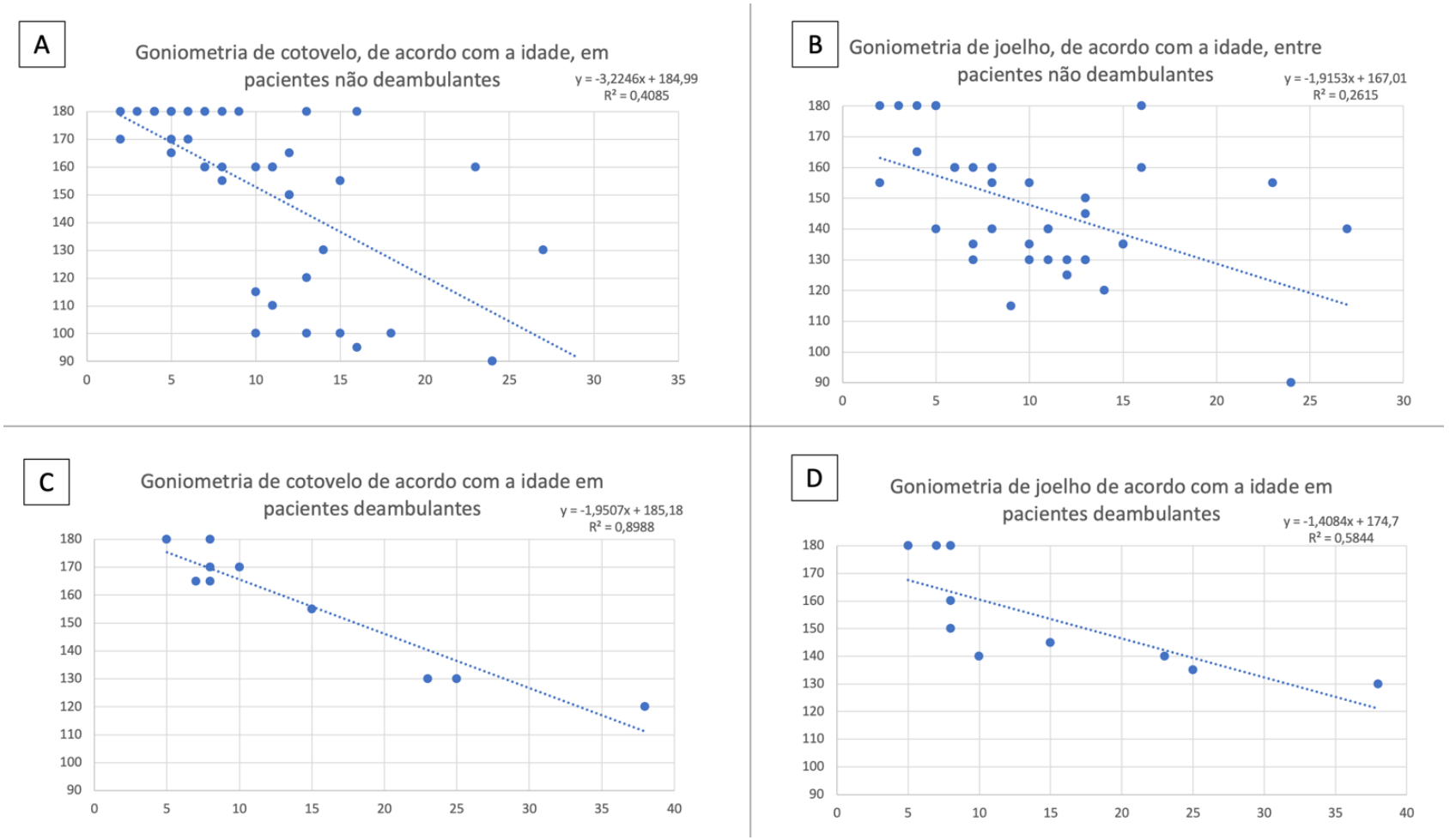


Figura 16 - Progressão da piora das retrações de cotovelos e joelhos, de acordo com a idade e com a capacidade motora máxima. (A) Piora de 3,22 graus/ano nos cotovelos (p=0,00087) e de (B) 1,92 graus/ano nos joelhos (p=0,1) dentre os pacientes não deambulantes. (C) Piora de 1,41 graus/ano nos cotovelos (p=0.0003) e de (D) 1,95 graus/ano nos joelhos (p=0,01) dentre os pacientes deambulantes.

5.10 Escoliose

Trinta pacientes não deambulantes foram submetidos a radiografia panorâmica da coluna. A média de idade de início da escoliose foi de 6.1 anos (DP: 2.6; 5-8). A progressão da escoliose foi de 4 graus/ano (p= 0,00000057), e aos 9 anos de idade, metade dos pacientes já tinha escoliose com ângulo de Cobb de pelo menos 50%, o que indicaria correção cirúrgica (Figuras 17 e 18).

Figura 17 - Evolução da escoliose, de acordo com a idade, em pacientes com DM-LAMA2 não deambulantes

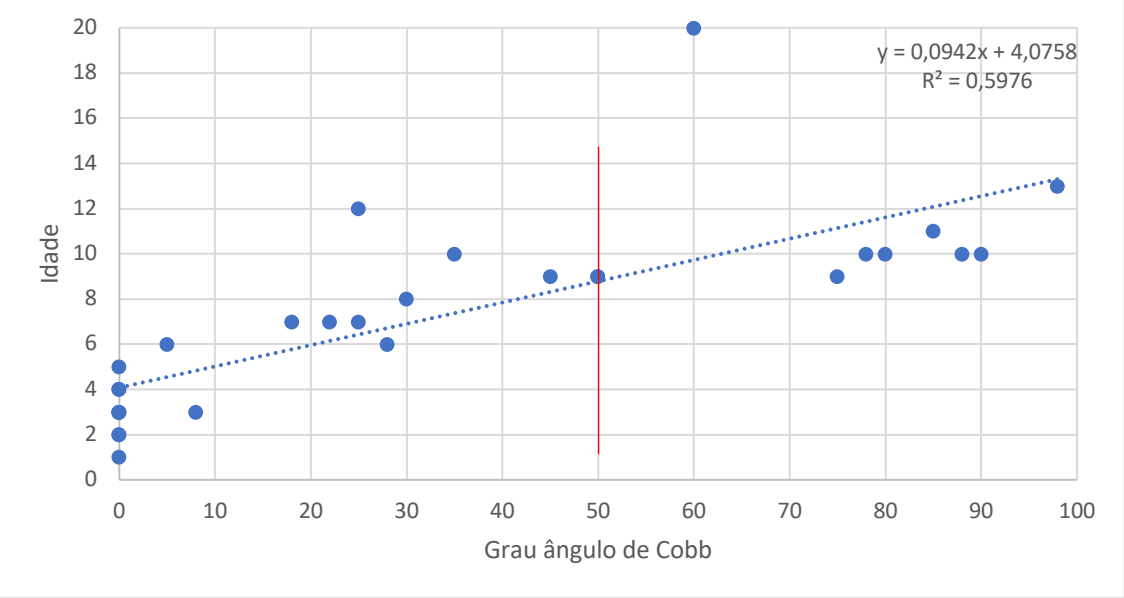
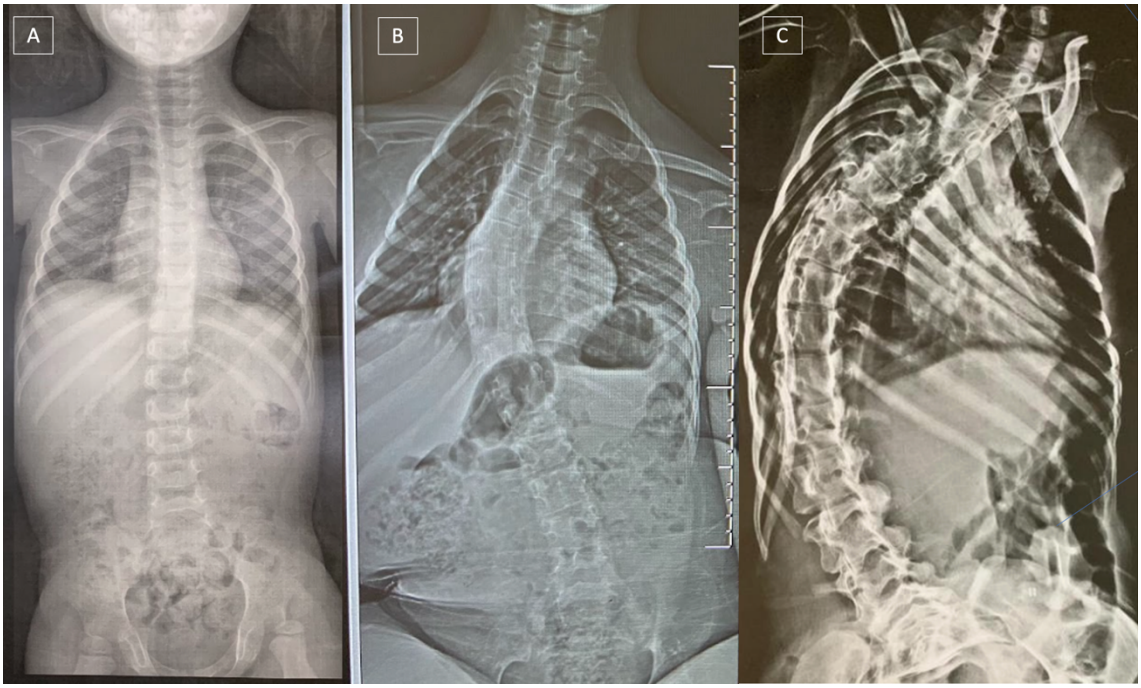


Figura 18 - Progressão da escoliose nos pacientes com DM-LAMA2 não deambulantes de acordo com a idade.



(A) paciente de 4 anos, (B) paciente de 9 anos e (C) paciente de 12 anos
Fonte: Autoria própria

5.11 Exames complementares

5.11.1 CPK

Todos os pacientes apresentaram pelo menos uma dosagem sérica de CPK com nível aumentado, com a média de 2054 U/L (valor normal: <250 U/L). Dentre os pacientes incapazes de adquirir a marcha, os níveis séricos de CPK se mostraram mais altos nos primeiros anos de vida e caíram após os 10 anos de idade.

5.11.2 Eletroneuromiografia

Dos sessenta e três pacientes, vinte e nove foram submetidos a eletroneuromiografia. A maior parte dos pacientes realizou o exame em outras instituições. Dentre os vinte nove pacientes que foram submetidos ao exame, vinte e seis apresentaram achados sugestivos de miopatia, três pacientes tiveram exame normal e um apresentou neuropatia desmielinizante associada a miopatia.

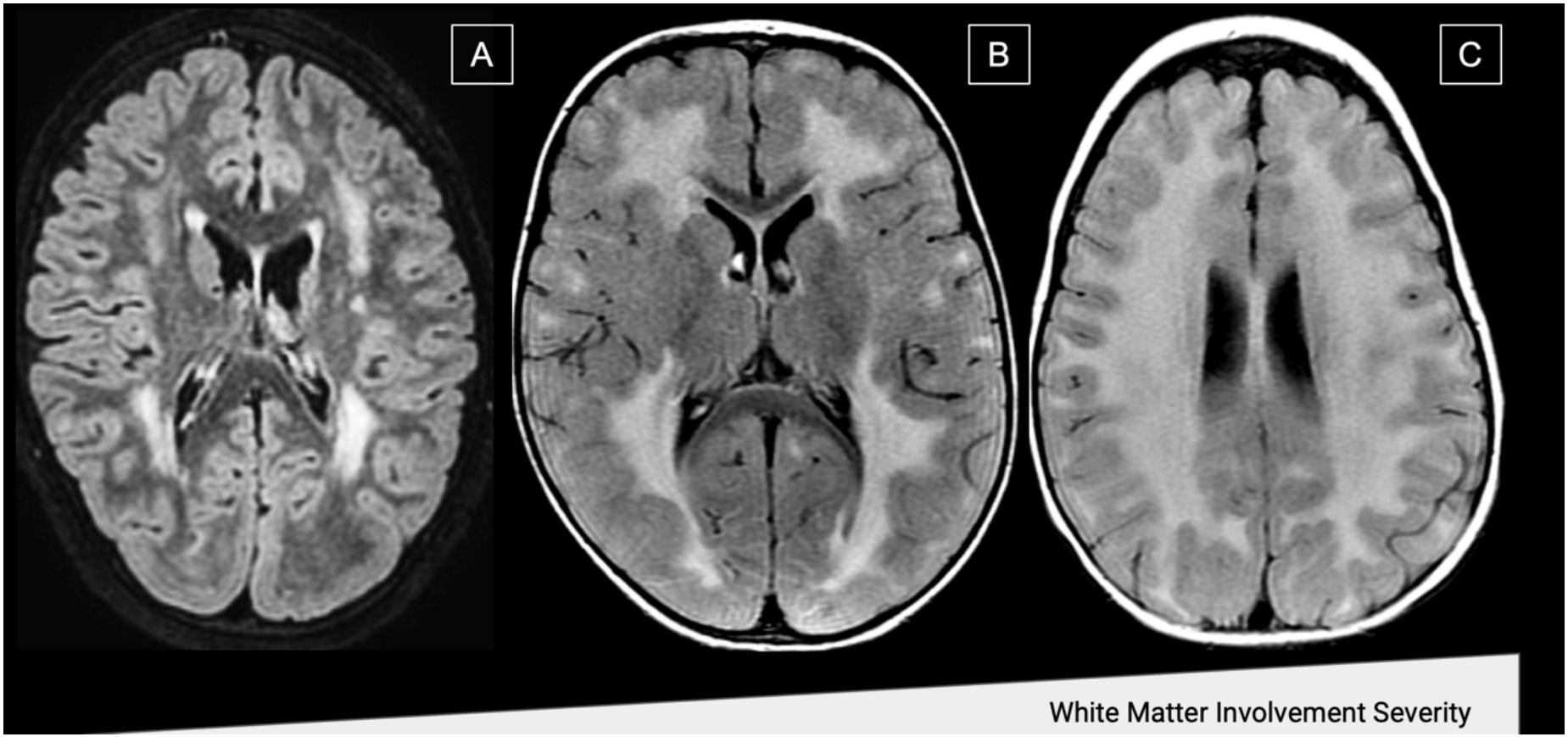
5.12 Ressonância magnética de encéfalo

Cinquenta e dois pacientes realizaram RNM de encéfalo. O restante não realizou por dificuldade de marcação do exame pelo SUS ou por serem menores de 5 anos de idade e os pais não autorizarem a realização de sedação.

Todos os 52 pacientes apresentaram algum grau de alteração da substância branca encefálica. Foi mais leve em pacientes deambulantes (principalmente naqueles com quadro clínico de distrofia muscular de cinturas), moderado em pacientes capazes de sentar, mas incapazes de andar, e severo em pacientes incapazes de sentar (Figura 19).

Dos 52 pacientes, 10 (19.2%) apresentaram malformações corticais cerebrais, caracterizadas por: polimicrogiria occipital (8/10), polimicrogiria temporal (2/10), polimicrogiria frontal (1/10), lissencefalia-paquigiria occipital (2/10) e malformação do tipo *cobblestones* occipitais (1/10). Cistos temporais foram observados em 3 pacientes (Figuras 20 e 21).

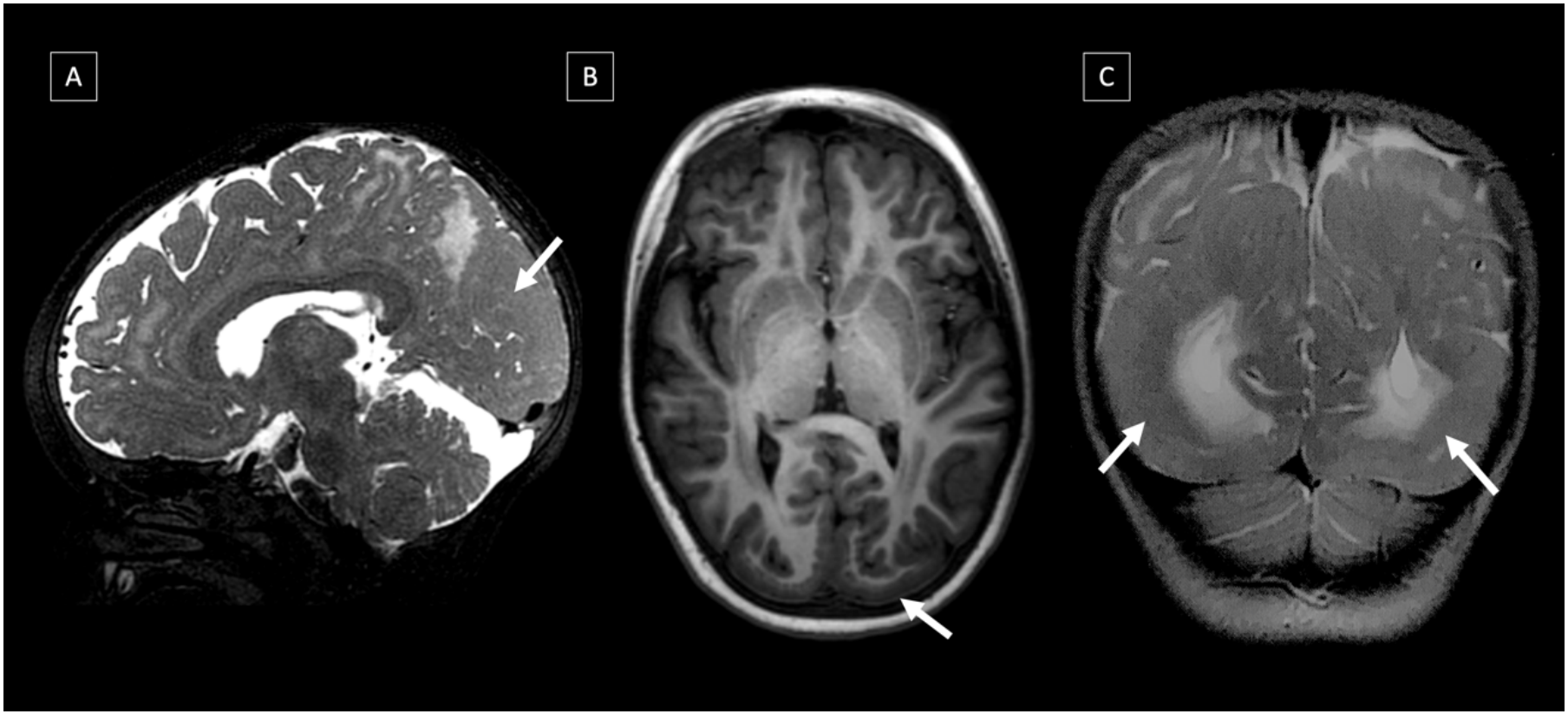
Figura 19 – Comparação do envolvimento da substância branca encefálica com quadro motor na DM-LAMA2



(A) Envolvimento leve, paciente capaz de andar; (B) Envolvimento moderad, paciente incapaz de andar; e (C) envolvimento severo, paciente incapaz de sentar.

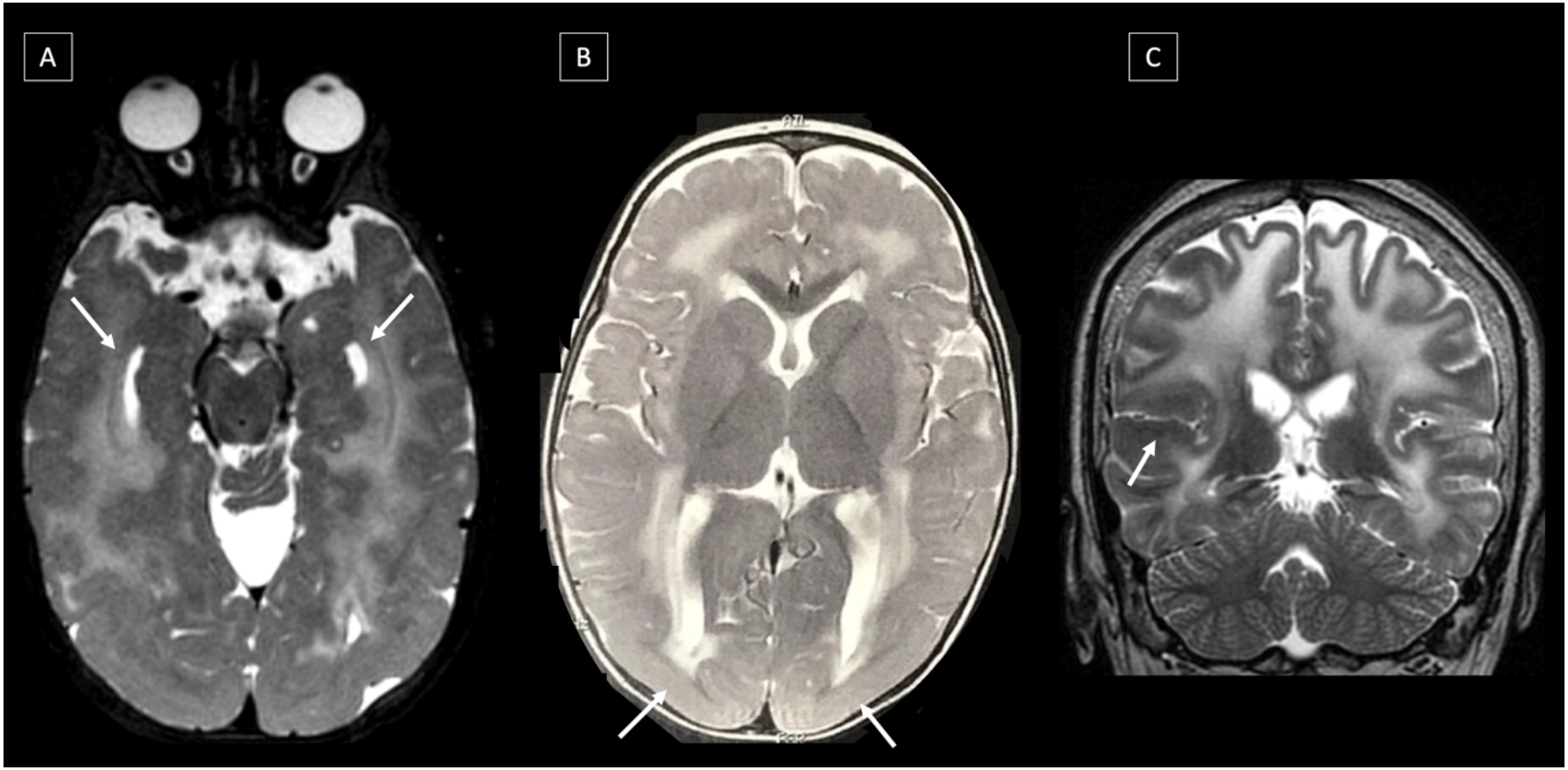
Fonte: Autoria própria

Figura 20 – Malformações cerebrais na RM da DM-LAMA2:



(A) Lisencefalia-paquigiria no lobo occipital (seta) (T2-WI), (B) Polimicrogiria e *cobblestone* no lobo occipital (seta) (T1-WI), (C) Paquigiria no lobo occipital e lobos temporais (setas) (T2-WI)
Fonte: Autoria própria

Figura 21 – Malformações cerebrais na RM DM-LAMA2:



A) Cistos temporais (setas) (T2-WI), (B) Paquigiria-lisencefalia no lobo occipital (setas) (T2-WI), (C) polimicrogiria em região perisilviana/temporal (seta) (T2-WI)
Fonte: Autoria própria

5.13 Biópsia muscular

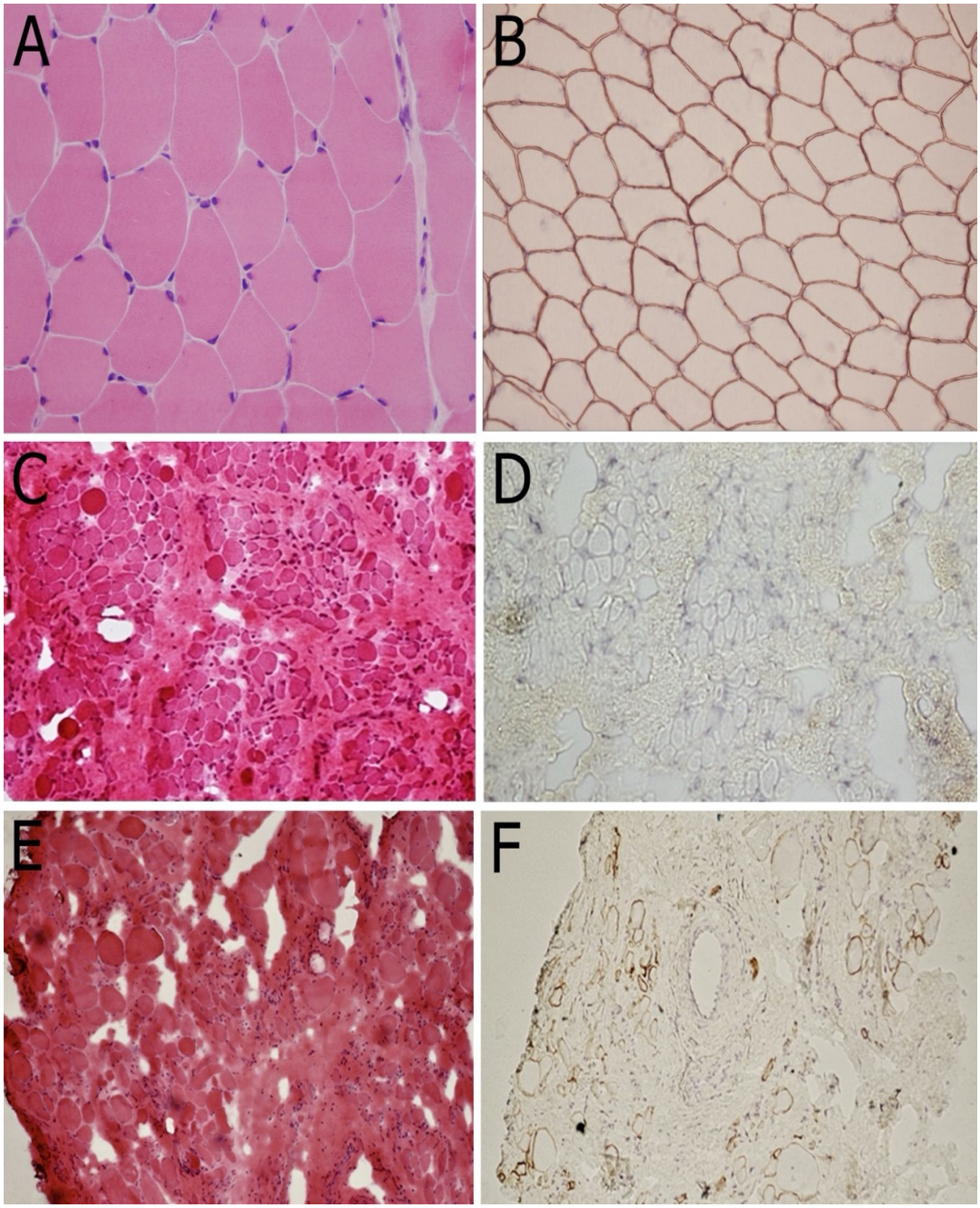
Dos quarenta e oito pacientes que nunca adquiriram a marcha, trinta foram submetidos a biópsia muscular. Todos apresentaram características distróficas moderadas ou graves e ausência de marcação imuno-histoquímica para merosina (Figura 22).

Dos onze pacientes que adquiriram a marcha, oito tinham biópsia muscular, e em todos foram observadas características distróficas leves ou moderadas. Em 7/8 foi realizada imuno-histoquímica que evidenciou marcação parcial da merosina. Apenas um paciente que adquiriu marcha tinha ausência completa de merosina na biópsia muscular, e esse paciente perdeu a marcha com a evolução da doença.

Um paciente com quadro de distrofia muscular de cinturas apresentou, além do músculo distrófico com marcação parcial da merosina, a presença de vacúolos intracitoplasmáticos (Figura 23).

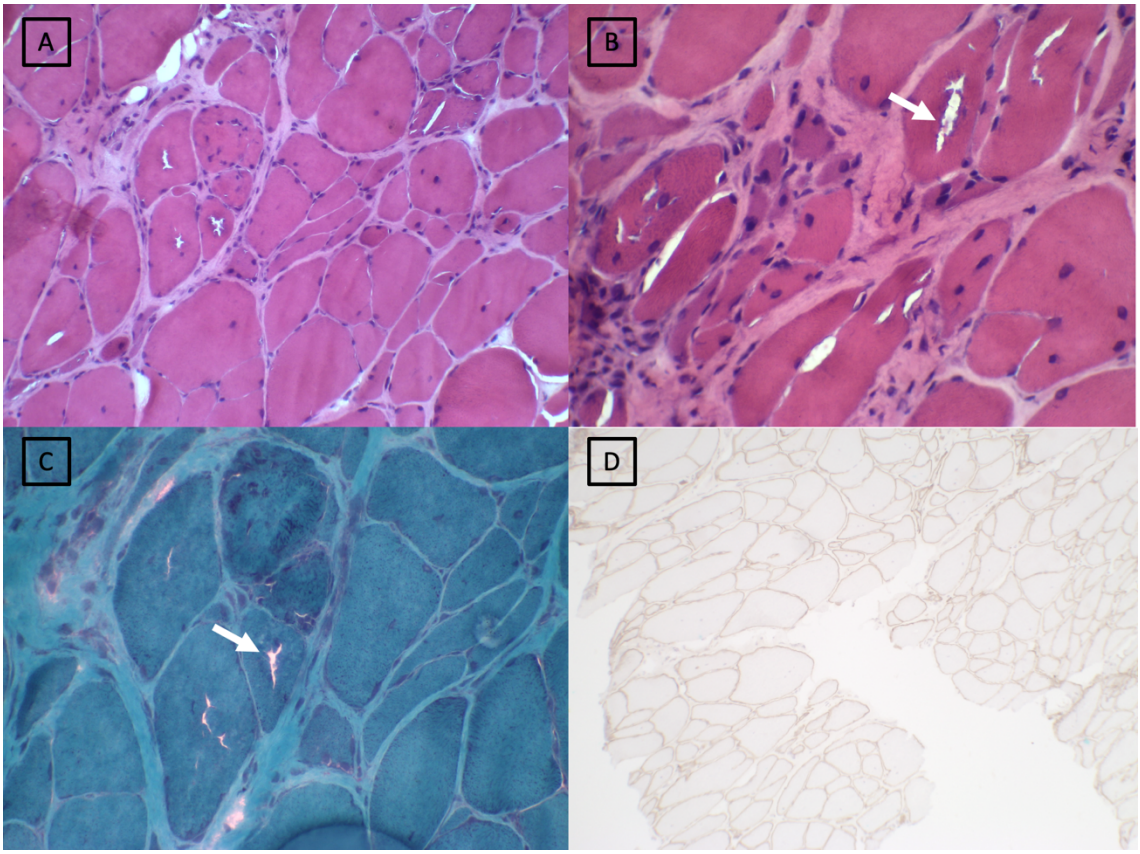
Houve uma relação entre a presença de marcação parcial de merosina e a capacidade de aquisição da marcha ($p<0.001$) (Figura 24).

Figura 22 - Biópsia muscular normal e de pacientes com DM-LAMA2.



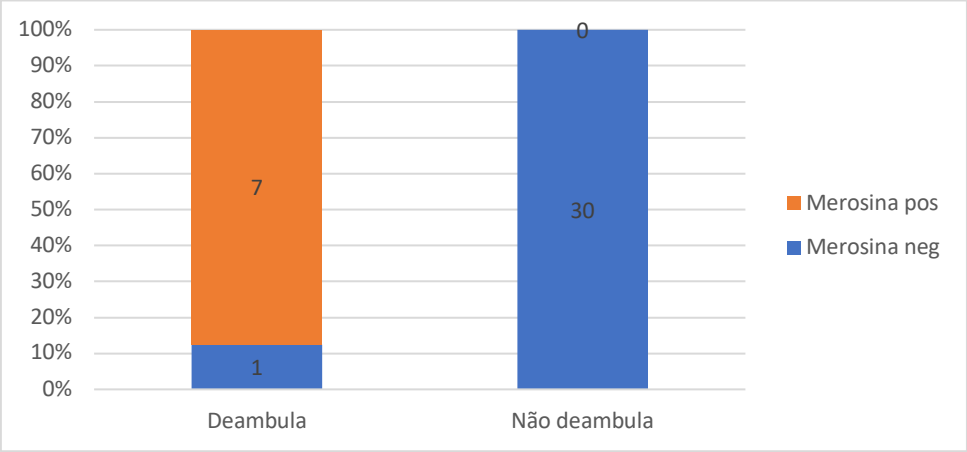
(A) biópsia muscular normal (H&E, 20X). (B) Biópsia muscular com imunomarcação normal para merosina (20X). (C) Aspecto distrófico muscular no paciente 1 com a forma congênita da DM-LAMA2 (H&E, 10X). (D) Ausência da imunomarcação para merosina na biópsia muscular do paciente 1 (10X). (E) Aspecto distrófico do tecido muscular no paciente 3 com a forma tardia da doença (H&E, 10X). (F) Redução parcial na imunomarcação para merosina na biópsia muscular do paciente 3 (10X).
Fonte: Autoria própria

Figura 23 - Biópsia muscular de paciente com DM-LAMA2 e fenótipo de distrofia muscular de cinturas.



(A) Aspecto distrófico do tecido muscular (H&E 20x); (B) Presença de vacúolos citoplasmáticos no H&E 40x (seta); (C) e no Tricrômio de Gomory (seta) (40x). (D) Marcação reduzida para merosina
Fonte: Autoria própria

Figura 24 - Marcação imuno-histoquímica da merosina e capacidade de aquisição de marcha



5.14 Genótipo

Dos 63 pacientes avaliados na coorte, 62 foram submetidos a teste genético. Apenas uma paciente (p49) não realizou o teste, pois faleceu e não houve tempo de coleta. Essa paciente teve diagnóstico confirmado pela biópsia muscular e imuno-histoquímica.

Dentre os 62 pacientes, foram identificadas 45 variantes patogênicas diferentes, 21 não reportadas previamente. Quatorze (31.8%) variantes foram do tipo fora de fase (*frameshift*), 13 (29.5%) do tipo sem sentido (*nonsense)* e duas (4.5%) em sítio de *splicing*, totalizando 29 (65.9%) variantes nulas diferentes. Oito (18.2%) variantes foram do tipo *missense* e uma (2.3%), em fase *(inframe).* Sete (15.9%) variantes diferentes foram do tipo *copy number variation* (CNV), seis delas por deleção, sendo: deleção do éxon 1, deleção dos éxons 2 a 9, deleção dos éxons 3-4, deleção do éxon 15 e deleção do éxon 56. Apenas uma duplicação, pequena, foi encontrada (éxon 38: 117bpDUP) (Figura 25, A e B, Tabela 5).

Doze pacientes (19.4%) apresentavam variantes em homozigose, e em seis (9.7%) pacientes foi encontrada apenas uma variante**.** Os demais pacientes apresentavam heterozigose composta.

As variantes estavam distribuídas ao longo do gene, não sendo identificável nenhum *hotspot.* Das 44 mutações de ponto distintas, 23 estavam localizadas no domínio LN, 8 no domínio LCC e 13 no domínio LG (Figura 25A).

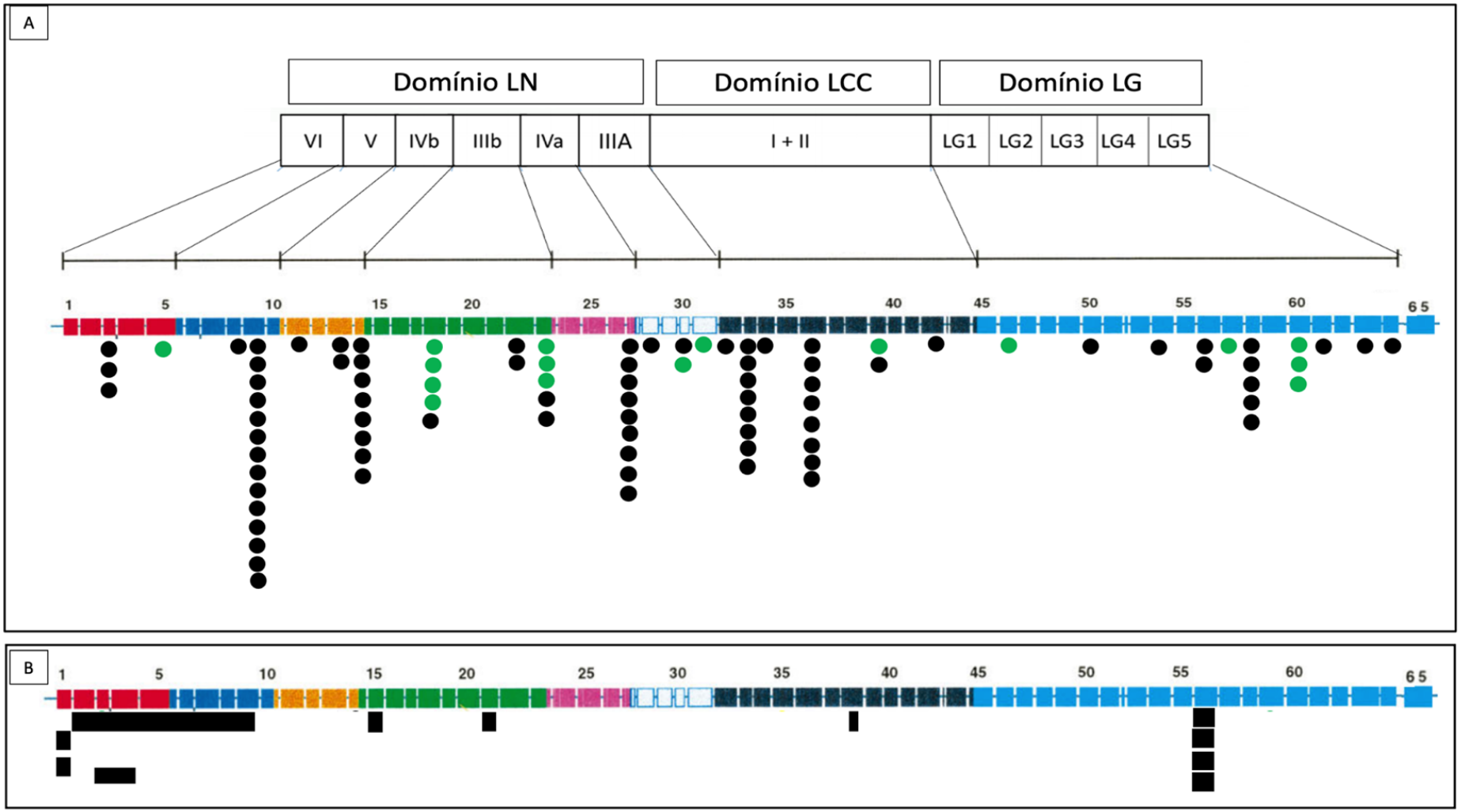


Figura 25 - Variantes encontradas na coorte de DM-LAMA2. (A) Mutações de ponto de acordo com a localização do éxon e domínio da proteína. O número de pontos representa o número de vezes que essa variante foi encontrada na coorte. Pontos pretos revelam variantes com perda de função, pontos verdes variantes *missense* ou *inframe*. (B) Mutações do tipo CNV

Das 8 variantes *missense* identifcadas, a variante c.2461A>C (p.Thr821Pro) ocorreu em cinco pacientes (p5, p41, p45, p59, p61), todos deambulantes. Essa variante já foi descrita previamente em pacientes com forma de apresentação mais leve de DM-LAMA2 e é classificada pelo Clinvar como *Likely Pathogenic*. Nessa coorte, em um paciente (p61), ela se provou estar em trans (através do sequenciamento dos progenitores) e, portanto, a classificamos como patogênica. A variante c. 3235T>C foi encontrada em três pacientes (p2, p11 e p56), sendo um deambulante. Esta mudança de sequência substitui a cisteína por arginina no códon 1079 da proteína LAMA2 (p.Cys1079Arg). O resíduo de cisteína é altamente conservado e há uma grande diferença físico-química entre cisteína e arginina. Esta variante não está presente nas bases de dados populacionais (ExAC sem frequência) e não foi reportada. O paciente p11 apresentava biópsia muscular com características distróficas e imunomarcação parcial para merosina. A modelagem avançada da sequência de proteínas e propriedades biofísicas (como informações estruturais, funcionais e espaciais, conservação de aminoácidos, variação físico-química, mobilidade de resíduos e estabilidade termodinâmica) realizada pelo laboratório Invitae indica que essa variante *missense* deve interromper a função da proteína LAMA2; portanto, a classificamos como provavelmente patogênica.

As outras seis variantes *missense* encontradas foram classificadas como variantes de significado incerto (VUS). A variante c.716G>C (p.Arg239Pro) não foi reportada previamente e ocorreu em um paciente incapaz de deambular (p.40). Tal variante não foi encontrada em bancos populacionais, se encontra em local moderadamente conservado, e há uma moderada diferença bioquímica entre os aminoácidos Arginina e Prolina.

A variante c.4397G>C (p.Cys1466Ser) não está presente em bancos populacionais, está em local altamente conservado, e há uma pequena diferença bioquímica entre a Cisteína e a Serina. Foi encontrada em um paciente capaz de deambular (p58), porém não foi realizada segregação com a segunda variante encontrada no paciente (heterozigose composta) para identificar se as variantes estão em *cis* ou em *trans.*

A variante c.4523G>A (p.Arg1508Lys) não está presente em bancos populacionais, está em local altamente conservado, e há uma pequena diferença bioquímica entre a Arginina e a Lisina. Foi encontrada em um paciente incapaz de deambular (p62), porém não foi realizada segregação com a segunda variante encontrada no paciente (heterozigose composta) para identificar se as variantes estão em *cis* ou em *trans.*

A variante c.5651G>A (p.Arg1884Lys) não está presente em bancos populacionais, porém está em local pouco conservado e tanto a Arginina, quanto a Lisina são aminoácidos básicos. Foi encontrada em um paciente incapaz de deambular (p17) e não foi realizada segregação dessa variante.

A variante c.6557T>C (p.Leu2186Pro) não está presente em bancos populacionais, está em local altamente conservado, e há uma pequena diferença bioquímica entre a Leucina e a Prolina. Foi encontrada em um paciente capaz de deambular (p58) e não foi realizada segregação.

A variante c.8164G>A (p.Ala2722Thr) não está presente em bancos populacionais, está em local moderadamente conservado, e há uma pequena

diferença bioquímica entre a Leucina e a Prolina. Foi encontrada em um paciente incapaz de deambular (p.57) e não foi realizado teste de segregação (Tabela 3).

Tabela 3 - Descrição das *missense* encontradas na coorte de pacientes com DM-LAMA2

Paciente	Posição	Domínio	Variante	Mudança predita	Interpretação	Biópsia muscular
40	Éxon 5	LN	c.716G>C	p.Arg239Pro	VUS	Distrófica, merosina negativa
5, 41, 45, 59, 61	Éxon 18	LN	c.2461A>C	p.Thr821Pro	Patogênica	Distrófica, merosina parcial
2, 11, 56	Éxon 23	LN	c.3235T>C	p.Cys1079Arg	Provavelmente patogênica	Distrófica, merosina parcial e merosina negativa
58	Éxon 30	LN	c.4397G>C	p.Cys1466Ser	VUS	Distrófica, merosina parcial
62	Éxon 31	LCC	c.4523G>A	p.Arg1508Lys	VUS	Não fez
17	Éxon 39	LCC	c.5651G>A	p.Arg1884Lys	VUS	Distrófica, merosina negativa
58	Éxon 46	LG	c.6557T>C	p.Leu2186Pro	VUS	Distrófica, merosina parcial
54	Éxon 57	LG	c.8164G>A	p.Ala2722Thr	VUS	Não fez

Foram encontradas, além das variantes *missense* e das *CNV*, 16 novas variantes, não reportadas previamente. A variante c.1128_1129insG foi encontrada em um paciente (p10) que sentou sem apoio, mas nunca adquiriu marcha, que tinha uma segunda variante nula já descrita e biópsia muscular com ausência de marcação para merosina. Por isso, e , por ser uma variante em perda de função (fora de fase), foi classificada como patogênica.

O paciente p13 apresentou duas variantes nulas não previamente reportadas: c.1590delins32 e c.4536_4537del. Ele sentou-se sem apoio, não adquiriu marcha, não foi submetido a biópsia muscular, mas apresentava quadro clínico sugestivo e hipersinal em substância branca na RNM de encéfalo. Ambas as variantes foram classificadas como provavelmente patogênicas.

As variantes c.2486_2489del e c.4888G>T foram encontradas nos pacientes p52 e p48, respectivamente, que sentaram sem apoio, não adquiriram marcha, tinham uma segunda variante nula já descrita e biópsia muscular com ausência de marcação para merosina; portanto, foram classificadas como patogênicas.

A variante c.5578C>T foi encontrada em uma paciente (p45) que adquiriu marcha e tinha uma segunda variante *missense* já descrita. Ela apresentava biópsia muscular distrófica com imunomarcação parcial para merosina. A variante foi então classificada como patogênica.

A variante c.6191del foi encontrada em uma paciente (p31) que sentou sem apoio, não adquiriu marcha, tinha uma segunda variante nula já descrita, mas não foi submetida a biópsia muscular. Essa paciente apresentava quadro clínico sugestivo e hipersinal em substância branca na RNM de encéfalo. A variante foi então classificada como patogênica.

A variante c. 7518C>A foi encontrada em uma paciente (p3) que adquiriu marcha e que não apresentou uma segunda variante. Essa paciente tinha biópsia muscular distrófica com imunomarcação parcial para merosina e apresentava hipersinal em substância branca na RNM de encéfalo. A variante foi então classificada como provavelmente patogênica.

A variante c. 8856_8858del foi encontrada em três pacientes distintos (p18, p43, p59). No paciente p18 essa variante *inframe* foi encontrada em homozigose. Esse paciente era incapaz de deambular, apresentou malformação cortical, epilepsia e biópsia muscular distrófica com ausência completa de merosina. Essa variante foi então classificada como patogênica.

A variante c.8613dup foi encontrada em um paciente (p40) que não adquiriu a marcha e apresentava uma segunda variante *missense* de significado incerto. A biópsia muscular desse paciente era distrófica com ausência de imunomarcação de merosina. Essa variante *nonsense* foi classificada então como patogênica.

A variante c. 8776del foi encontrada em um paciente (p63) cuja segunda variante foi uma variante nula já descrita. Esse paciente não foi submetido a biópsia muscular, porém apresentava quadro clínico sugestivo e alteração de hipersinal em substância branca na RNM de encéfalo. Essa variante fora de fase foi, então, classificada como provavelmente patogênica.

A variante c.9168_9169dup, fora de fase, foi encontrada na paciente p37, que apresentava uma segunda variante nula já descrita. Essa paciente tinha o marco motor máximo de sentar sem apoio e apresentava biópsia muscular distrófica com ausência completa da merosina na imuno-histoquímica. Essa variante foi então classificada como patogênica.

A variante c.9223C>T foi encontrada no paciente p44, que apresentava uma outra variante nula já descrita. Esse paciente apresentava biópsia muscular distrófica com ausência de merosina na imuno-histoquímica. Essa variante foi classificada como patogênica (Tabela 4).

Quatorze pacientes (22.6%) apresentaram uma nova variante fora de fase recorrente (c.1255del; p. Ile419Leufs*4), em homozigose em três pacientes. Esta variante não foi reportada anteriormente e está ausente em bancos populacionais (Gnomad). Os três pacientes com a variante em homozigose tinham apresentação clássica da doença, não adquiriram marcha e não apresentaram malformação

cortical ou epilepsia. Em nove pacientes, a biópsia muscular apresentava músculo distrófico com ausência de imunomarcação para merosina (Tabela 4). Todas as variantes encontradas foram descritas na Tabela 5.

Tabela 4 - Variantes não missense e que não haviam sido previamente reportadas

Paciente	Éxon	Variante	Mudança predita	Domínio	Efeito no mRNA	Classificação	Biópsia muscular	Zigosidade
10	8	c.1128_1129 insG	p.Val377Cysf sTer4	LN	Frameshift	Patogênica	Distrófica, ausência de merosina	Heterozigose composta
	9	c. 1255del	p.Ile419LeuF s*4	LN	Frameshift	Patogênica	Distrófica, ausência de merosina	Heterozigose composta homozigose
13	11	c.1590delins 32	p.Tyr531Glyf s*27	LN	Frameshift	Provavelmente patogênica	NA	Heterozigose composta
52	18	c.2489_2492 del	p.Leu830Ser fsTer57	LN	Frameshift	Patogênica	Distrófica, ausência de merosina	Heterozigose composta
13	32	c.4536_4537 del	p.Thr1514Tr p	LCC	Frameshift	Provavelmente patogênica	NA	Heterozigose composta
48	34	c.4888G>T	p.Glu1630	LCC	Nonsense	Patogênica	Distrófica, ausência de merosina	Heterozigose composta
45	39	c.5578C>T	p.Gln1860	LCC	Nonsense	Patogênica	Distrófica, marcação parcial de merosina	Heterozigose composta
31	43	c.6191del	p.Gly2046Al a	LCC	Frameshift	Patogênica	NA	Heterozigose composta
3	53	c.7518C>A	p.Tyr2506	LG	Nonsense	Provavelmente patogênica	Distrófica, marcação parcial de merosina	Heterozigose
18, 43, 59	60	c.8556_8558 del	p.Ile2852del	LG	Inframe	Patogênica	Distrófica, ausência de merosina	Heterozigose composta Homozigose
40	60	c.8613dup	p.Ala2872Se rfsTer30	LG	Frameshift	Patogênica	Distrófica, ausência de merosina	Heterozigose composta
63	61	c.8776del	p.Hi2926Me	LG	Frameshift	Provavelmente patogênica	NA	Heterozigose composta
37	63	c.9168_9169 dup	p.Ser3057Ty r	LG	Frameshift	Patogênica	Distrófica, ausência de merosina	Heterozigose composta
44	64	c.9223C>T	p.Gln3075*	LG	Nonsense	Patogênica	Distrófica, ausência de merosina	Heterozigose composta

Tabela 5 – Total das variantes encontradas na coorte *(continua)*

Paciente	Posição	Mutação	Domínio	Mudança predita	Efeito no mRNA	Publicada	Interpretação	Deambula	Epilepsia	Malformação cortical	Zigosidade
39	Exon 1	deleção exon 1	LN		CNV	Não	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
52	Exon 1	deleção exon 1	LN		CNV	Não	Patogênica	Não	Sim	Sim	Heterozigose
11	Exon 2	deleção exon 2-9	LN		CNV	Não	Patogênica	Sim	Não	Não	Heterozigose
57	Exon 3	Deleção exon 3-4	LN		CNV	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
38	Exon 3	c.363C>A	LN	p.(Tyr121*)	Nonsense	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
50	Exon 3	c.363C>A	LN	p.(Tyr121*)	Nonsense	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Falta segunda variante
32	Exon 3	c.391C>T	LN	p.Gln131*	Nonsense	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
40	Exon 5	c.716G>C	LN	p.Arg239Pro	missense	Não	VUS	Não	Não	NA	Heterozigose
10	Exon 8	c.1128_1129insG	LN	p.Val377Cysfs*4	Frameshift	Não	Patogênica	Não	Sim	Sim	Heterozigose
1	Exon 9	c.1255del	LN	p.Ile419Leufs*4	Frameshift	Não	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
6	Exon 9	c.1255del	LN	p.Ile419Leufs*4	Frameshift	Não	Patogênica	Sim	Não	Não	Homozigose
7	Exon 9	c.1255del	LN	p.Ile419Leufs*4	Frameshift	Não	Patogênica	Não	Não	Não	Homozigose
15	Exon 9	c.1255del	LN	p.Ile419Leufs*4	Frameshift	Não	Patogênica	Não	Não	Não	Homozigose
17	Exon 9	c.1255del	LN	p.Ile419Leufs*4	Frameshift	Não	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
26	Exon 9	c.1255del	LN	p.Ile419Leufs*4	Frameshift	Não	Patogênica	Não	Não	NA	Heterozigose
27	Exon 9	c.1255del	LN	p.Ile419Leufs*4	Frameshift	Não	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
34	Exon 9	c.1255del	LN	p.Ile419Leufs*4	Frameshift	Não	Patogênica	Não	Não	NA	Heterozigose
35	Exon 9	c.1255del	LN	p.Ile419Leufs*4	Frameshift	Não	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
36	Exon 9	c.1255del	LN	p.Ile419Leufs*4	Frameshift	Não	Patogênica	Não	Sim	Sim	Heterozigose
43	Exon 9	c.1255del	LN	p.Ile419Leufs*4	Frameshift	Não	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
47	Exon 9	c.1255del	LN	p.Ile419Leufs*4	Frameshift	Não	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
48	Exon 9	c.1255del	LN	p.Ile419Leufs*4	Frameshift	Não	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
61	Exon 9	c.1255del	LN	p.Ile419Leufs*4	Frameshift	Não	Patogênica	Sim	Não	NA	Heterozigose
13	Exon 11	c.1590delins32	LN	p.Tyr531Glyfs*27	Frameshift	Não	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
24	Exon 13	c.1854_1861dup	LN	p.Leu621Hisfs	Frameshift	Sim	Patogênica	Não	Não	NA	Heterozigose
27	Exon 13	c.1854_1861dup	LN	p.Leu621Hisfs	Frameshift	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
4	Exon 14	c.2049_2050del	LN	p.Arg683Serfs*21	Frameshift	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
5	Exon 14	c.2049_2050del	LN	p.Arg683Serfs*21	Frameshift	Sim	Patogênica	Sim	Não	Não	Heterozigose
9	Exon 14	c.2049_2050del	LN	p.Arg683Serfs*21	Frameshift	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
28	Exon 14	c.2049_2050del	LN	p.Arg683Serfs*21	Frameshift	Sim	Patogênica	Não	Não	NA	Falta segunda variante
12	Exon 14	c.2049_2050del	LN	p.Arg683Serfs*21	Frameshift	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
54	Exon 14	c.2049_2050del	LN	p.Arg683Serfs*21	Frameshift	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
55	Exon 14	c.2049_2050del	LN	p.Arg683Serfs*21	Frameshift	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
57	Exon 14	c.2049_2050del	LN	p.Arg683Serfs*21	Frameshift	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
25	Exon 15	deleção	LN		CNV	Não	Likely pathogenic	Não	Não	Não	Heterozigose

Tabela 5 - Total das variantes encontradas na coorte *(continua)*

Paciente	Posição	Mutação	Domínio	Mudança predita	Efeito no mRNA	Publicada	Interpretação	Deambula	Epilepsia	Malformação cortical	Zigosidade
5	Exon 18	c.2461A>C	LN	p.Thr821Pro	missense	Sim	Patogênica	Sim	Não	Não	Heterozigose
41	Exon 18	c.2461A>C	LN	p.Thr821Pro	missense	Sim	Patogênica	Sim	Não	Não	Heterozigose
45	Exon 18	c.2461A>C	LN	p.Thr821Pro	missense	Sim	Patogênica	Sim	Não	Não	Heterozigose
59	Exon 18	c.2461A>C	LN	p.Thr821Pro	missense	Sim	Patogênica	Sim	Não	NA	Heterozigose
61	Exon 18	c.2461A>C	LN	p.Thr821Pro	missense	Sim	Patogênica	Sim	Não	NA	Heterozigose
52	Exon 18	c.2489_2492del	LN	p.Leu830Serfs	Frameshift	Não	Patogênica	Não	Sim	Sim	Heterozigose
8	Exon 21	deletion	LN		CNV	Não	Patogênica	Não	Não	Sim	Homozigose
14	Exon 22	c.3085C>T	LN	p.Arg1029*	Nonsense	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
23	Exon 22	c.3085C>T	LN	p.Arg1029*	Nonsense	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
2	Exon 23	c.3235T>C	LN	p.Cys1079Arg	missense	Não	Likely pathogenic	Não	Não	Não	Heterozigose
11	Exon 23	c.3235T>C	LN	p.Cys1079Arg	missense	Não	Likely pathogenic	Sim	Não	Não	Heterozigose
56	Exon 23	c.3235T>C	LN	p.Cys1079Arg	missense	Não	Likely pathogenic	Não	Não	Não	Heterozigose
20	Exon 23	c.3349C>T	LN	p.Arg1117*	Nonsense	Não	Patogênica	Não	Não	Não	Falta segunda variante
37	Exon 23	c.3372dup	LN	p.Cys1125Met	Frameshift	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
24	Exon 27	c.3955C>T	LN	p.Arg1326*	Nonsense	Sim	Patogênica	Não	Não	NA	Heterozigose
63	Exon 27	c.3955C>T	LN	p.Arg1326*	Nonsense	Sim	Patogênica	Não	Sim	Sim	Heterozigose
2	Exon 27	c.3976C>T	LN	p.Arg1326*	Nonsense	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
10	Exon 27	c.3976C>T	LN	p.Arg1326*	Nonsense	Sim	Patogênica	Não	Sim	Sim	Heterozigose
16	Exon 27	c.3976C>T	LN	p.Arg1326*	Nonsense	Sim	Patogênica	Sim	Não	Não	Heterozigose
19	Exon 27	c.3976C>T	LN	p.Arg1326*	Nonsense	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
42	Exon 27	c.3976C>T	LN	p.Arg1326*	Nonsense	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
51	Exon 27	c.3976C>T	LN	p.Arg1326*	Nonsense	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Homozigose
53	Exon 27	c.3976C>T	LN	p.Arg1326*	Nonsense	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Homozigose
56	Exon 27	c.3976C>T	LN	p.Arg1326*	Nonsense	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
14	Intron 28	c.4176+1G>A	LN		Splicing	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
44	Exon 30	c.4348C>T	LN	p.Arg1450*	Nonsense	Não	Patogênica	Não	Sim	Sim	Heterozigose
58	Exon 30	c.4397G>C	LN	p.Cys1466Ser	missense	Não	VUS	Sim	Não	NA	Heterozigose
62	Exon 31	c.4523G>A	LCC	p.Arg1508Lys	missense	Não	VUS	Não	Não	NA	Heterozigose
13	Exon 32	c.4536_4537del	LCC	Thr1514Trpfs*14	Frameshift	Não	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
1	Exon 33	c.4739dup	LCC	Leu1581Profs*5	Frameshift	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
26	Exon 33	c.4739dup	LCC	Leu1581Profs*5	Frameshift	Sim	Patogênica	Não	Não	NA	Heterozigose
34	Exon 33	c.4739dup	LCC	Leu1581Profs*5	Frameshift	Sim	Patogênica	Não	Não	NA	Heterozigose
35	Exon 33	c.4739dup	LCC	Leu1581Profs*5	Frameshift	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
38	Exon 33	c.4739dup	LCC	Leu1581Profs*5	Frameshift	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
39	Exon 33	c.4739dup	LCC	Leu1581Profs*5	Frameshift	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
55	Exon 33	c.4739dup	LCC	Leu1581Profs*5	Frameshift	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
60	Exon 33	c.4739dup	LCC	Leu1581Profs*5	Frameshift	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Homozigose

Tabela 5 - Total das variantes encontradas na coorte *(final)*

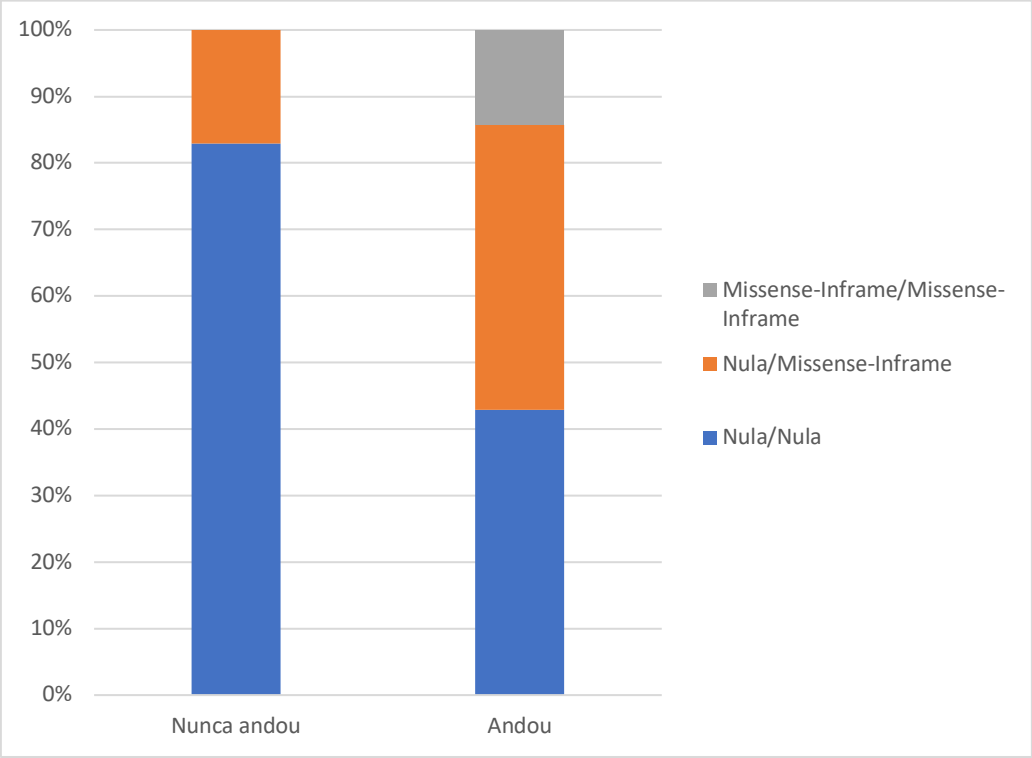
Paciente	Posição	Mutação	Domínio	Mudança predita	Efeito no mRNA	Publicada	Interpretação	Deambula	Epilepsia	Malformação cortical	Zigosidade
48	Exon 34	c.4888G>T	LCC	p.Glu1630*	Nonsense	Não	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
4	Intron 36	c.5234+1G>A	LCC		Splicing	Sim	Patogênica	Não	Não	NA	Heterozigose
19	Intron 36	c.5234+1G>A	LCC		Splicing	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
22	Intron 36	c.5234+1G>A	LCC		Splicing	Sim	Patogênica	Não	Sim	Sim	Heterozigose
23	Intron 36	c.5234+1G>A	LCC		Splicing	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
32	Intron 36	c.5234+1G>A	LCC		Splicing	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
30	Intron 36	c.5234+1G>A	LCC		Splicing	Sim	Patogênica	Não	Sim	Não	Heterozigose
41	Intron 36	c.5234+1G>A	LCC		Splicing	Sim	Patogênica	Sim	Não	Não	Heterozigose
42	Intron 36	c.5234+1G>A	LCC		Splicing	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
30	Exon 38	117bpDUP	LCC		CNV	Não	Patogênica	Não	Sim	Não	Heterozigose
45	Exon 39	c.5578C>T	LCC	p.Gln1860*	Nonsense	Não	Patogênica	Sim	Não	Não	Heterozigose
17	Exon 39	c.5651G>A	LCC	p.Arg1884Lys	Missense	Não	VUS	Não	Não	Não	Heterozigose
31	Exon 43	c.6191del	LCC	p.Gly2064Alafs	Frameshift	Não	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
58	Exon 46	c.6557T>C	LG	p.Leu2186Pro	missense	Não	VUS	Sim	Não	NA	Heterozigose
62	Exon 50	c.7147C>T	LG	p.Arg2838*	Nonsense	Sim	Patogênica	Não	Não	NA	Heterozigose
3	Exon 54	c.7518C>A	LG	p.Tyr2506*	Nonsense	Não	Patogênica	Sim	Não	Não	Falta segunda variante
21	Exon 56	c.7732C>T	LG	p.Arg2578*	Nonsense	Sim	Patogênica	Não	Sim	Sim	Homozigose
25	Exon 56	c.7750-1713_78899-2153del	LG	p.Ala2584Hisfs*8	Frameshift	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
22	Exon 56	deleção	LG	deleção exon 56	CNV	Sim	Patogênica	Não	Sim	Sim	Heterozigose
29	Exon 56	deleção	LG	deleção exon 56	CNV	Sim	Patogênica	Não	Não	NA	Homozigose
33	Exon 56	deleção	LG	deleção exon 56	CNV	Sim	Patogênica	Sim	Não	Não	Homozigose
47	Exon 56	deleção	LG	deleção exon 56	CNV	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
54	Exon 57	c.8164G>A	LG	p.Ala2722Thr	Missense	Não	VUS	Não	Não	Não	Heterozigose
12	Intron 58	c.8244+1G>A	LG		Splicing	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
16	Intron 58	c.8244+1G>A	LG		Splicing	Sim	Patogênica	Sim	Não	Não	Heterozigose
31	Intron 58	c.8244+1G>A	LG		Splicing	Sim	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
36	Intron 58	c.8244+1G>A	LG		Splicing	Sim	Patogênica	Não	Sim	Sim	Heterozigose
46	Intron 58	c.8244+1G>A	LG		Splicing	Sim	Patogênica	Não	Sim	Sim	Homozigose
18	Exon 60	c.8556_8558del	LG	p.Ile2852del	Inframe	Não	Likely pathogenic	Não	Sim	Sim	Homozigose
43	Exon 60	c.8556_8558del	LG	p.Ile2852del	Inframe	Não	Likely pathogenic	Não	Não	Não	Heterozigose
59	Exon 60	c.8556_8558del	LG	p.Ile2852del	Inframe	Não	Likely pathogenic	Sim	Não	NA	Heterozigose
40	Exon 60	c.8613dup	LG	p.Ala2872SerfsTer30	Frameshift	Não	Patogênica	Não	Não	NA	Heterozigose
63	Exon 61	c.8776del	LG	p.His2926MeyfsTer35	Frameshift	Não	Patogênica	Não	Sim	Sim	Heterozigose
37	Exon 63	c.9168_9169dup	LG	p.Ser3057Tyr	Frameshift	Não	Patogênica	Não	Não	Não	Heterozigose
44	Exon 64	c.9223C>T	LG	p.Gln3075*	Nonsense	Não	Patogênica	Não	Sim	Sim	Heterozigose

5.15 Correlação Genótipo-Fenótipo

Dentre os 11 pacientes que adquiriram a marcha, quatro tinham fenótipo de distrofia muscular de cinturas e dois deles apresentavam variantes não nulas em ambos os alelos (p59 com uma *missense* e uma *inframe* e p58 com duas *missense*); quatro tiveram uma variante *missense* e uma variante nula (p5, p41, p45 e p61); um teve uma variante *missense* e uma CNV (p11); um apresentou deleção em homozigose do éxon 56 (p33); e um teve apenas uma variante nula encontrada (p3). Apenas dois pacientes apresentavam duas variantes nulas (p6 e p16); e esses casos mostraram maior atraso na aquisição de marcha, com a perda de marcha ainda na primeira década de vida (ambos com 8 anos de idade).

Pudemos observar, portanto, uma relação entre a presença de ao menos uma variante não nula (*missense* ou *inframe*) e a capacidade de adquirir marcha ($p<0.0001$; OR: 6.48) (Figura 26).

Figura 26 - Presença de ao menos uma variante não nula (*missense* e *inframe*) e a capacidade de se adquirir marcha.



p<0.0001, OR:6.48
Fonte: Autoria própria

Dentre os pacientes que realizaram RM de encéfalo, apenas os pacientes incapazes de andar apresentaram malformações corticais e/ou epilepsia.

Os dois pacientes incapazes de sentar (N = 2/52) apresentaram envolvimento do SNC. Um (50%) apresentava malformação cortical, e um (50%) apresentava epilepsia; ambos (100%) tinham deficiência intelectual. Esses dois pacientes tiveram variantes nulas em ambos os alelos.

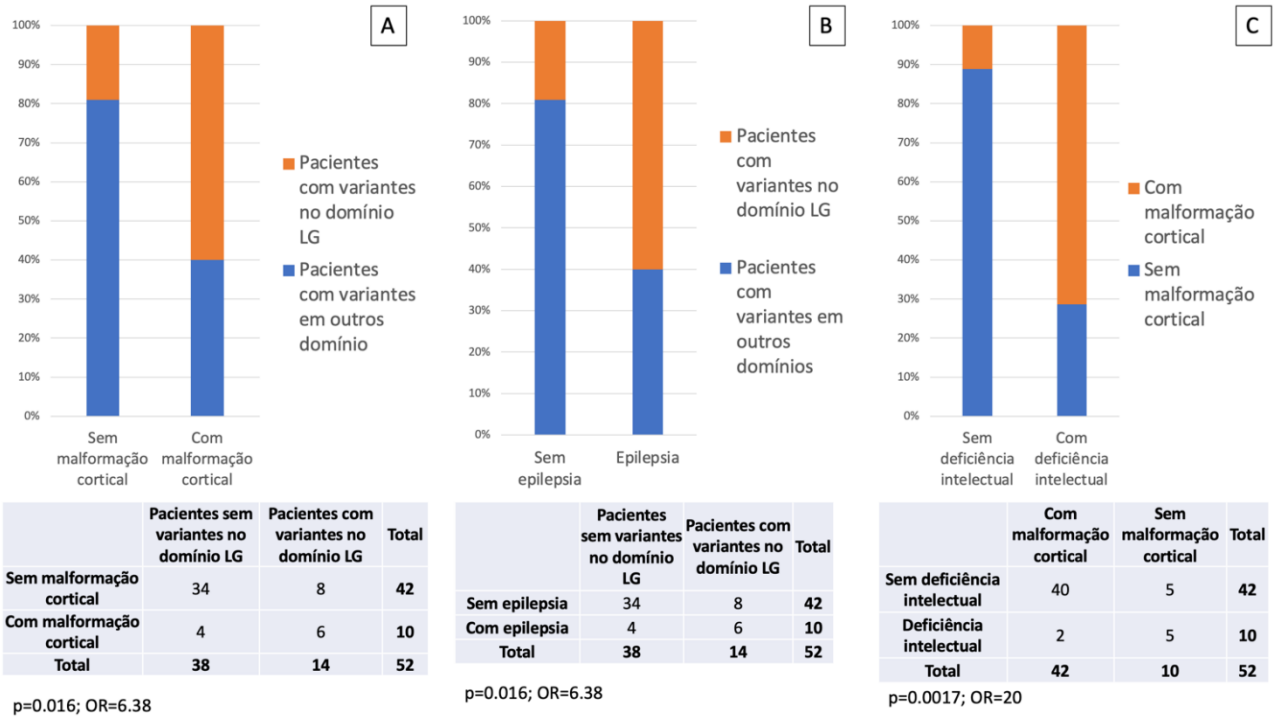
Dentre os 42 pacientes capazes de sentar, mas incapazes de andar (N = 42/52), nove (21,4%) apresentavam malformações corticais, nove (21,4%) epilepsia e cinco (11,9%) deficiência intelectual. Destes 42 pacientes, 32 (76,1%) apresentaram variantes nulas em ambos os alelos e seis (14,3%) apresentaram

uma variante nula e uma *missense*. Em quatro pacientes, foi encontrada apenas uma variante.

Dos 10/52 pacientes que apresentaram malformações corticais, nove tiveram variantes nulas em ambos os alelos. Foram observadas malformações corticais com mais frequência em pacientes com variantes que afetam o domínio LG da laminina-α2 (região que se liga a α-distroglicana e integrinas) do que outros domínios (P 0,016; OR: 6,48; Figura 27).

A presença de variantes afetando o domínio LG da laminina-α2 se relacionou com a presença de epilepsia (P = 0,016; OR:6,48; Figura 27) e com a capacidade motora máxima. Epilepsia estava presente apenas nos pacientes não ambulantes, e nove dos dez pacientes com epilepsia apresentavam malformações corticais. Foi encontrada relação entre a presença de malformações corticais e deficiência intelectual (P = 0,0017; OR:20; Figura 27). Dos oito pacientes com deficiência intelectual, dois não conseguiram sentar, cinco não conseguiram andar e apenas um adquiriu marcha independente.

Figura 27 - Envolvimento do SNC e a localização das variantes na proteína laminina-α2.



	Pacientes sem variantes no domínio LG	Pacientes com variantes no domínio LG	Total
Sem malformação cortical	34	8	**42**
Com malformação cortical	4	6	**10**
Total	**38**	**14**	**52**

p=0.016; OR=6.38

	Pacientes sem variantes no domínio LG	Pacientes com variantes no domínio LG	Total
Sem epilepsia	34	8	**42**
Com epilepsia	4	6	**10**
Total	**38**	**14**	**52**

p=0.016; OR=6.38

	Com malformação cortical	Sem malformação cortical	Total
Sem deficiência intelectual	40	5	**42**
Deficiência intelectual	2	5	**10**
Total	**42**	**10**	**52**

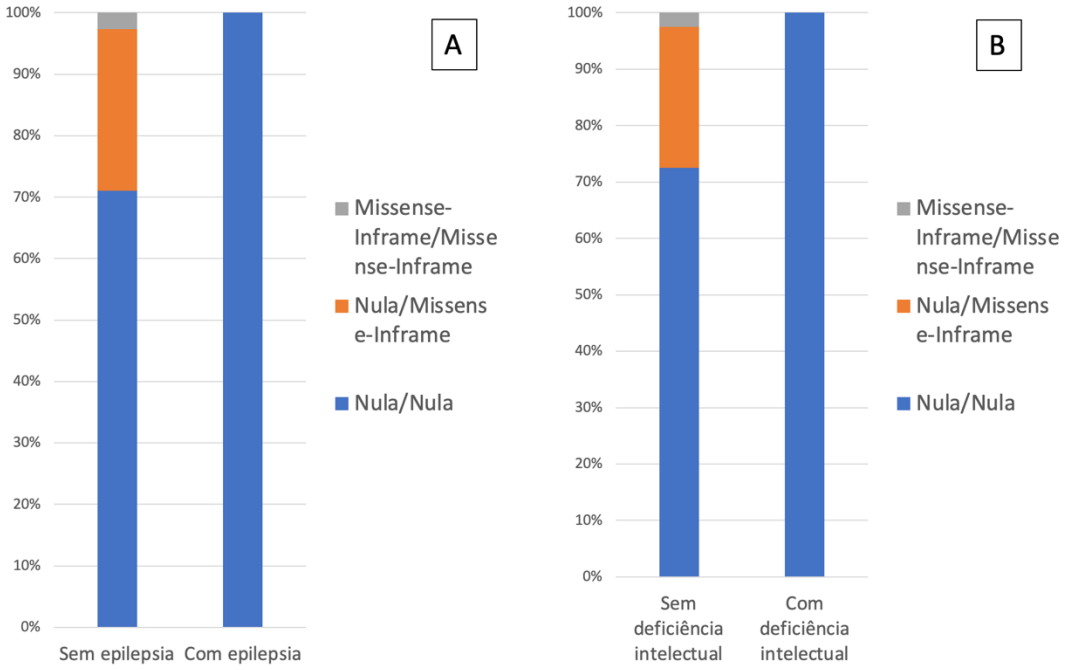
p=0.0017; OR=20

(A) Presença de variantes afetando o domínio LG e malformações corticais, (B) Presença de variantes afetando o domínio LG e epilepsia e (C) Presença de malformações corticais e deficiência intelectual
Fonte: Autoria própria

Dos oito pacientes que andavam e foram submetidos a RM de encéfalo, nenhum tinha malformações corticais ou epilepsia. No entanto, um paciente tinha deficiência intelectual com transtorno do espectro autista. Pacientes com pelo menos uma variante *missense* não apresentaram epilepsia (P = 0,0891) ou deficiência intelectual (P = 0,17; Figura 28).

Não foram incluídos nesta análise os pacientes que apresentaram apenas uma variante, pois possivelmente têm uma CNV e essa pode estar em fase ou fora de fase.

Figura 28 - Tipo de variante e envolvimento do SNC.



	Null/Null	Null/MIS	MIS/MIS	Total
No epilepsy	27	9	2	**38**
Epilepsy	10			**10**
Total	**37**	**9**	**2**	**48**

p=0.0891

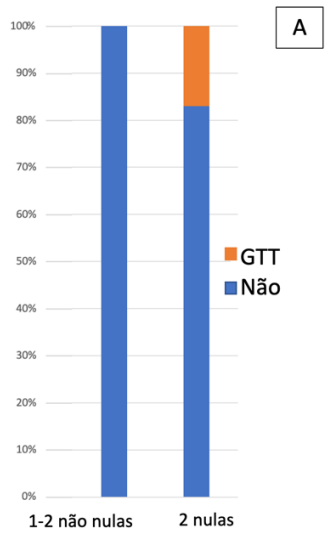
	Null/Null	Null/MIS	MIS/MIS	Total
No ID	29	10	1	**40**
ID	8			**8**
Total	**37**	**10**	**1**	**48**

p=0.17
*ID = intellectual disability

(A) ocorrência de epilepsia (B) ocorrência de deficiência intelectual
Fonte: Autoria própria

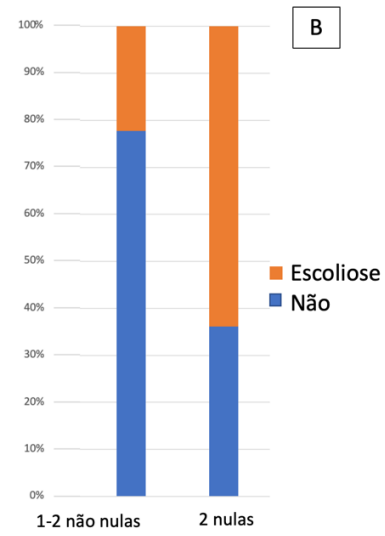
A presença de ao menos uma variante não nula também foi um preditor de fenótipo mais leve. Houve relação estatisticamente significativa entre a presença de duas variantes nulas e a presença de escoliose (p=0.0296), bem como de constipação intestinal (p=0.0244). Apesar de apenas pacientes com variantes nulas terem apresentado necessidade de alimentação via gastrostomia, não houve relação estatística entre a presença de duas variantes nulas e a necessidade dessa via de alimentação (p=0.397) (Figura 29).

Figura 29 - Presença de duas variantes nulas e gravidade clínica da DM-LAMA2



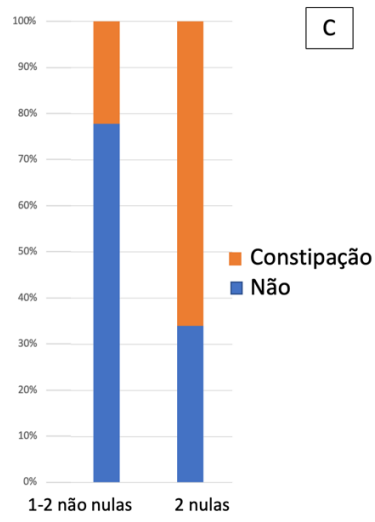
	Sem GTT	Com GTT	Total
Pelo menos 1 variante não nula	9	0	9
Duas Variantes Nulas	39	8	47
Total	54	9	56

p= 0.3294



	Sem escoliose	Com escoliose	Total
Pelo menos 1 variante não nula	7	2	9
Duas Variantes Nulas	17	30	47
Total	24	32	56

p= 0.0296



	Sem Constip	Com constip	Total
Pelo menos 1 variante não nula	7	2	9
Duas Variantes Nulas	17	30	47
Total	24	32	56

p= 0.0244

(A) necessidade de alimentação por gastrostomia, (B) presença de escoliose e (C) presença de constipação intestinal

Fonte: Autoria própria

6. Discussão

6.1 Quadro clínico e exames prévios

A DM-LAMA2 é uma doença de amplo espectro clínico de gravidade. A forma mais comum de apresentação é a forma congênita, em que o marco motor máximo é o de sentar sem apoio. No entanto, alguns pacientes manifestam a habilidade de andar, com ou sem atraso, podendo se apresentar como distrofia muscular congênita ou distrofia muscular de cinturas (Jones, Morgan et al. 2001, Gavassini, Carboni et al. 2011, Ding, Zhao et al. 2016). Nessa coorte foram encontrados tanto pacientes com a forma mais comum de apresentação, quanto pacientes capazes de adquirir a marcha, com ou sem atraso. No entanto, foram encontrados também pacientes ainda mais graves, sequer capazes de sentar sem apoio.

Houve uma diferença estatisticamente significativa entre a idade de aquisição do sustento cefálico e do sentar sem apoio entre o grupo de pacientes que deambulam e que não deambulam. Dessa forma, a avaliação e seguimento dos marcos motores mostrou-se ser um preditor possível de gravidade da doença da forma congênita, conforme também relataram outros autores (Geranmayeh, Clement et al. 2010, Zambon, Ridout et al. 2020, Tan, Ge et al. 2021).

Uma parcela relevante de pacientes apresentou baixa movimentação intraútero, mas, apesar de manifestarem hipotonia já ao nascimento, não necessitaram de suporte perinatal ventilatório ou nutricional. Isso diferencia a

DM-LAMA2 de outras miopatias congênitas, cuja apresentação neonatal pode ser grave, com necessidade inclusive de cuidados intensivos (Wesstrom, Bensch et al. 1986, Schorling, Kirschner et al. 2017, Butterfield 2019). A artrogripose é um sinal que aparece de forma variável na literatura médica e não foi um achado relevante nessa coorte (Geranmayeh, Clement et al. 2010, Sarkozy, Foley et al. 2020, Zambon, Ridout et al. 2020).

Todos os pacientes dessa coorte tiveram CK aumentada, com média de aproximadamente 2000, semelhante à encontrada na literatura médica. Isso ocorreu tanto para nas formas mais leves, quanto nas mais graves da doença (Reed 2009, Abdel Aleem, Elsaid et al. 2020, Sarkozy, Foley et al. 2020). Embora não tenha sido feito um acompanhamento da CK ao longo dos anos, foi observado que seus valores eram menores nos pacientes mais velhos. Isto provavelmente ocorre porque, com a idade, ocorre a progressão do processo distrófico, com redução da massa muscular e, portanto, da CK. (Bonnemann, Wang et al. 2014).

A maior parte dos pacientes apresentou apenas alterações miopáticas no registro da eletroneuromiografia. Apenas um, dos 26 pacientes que foram submetidos ao exame, apresentou redução da velocidade de condução nervosa. Não foi objetivo desse estudo avaliar essas alterações, mesmo porque vários exames foram realizados em diferentes instituições. Entretanto, esse achado é diferente do encontrado na literatura médica. Shorer et al e Quijano-Roy et al encontraram neuropatia desmielinizante na maioria dos pacientes com deficiência total de merosina na biópsia muscular. (Shorer, Philpot et al. 1995, Quijano-Roy, Renault et al. 2004). Apesar da alta frequência, esse achado

parece ter pouca contribuição para a fraqueza muscular dos pacientes (Sarkozy, Foley et al. 2020), diferentemente do que ocorre no modelo animal, em que parte da fraqueza decorre de uma neuropatia grave (Previtali and Zambon 2020).

6.2 DM-LAMA2 e a progressão da doença

A DM-LAMA2 é uma doença progressiva. No entanto, são poucos os estudos que tenham analisado a história natural da doença (Geranmayeh, Clement et al. 2010, Zambon, Ridout et al. 2020, Tan, Ge et al. 2021). Ainda mais raros são os estudos prospectivos de história natural (Meilleur, Jain et al. 2015, Jain, Meilleur et al. 2019). Uma vez que cada vez mais pesquisas e mais ensaios de intervenção estão em fase de planejamento (Perrin, Rousseau et al. 2017, Yurchenco and McKee 2019, Zambon and Muntoni 2021), é de suma importância se obter avaliações e dados de história natural dessa população para o planejamento de testes terapêuticos.

6.2.1 Função respiratória

Nessa coorte, observou-se diferença na velocidade de progressão da doença entre os pacientes que nunca deambularam e aqueles que adquiriram a marcha, tendo os primeiros progressões mais graves. Os pacientes com DM-LAMA2 não deambulantes apresentaram queda de 1.85% da CVF/ano, contra 0.98%/ ano dentre os deambulantes. Em um estudo retrospectivo, Zambon et al encontraram piora de 2.9%/ano dentre os pacientes não deambulantes. Esse estudo não avaliou a queda da função respiratória dentre os pacientes deambulantes (Zambon, Ridout et al. 2020). Não há outros estudos prospectivos

publicados, até o momento, que mostrem a evolução da piora da CVF ao longo do tempo.

Assim como foi referido em outros estudos, a maioria dos pacientes não necessita de suporte ventilatório no primeiro ano de vida ou de traqueostomia (Geranmayeh, Clement et al. 2010, Zambon, Ridout et al. 2020). Apenas um paciente dessa coorte necessitou de traqueostomia devido a falhas de extubação após uma pneumonia.

A média da idade para se iniciar o uso de ventilação noturna não invasiva (VNI) foi de 10.2 anos, semelhante ao encontrado por Zambon et al, 2020 de 11.7 anos. Em nossa coorte, após os 15 anos de idade, todos os pacientes com DM-LAMA2 não deambulantes fizeram uso de ventilação noturna não invasiva (VNI). Já dentre os pacientes deambulantes, fizeram uso de VNI apenas aqueles com mais de 20 anos de idade.

O envolvimento respiratório na DM-LAMA2 é causado pela fraqueza progressiva dos músculos intercostais e acessórios. O tórax torna-se rígido e a complacência da parede torácica diminui, contribuindo ainda mais para a hipoventilação alveolar e atelectasias (Reed 2009, Geranmayeh, Clement et al. 2010). Além disso, devido a tosse fraca, ocorre eliminação insuficiente de secreções, o que leva a infecções pulmonares recorrentes. Essa é a principal causa de morte dentre os pacientes com DM-LAMA2.

Apesar da aparente preservação do músculo diafragmático, em ressonância magnética dinâmica, os pacientes com DM-LAMA2 demonstraram expansão reduzida da parede torácica (Sarkozy, Foley et al. 2020), o que também pode contribuir para o distúrbio ventilatório restritivo.

6.2.2 – Função motora

Os pacientes com DM-LAMA2 não deambulantes apresentaram piora na função motora, de acordo com a idade. O domínio D1 da escala MFM, que avalia funções de pé e transferências, não foi uma boa ferramenta de avaliação – já que esse grupo de pacientes nunca adquiriu a marcha. Já os domínios D2, D3 e o total da MFM evidenciaram uma redução estatisticamente significativa de função motora de acordo com a idade. Houve uma queda de 3.02% da força/ano na avaliação da força proximal e axial, mais acentuada do que a queda de 1.93% da força/ano na avaliação da força distal. Jain et al, 2019, avaliou longitudinalmente a piora da força muscular dos pacientes com DM-LAMA2, observando que os não deambulantes apresentaram piora de -2,6% força/ano no domínio D2 e de -2.16% força/ano no total da MFM32 (Jain, Meilleur et al. 2019). Assim como nessa coorte, Le Goff et al, 2021 mostraram que o domínio D2 foi o mais sensível à mudança para os não-ambulantes e que o domínio D1 não caracteriza bem a progressão da doença nesse grupo de pacientes (Le Goff, Meilleur et al. 2021).

Esse foi o primeiro estudo a usar a escala RULM como ferramenta de avaliação da piora progressiva da força dos membros superiores, porém a diferença de acordo com a idade não foi estaticamente significativa, o que pode indicar que a escala MFM ainda pode ser a melhor opção para o seguimento dos pacientes (Jain, Meilleur et al. 2019, Le Goff, Meilleur et al. 2021).

Nessa coorte, as escalas motoras não foram suficientemente sensíveis para avaliar a progressão da doença dentre os pacientes deambulantes. Tal

achado diferiu do que Le Goff et al, 2021 relataram, de que o domínio D1 da MFM foi sensível à piora da força nesse grupo de pacientes (Le Goff, Meilleur et al. 2021).

Uma vez que as escalas de força não parecem tão sensíveis para medir a progressão de doença dentre os pacientes capazes de deambular, a imagem de músculo (ultrassonografia ou ressonância magnética) pode ser uma ferramenta capaz de auxiliar como marcador de progressão (Sarkozy, Foley et al. 2020, Tan, Ge et al. 2021, Quijano-Roy, Haberlova et al. 2022).

Quijano-Roy et al mostraram que através da ressonância magnética, os músculos da coxa parecem ser os melhores para avaliar a progressão da doença, tanto em pacientes deambulantes quanto não desambulantes. O grau de substituição foi predominantemente correlacionado com a duração da doença, e não com o início ou a gravidade clínica. Dentre os pacientes deambulantes foi encontrado padrão de sinal de sanduíche, como ocorre no COL6, mostrando que esse sinal não é patognomônico (Quijano-Roy, Haberlova et al. 2022).

6.2.3 – Goniometria

A função motora dos membros superiores dos pacientes com DM-LAMA2 é determinada não apenas pela fraqueza, mas também por contraturas articulares proeminentes e progressivas (Bonnemann, Wang et al. 2014, Bendixen, Butrum et al. 2017).

Dado que a maioria dos pacientes com DM-LAMA2 não é capaz de deambular, é essencial que se avalie os membros superiores como forma entender a história natural da progressão da doença.

Diferentemente do que ocorreu com as escalas de força, foi possível observar progressão estatisticamente significativa das retrações articulares tanto no grupo de pacientes incapazes de deambular, quanto no grupo que adquiriu marcha. Entre os pacientes não deambulantes, houve piora de 3,22 graus/ano no cotovelo e de 1,92 graus/ano no joelho. Zambon et al, 2020, em sua análise retrospectiva, observaram piora de 6.6 graus/ano no cotovelo e de 3.1 graus/ano do joelho entre os não deambulantes (Zambon, Ridout et al. 2020). Jain et al, 2019 mostraram piora progressiva de 4.11 graus/ ano no cotovelo, porém a mudança na piora do joelho não foi estatisticamente significativa, também entre os não deambulantes (Jain, Meilleur et al. 2019).

A medida da goniometria foi sensível para medir a progressão da doença dentre os pacientes deambulantes e isso nunca foi previamente reportado. Houve piora de 1,41 graus/ano no cotovelo e de 1,95 graus/ano no joelho.

Foi optado por fazer medidas do cotovelo e do joelho já que em 2018 Bendixen et al mostraram que apenas essas medidas eram sensíveis, reprodutíveis e tinham pouca alteração interobservador entre pacientes com DMC-LAMA2 e DMC-COL6 (Bendixen, Butrum et al. 2017).

A diferença de progressão das retrações nesse estudo e nos outros publicados talvez se justifique pela prática de prescrição de órteses de membros superiores e inferiores para os pacientes seguidos nessa coorte.

6.2.4 - Escoliose

Os pacientes com DM-LAMA2 apresentaram escoliose progressiva. Dentre os pacientes não deambulantes esse achado foi ainda mais relevante. A idade média de início foi de 6.1 anos de idade e a idade média de necessidade de correção cirúrgica de 9 anos de idade, dado semelhante aos encontrado em estudo retrospectivo de história natural (Zambon, Ridout et al. 2020). Alguns pacientes não evoluiram com escoliose, porém apresentam outras deformidades de coluna como hiperlordose e espinha rígida (Smeets, Verbrugge et al. 2021).

A piora progressiva da escoliose representa piora da qualidade de vida dos pacientes, que passam a sentir dor, ter piora da função respiratória e, algumas vezes, da funcionalidade motora (Sarkozy, Foley et al. 2020).

6.2.5 - Óbitos

Ao longo do seguimento, quatro pacientes desse estudo, todos do grupo não deambulante, faleceram devido a pneumonia. A idade do óbito variou de 3 a 11 anos de idade. Esse grupo de pacientes também havia mostrado maior risco de internação por infecções pulmonares. Os estudos sobre a expectativa de vida desses pacientes não são claros, mas relatam risco de morte precoce, especialmente por problemas respiratórios (Reed 2009, Geranmayeh, Clement et al. 2010, Sarkozy, Foley et al. 2020, Zambon, Ridout et al. 2020, Tan, Ge et al. 2021)

6.3 DM-LAMA2 e alterações no SNC

Foi possível demonstrar que o envolvimento do SNC ocorre com frequência entre os pacientes com DM-LAMA2.

O envolvimento cerebral relacionou-se com a gravidade motora. Os pacientes que apresentavam malformações cerebrais e epilepsia eram exclusivamente do grupo não ambulante. O envolvimento cerebral também teve relação com o tipo e a localização da variante. Os pacientes com malformações corticais apresentaram mais frequentemente duas variantes nulas e variantes que afetam o domínio LG da laminina- α2.

Os pacientes deambulantes não apresentavam malformações corticais ou epilepsia, e apenas um deles manifestou deficiência intelectual associada a transtorno do espectro autista. Pacientes com epilepsia ou deficiência intelectual não apresentaram variantes *missense* ou *inframe.*

Em grandes coortes não foram feitas relações entre a malformação cortical e o fenótipo motor ou o genótipo. Genramayeh et al, 2010 descreveram 13 de 34 pacientes que cuja RNM do encéfalo apresentou alterações no SNC. Apenas polimicrogiria foi encontrada e não foi feita relação fenótipo-genótipo. Não houve referência à presença ou ausência de deficiência intelectual (Geranmayeh, Clement et al. 2010). Tan et al, 2021 descreveram paquigiria occipital em 10 de 114 pacientes submetidos a RNM de encéfalo e hipoplasia pontina em 8, mas não houve relação com epilepsia. Foram relatados pacientes mais velhos com fenótipo de cinturas que apresentaram epilepsia, porém não foi analisada a relação fenótipo-genótipo. Interessantemente, um paciente faleceu de status epiléptico (Tan, Ge et al. 2021). Zambon et al, 2020 apesar de terem descrito

uma coorte de 46 pacientes não referiu RNM de encéfalo ou deficiência intelectual entre os pacientes (Zambon, Ridout et al. 2020).

Em nosso estudo, a maioria das malformações corticais estavam no lobo occipital, mas também encontramos alterações nos lobos frontal e temporal. De acordo com a literatura, em pacientes com DM-LAMA2, alterações moderadas ou sutis na anatomia do SNC, especialmente no lobo occipital, são os achados mais comuns (Salvati, Bonaventura et al. 2021), mas anormalidades estruturais grosseiras também podem ocorrer (Jayakody, Zarei et al. 2020). Ainda não está claro por que as malformações são mais comumente encontradas nas regiões occípito-temporais e acredita-se que as malformações, por não serem facilmente observáveis, possam ser mais extensas do que se acredita. Jayakody et al, por exemplo, encontraram, em exame post-mortem, malformação do tipo *cobblestone* simétrica e disseminada, além de displasia cerebelar no cérebro de um paciente com DM-LAMA2, cuja ressonância magnética havia mostrado apenas anormalidades sutis (Jayakody, Zarei et al. 2020).

Pacientes com malformação cortical apresentaram, com maior frequência, variantes no gene *LAMA2* que afetam o domínio LG da proteína (exons 45-65). Esse achado pode ser explicado pelo fato de a laminina-α2 se ligar com alta afinidade ao complexo distrofina-alfadistroglicanas e às integrinas através do domínio LG (Yoshida-Moriguchi and Campbell 2015). Essa conexão parece influenciar a adesão neuronal, diferenciação, crescimento, forma e migração (Yoshida-Moriguchi and Campbell 2015). Além disso, como a laminina-211 é frequentemente expressa em músculo, células de Schwann, glia limitante, microvasos intracerebrais e leptomeninges (Menezes, McClenahan et al. 2014),

a disfunção da laminina-α2 pode originar anormalidades cerebrais, incluindo defeitos de migração neuronal que podem resultar em malformação cortical grosseira, como acontece nas α-distroglicanopatias (Devisme, 2012). Isso sugere que DM-LAMA2 e α-distroglicanopatias podem compartilhar mecanismos celulares subjacentes à patologia do SNC (Arreguin and Colognato 2020).

Neste estudo foi encontrada uma relação entre a localização das variantes que afetam o domínio LG da laminina-α2 com malformação cortical e epilepsia. Dez pacientes manifestaram crises focais ou parciais complexas, e 9 deles apresentaram malformações corticais. A epilepsia foi diagnosticada em uma idade média de 8,1 anos (variação de 6 a 13 anos), a mesma idade mediana encontrada por Benito e colegas para o início das convulsões (Natera-de Benito, Muchart et al. 2020). Em sua coorte de 25 pacientes, todos os 9 que apresentaram epilepsia tinham polimicrogiria (Natera-de Benito, Muchart et al. 2020), dado semelhante ao nosso estudo em que apenas um paciente com epilepsia não apresentou malformação cortical na RNM cerebral. Todos os pacientes em nossa coorte tiveram crises de início focal perceptivas ou disperceptivas, que pode ser um tipo de crise mais difícil de ser identificado pela família. Os nove pacientes com epilepsia descritos neste estudo obtiveram controle das crises usando monoterapia antiepiléptica, e apenas um, que tinha a malformação cortical mais extensa, necessitou de terapia antiepiléptica múltipla. Convulsões em pacientes com DM-LAMA2 geralmente respondem facilmente a medicamentos antiepilépticos (Salvati, Bonaventura et al. 2021)

Pacientes com DM-LAMA2 foram inicialmente caracterizados com inteligência normal ou subnormal (Darin and Tulinius 2000, Gavassini, Carboni

et al. 2011, Bonnemann, Wang et al. 2014). Curiosamente, nossa coorte mostrou que a frequência de deficiência intelectual entre esses pacientes não é irrelevante. Deficiência intelectual profunda, no entanto, foi encontrada apenas entre os pacientes incapazes de sentar-se. Como esperado, encontramos uma relação entre malformação cortical e deficiência intelectual. Publicações anteriores mostraram que em pacientes com DM-LAMA2, assim como com distroglicanopatias, malformações cerebrais estão aparentemente associadas a disfunções intelectuais e de linguagem e déficits motores mais graves (Mercuri, Gruter-Andrew et al. 1999, Brun, Mockler et al. 2017). Esses achados influenciam o cuidado a esses pacientes, considerando que o quadro clínico e a neuroimagem não são tão homogêneos.

A hipointensidade característica da substância branca cerebral na RM T1-WI e o hipersinal T2-WI na substância branca periventricular e subcortical são rotineiramente observados em pacientes com DM-LAMA2 com mais de 6 meses de idade (Leite, Lucato et al. 2005) e estavam presentes em todos os pacientes desta coorte. A patogênese subjacente das alterações da substância branca ainda não é clara. Uma hipótese é que a substância branca contenha aumento do teor de água devido à disfunção da barreira hematoencefálica causada pela deficiência de laminina-α2 (Arreguin and Colognato 2020). Outra hipótese é que as alterações na substância branca indiquem alterações estruturais de da mielina, devido as interações entre laminina-α2 e integrinas nos oligodendrócitos em desenvolvimento (Relucio, Menezes et al. 2012). Nesta coorte, a intensidade do acometimento da substância branca esteve relacionada à função motora, com alterações mais difusas nos pacientes não deambulantes e predomínio de lesões focais nos deambulantes.

6.4 DM-LAMA2 e alterações histológicas

Conforme já demonstrado na literatura, houve uma relação entre a presença parcial de merosina na análise imuno-histoquímica da biopsia muscular e o fenótipo mais leve que adquire a marcha (Tan, Topaloglu et al. 1997, Reed 2009). No entanto, existem exceções a essa relação do fenótipo com a imuno-histoquímica. Variabilidade intrafamiliar já foi relatada, sugerindo que existam modificadores de doença que desempenham um papel na definição de fenótipos e gravidade (Prandini, Berardinelli et al. 2004, Di Blasi, Bellafiore et al. 2011). No presente estudo, apenas dois pacientes com ausência completa de merosina adquiriram a marcha, porém com atraso importante. Esses pacientes ficaram restritos à cadeira de rodas com oito anos de idade, e foram os únicos da coorte que perderam a marcha. Uma revisão de 33 pacientes com DM-LAMA2 documentou a deambulação independente de dois pacientes com deficiência completa de merosina, aos 3,6 e 4 anos de idade, respectivamente (Geranmayeh, Clement et al. 2010). Em uma outra revisão da coorte de pacientes com DM-LAMA2 atendidos no Dubowitz Neuromuscular Center foram identificados 6/42 (14%) pacientes que tinham ausência completa de merosina na biópsia muscular e que eram ambulantes por tempo variável e com suporte variável (Sarkozy, Foley et al. 2020). Ocorrências semelhantes emergem de outras coortes publicadas, indicando que a deambulação durante a infância (principalmente com apoio e apenas por períodos limitados) é possível em até cerca de 10% dos pacientes DM-LAMA2 com deficiência completa de merosina (Jones, Morgan et al. 2001).

O paciente mais velho da coorte (p59, 37 anos), com fenótipo de distrofia muscular de cinturas, apresentou na biópsia muscular padrão miopático com características distróficas e presença de vacúolos intracitoplasmáticos, associado a leve redução da imunomarcação da merosina. Tal achado, também referido por Di Blasi et al, 2000 e Cho et al, 2021 chama a atenção para incluir o a DM-LAMA2 no diagnóstico diferencial das miopatias vacuolares (Di Blasi, Mora et al. 2000, Cho, Kim et al. 2021).

6.5 Genótipo

Foram descritas 21 variantes novas. As variantes de ponto nulas estavam distribuídas ao longo do gene, sem um *hotspot* claro. As novas variantes foram classificadas de acordo com o Colégio Americano de Medicina Genética e Genômica e, apesar de não ter sido possível realizar estudos funcionais, todos os pacientes apresentavam quadro clínico sugestivo e vários biópsia muscular com alteração na imunomarcação da merosina. As variantes do tipo *missense* mostraram distribuição diferente e ficaram mais agrupadas no domínio LN. Possivelmente variantes *missense* localizadas nesta região teriam um efeito prejudicial na função da laminina-211 através da interrupção do enovelamento da proteína e perda da capacidade de polimerização da laminina-211 (Durbeej 2015, Oliveira, Gruber et al. 2018, Yurchenco, McKee et al. 2018).

Embora variantes sem sentido sejam as mutações nulas mais comuns em DM-LAMA2, (Reed 2009, Geranmayeh, Clement et al. 2010, Xiong, Tan et al. 2015, Oliveira, Gruber et al. 2018), nessa coorte a variante mais comum foi uma nova variante fora de fase (c.1255del - p.Ile419Leufs*4) encontrada em 16 alelos

de 14 pacientes. Esta variante esteve presente em pacientes capazes de sentar, mas incapazes de andar e sem envolvimento do SNC. Embora a análise de haplótipos não tenha sido realizada, especulamos que a variante c.1255del poderia ser fundadora na população brasileira.

Assim como foi observado em várias das grandes coortes sobre variantes no gene *LAMA2,* houve uma dificuldade na classificação das variantes *missense* (Oliveira, Gruber et al. 2018, Tan, Ge et al. 2021). Foram identificadas oito variantes *missense* diferentes. A variante c.2461A>C (p.Thr821Pro) foi identificada em cinco pacientes, todos deambulantes. Essa variante já foi descrita previamente em pacientes portugueses, em trans, com forma mais leve de apresentação de DM-LAMA2 e, portanto, foi classificada como patogênica (Oliveira, Gruber et al. 2018). A variante c. 3235T>C foi encontrada em três pacientes, sendo um deambulante. Nela, a mudança de sequência substitui a cisteína por arginina no códon 1079 da proteína LAMA2 (p.Cys1079Arg). O resíduo de cisteína é altamente conservado e há uma grande diferença físico-química entre cisteína e arginina. O paciente p11 foi submetido a biópsia muscular e apresentou características distróficas com marcação parcial para merosina na imuno-histoquímica. Quatro das outras seis variantes *missense* nunca descritas referiam-se a pacientes que apresentavam biópsia muscular distrófica com alteração na imunomarcação para merosina eduas missense não tiveram outras formas de comprovação a não ser ferramentas de bioinformáticas. As seis foram classificadas como variantes de significado incerto.

Duas variantes em sítio de *splicing* foram encontradas, ambas afetando sítios canônicos. Não foi possível avaliar seu impacto no nível de mRNA. Assim,

o impacto dessas variantes foi analisado com ferramentas de bioinformática, que para ambas indicou efeito deletério.

Foram detectadas sete CNVs, três nunca descritas (deleção éxon 1, deleção éxon 15 e deleção do éxon 21). As três foram encontradas em pacientes que nunca adquiriram a marcha. Observou-se um hotspot para as outras CNVs, sendo comuns a deleção do éxon 56, que é em fase, bastante descrita em pacientes da população portuguesa com fenótipo de distrofia muscular de cinturas e a deleção dos éxons 3-4, que é fora de fase, comumente descrita na população chinesa em pacientes que não adquirem a marcha (Oliveira, Goncalves et al. 2014, Ge, Liu et al. 2018). Dessa forma, é possível perceber que nem todas as deleções de éxons, mesmo extensas, são variantes que levam a completa perda de função da proteína, o que dificulta a compreensão da correlação feno-genotípica no caso de CNVs.

6.6 Relação genótipo-fenótipo

Neste estudo, assim como na literatura, foi confirmado que existe uma correlação feno-genotípica. Pacientes capazes de andar apresentaram com maior frequência ao menos uma variante não nula (tipo *missense* e *inframe*) e, entre pacientes com apresentação de distrofia de cinturas dos membros foi possível encontrar, com maior frequência, duas variantes não nulas. (Geranmayeh, Clement et al. 2010, Yurchenco, McKee et al. 2018, Sarkozy, Foley et al. 2020). Apenas dois pacientes com duas variantes nulas adquiriram marcha independente, porém com muito atraso, e ambos ficaram restritos a

cadeira de rodas aos oito anos de idade (Jones, Morgan et al. 2001, Geranmayeh, Clement et al. 2010, Sarkozy, Foley et al. 2020).

Todos os pacientes com malformação cortical apresentaram variantes nulas em ambos os alelos e pacientes com epilepsia ou deficiência intelectual não apresentaram variantes *missense* ou i*nframe.* Como já mencionado no item 6.2, a presença de variantes no domínio LG se relacionou a malformação do SNC.

A presença de ao menos uma variante não nula também foi um preditor de fenótipo mais leve. Houve relação estatisticamente significativa entre a presença de duas variantes nulas e a presença de escoliose e de constipação intestinal, dado que foi também relatado por Geranmayeh et al (Geranmayeh, Clement et al. 2010)

Apesar de haver uma relação entre a presença de variantes nulas, ausência de proteína funcional e gravidade clínica, essa não parece ser a única explicação para a variabilidade fenotípica. Di Blasi, et al descreveu uma família com DM-LAMA2 em pacientes com a mesma variante, porém com fenótipo diferente, indicando que pode haver outros genes que influenciam a gravidade clínica (Di Blasi, Bellafiore et al. 2011). Em nossa coorte, 14 pacientes mostraram a mesma variante, três em homozigose. Todos os pacientes apresentaram a forma clássica da doença, alcançando marco motor máximo de sentar sem apoio. A exceção foi o paciente p6, que adquiriu a marcha e depois voltou a perdê-la.

6.7 DM-LAMA2 e hipoglicemia

Ao longo do seguimento do estudo, muitos pacientes com DM-LAMA2 apresentaram hipoglicemia e, durante o ano de 2022, foi feita uma pesquisa ativa com 48 pacientes que compareceram ao ambulatório. A presença de hipoglicemia no período neonatal não foi considerada. Para a análise, os pacientes foram divididos em dois grupos: um grupo hipoglicêmico composto por pacientes que apresentaram pelo menos um episódio de hipoglicemia (glicemia <60mg/dL) e um grupo não hipoglicêmico composto por indivíduos sem histórico de hipoglicemia.

Quinze pacientes (15/48 - 31,2%) apresentaram pelo menos um episódio de hipoglicemia sintomática e 8/48 (16,6%) tiveram dois ou mais episódios. Todos os pacientes que apresentaram hipoglicemia foram não deambulantes. Os pacientes apresentaram o primeiro episódio entre dois e 14 anos, com mediana de idade de seis (DP = 5,2), e o paciente mais velho que continuou apresentando hipoglicemia foi tinha 20 anos de idade. Onze pacientes (11/48 - 73,3%) tiveram hipoglicemia matinal (após ficar sem comer no período do sono noturno) e 10/48 (66,6%) relacionada a infecções. Durante os episódios, todos os pacientes referiram sonolência como principal sintoma. Quatro (4/48 - 26%) também apresentaram vômitos e um apresentou múltiplos episódios de convulsão sintomática aguda.

Foi observada associação entre aquisição de marcha, uso de ventilador e de dispositivos de suporte à alimentação e função de deglutição nos grupos hipoglicêmicos versus não hipoglicêmicos. Nenhum paciente do grupo hipoglicêmico conseguiu deambular (P = 0,006). Os pacientes do grupo hipoglicêmico necessitaram de ventilação não invasiva (P=0,012) e dispositivos

de suporte à alimentação (P=0,002) com maior frequência; Três pacientes foram submetidos à gastrostomia devido à recorrência da hipoglicemia (mais de 10 episódios), o que resultou no controle da hipoglicemia.

Dezesseis pacientes (16/48 - 33%) apresentaram extremo baixo peso (abaixo do terceiro percentil) e, entre eles, sete estavam no grupo hipoglicêmico. Não foi observada significância estatística entre a presença de hipoglicemia e baixo peso extremo. No entanto, uma diferença estatisticamente relevante foi observada na comparação de baixo peso extremo e a recorrência de episódios hipoglicêmicos, ou seja, a presença de mais de dois episódios (P = 0,04, OR = 5,7).

A presença de pelo menos uma variante *missense* pareceu estar associada a um menor risco de hipoglicemia (P = 0,07). Quatorze dos 15 pacientes com hipoglicemia tinham duas variantes de perda de função e apenas um paciente com hipoglicemia tinha uma variante LOF e uma variante *missense* no outro alelo.

Não foi observada associação entre hipoglicemia e ocorrência de doença do refluxo gastroesofágico, constipação intestinal, deficiência intelectual, epilepsia ou escoliose.

Os resultados desta análise indicaram que o risco de hipoglicemia não está relacionado a um fator isolado como o peso, como Hayes et al. haviam sugerido anteriormente (Hayes, Yun et al. 2020). Os pacientes que tiveram hipoglicemia apresentaram um fenótipo mais grave eram incapazes de andar sem apoio e tinham maior necessidade de suporte ventilatório noturno e dispositivos de suporte à alimentação.

Os pacientes com hipoglicemia necessitaram de sondas de gastrostomia com maior frequência, mas alguns receberam a indicação do dispositivo de suporte à alimentação devido à recorrência da hipoglicemia, o que pode ter enviesado a análise.

Curiosamente, não foi observada relação entre hipoglicemia e distúrbios gastrointestinais (isto é, constipação e doença do refluxo gastroesofágico) que ocorrem frequentemente em pacientes com distrofia muscular congênita e que podem interferir na ingestão alimentar e no apetite.

Já foi descrito que crianças com doenças neuromusculares e atrofia muscular têm maior risco de hipoglicemia. Acredita-se que isso ocorra porque, uma vez esgotadas as reservas de glicogênio no fígado, o tecido muscular torna-se o principal substrato para a gliconeogênese. Uma vez que a massa muscular é insuficiente, assim como acontece nas distrofias musculares congênitas, pode ocorrer hipoglicemia, o que pode ser especialmente preocupante em momentos de grande necessidade de energia, como no combate a infecções ou durante longos períodos de jejum (Sunehag, Treuth et al. 2001, Hayes, Yun et al. 2020). Embora não pudemos observar significância estatística entre a presença de hipoglicemia e extremo baixo peso, esse último se mostrou um fator de risco aumentado para a recorrência de eventos hipoglicêmicos. Assim, peso e massa muscular, aparentemente, não foram os únicos responsáveis pelos eventos, mas certamente fazem parte do cenário de fatores de risco. Uma análise experimental em modelo animal propôs que existe uma predisposição genética para hipoglicemia e alterações metabólicas em pacientes com DM-LAMA2. Fontes-Oliveira et al encontraram expressão desregulada nos genes *pfk, pygm, igh3* e

ant1 em camundongos com mutação no gene *lama2* (Fontes-Oliveira, Steinz et al. 2017). Esses genes estão relacionados à glicólise, ao ciclo do ácido tricarboxílico e ao transporte respiratório de elétrons e fosforilação oxidativa, o que sugere que a função metabólica pode estar alterada em pacientes com DMC-LAMA2 (Koopman, Ly et al. 2014, Fontes-Oliveira, Steinz et al. 2017).

A associação entre a regulação de outros genes com o nível de expressão da proteína laminina-α2 pode estar ligada ao fato de que pacientes com pelo menos uma variante não nula apresentaram menor risco de hipoglicemia. Quatorze dos 15 pacientes com hipoglicemia tinham duas variantes com perda de função e apenas um paciente com hipoglicemia tinha uma variante com perda de função e uma variante *missense* de significado incerto (c.5651G>A), que não foi publicada anteriormente. Uma análise proteômica do músculo esquelético do modelo de camundongo dy3K/dy3K com deficiência de lama2 descobriu que uma grande porção de proteínas estão expressas de forma diferente e estão envolvidas em vários processos metabólicos (Fontes-Oliveira, Steinz et al. 2017). Além disso, aparentemente, pacientes com DM-LAMA2 apresentam um desequilíbrio bioenergético, com função mitocondrial prejudicada que leva a apoptose e proteólise e que também pode causar comprometimento do metabolismo da glicose (Katsetos, Koutzaki et al. 2013).

Os episódios de hipoglicemia podem ser uma manifestação relevante que reduz a qualidade de vida dos pacientes com DM-LAMA2 e aumenta a necessidade de hospitalização, podendo ser graves o suficiente para diminuir o nível de consciência e/ou causar crises sintomáticas, conforme foi observado neste estudo. O paciente que apresentou convulsões sintomáticas também

apresentou níveis muito baixos de glicemia, e as convulsões foram controladas somente após a colocação da sonda de gastrostomia. É interessante notar que dois pacientes adicionais só conseguiram o controle dos episódios de hipoglicemia após a colocação da sonda de gastrostomia, apesar de não apresentarem queixa objetiva de disfagia.

Em conclusão, pacientes com DM-LAMA2 correm risco de hipoglicemia. O risco é mais relevante em pacientes com fenótipo grave e pacientes com variantes do tipo LOF. Entre os pacientes com peso extremamente baixo, o risco de episódios recorrentes de hipoglicemia é maior. Dessa forma, a glicemia deve ser medida ativamente em pacientes em jejum ou com infecções, e os profissionais de saúde devem estar preparados para identificar e tratar esses pacientes.

7. Conclusões

Neste estudo foi possível demonstrar que:

1. A DM-LAMA2 é uma doença com um amplo espectro clínico de gravidade, e os pacientes apresentam alterações sistêmicas além da fraqueza muscular.

2. A presença de malformação cortical, epilepsia, deficiência intelectual são achados relevantes nessa população

3. Há uma relação entre o fenótipo mais grave e o envolvimento do SNC. Pacientes que não deambulam apresentam, mais frequentemente, malformação cortical, epilepsia e deficiência intelectual.

4. Há uma relação entre o tipo de variante e os achados fenotípicos. Os pacientes com quadro motor e sistêmico mais leve, mais frequentemente apresentam variantes não nulas como *missense* e *inframe,* enquanto os pacientes que apresentam duas variantes nulas são mais graves do ponto de vista motor e sistêmico.

5. Também há uma relação entre a posição da variante e os achados de SNC. Os pacientes com variantes que afetam o domínio LG mais frequentemente apresentam malformação cortical.

6. Embora a DM-LAMA2 seja uma doença progressiva, a velocidade de piora da fraqueza muscular, retrações tendíneas e função respiratória varia entre os pacientes deambulantes e não deambulantes.

8. Anexos

Anexo A – Aprovação do Projeto

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP .

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo clínico, histológico e molecular de pacientes com distrofia muscular congênita por deficiência de merosina

Pesquisador: Edmar Zanoteli

Área Temática:
Versão: 1
CAAE: 87782318.2.0000.0068
Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Numero do Parecer:´ 2.670.749 **Apresentação do Projeto:**

O projeto "Estudo clínico, histológico e molecular de pacientes com distrofia muscular congênita por deficiência de merosina" é um estudo clínico observacional retrospectivo e prospectivo para avaliar os aspectos clínicos, as funções motoras e a análise molecular do gene da merosina dos pacientes com distrofia muscular por deficiência de merosina.

Objetivo da Pesquisa: Objetivo primário: Estudo clínico, histológico e molecular de pacientes com distrofia muscular por deficiência de merosina.Objetivos secundários: Sequenciar o gene LAMA2 em pacientes com diagnóstico clínico e/ou histológico de distrofia muscular sistêmica, para determinar a frequência de mutações na nossa população. Descrever o fenótipo clínico e histológico dos pacientes com mutações no LAMA2. Correlacionar a presença das mutações com o quadro clínico e histológico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Riscos: Os riscos estão relacionados a punção venosa para coleta de sangue e extração de DNA. Pode haver desconforto na coleta, e a pele pode ficar com uma pequena mancha roxa.
Benefícios: Conhecimento mais detalhado dos aspectos clínicos e moleculares dos pacientes com deficiência de merosina, auxiliando no diagnóstico precoce da doença.

Comentários e Consideraçoes sobre a Pesquisa:˜ Esta pesquisa tem como desfecho primário determinar o perfil clínico dos pacientes com distrofia

muscular sistêmica por deficiência de merosina e correlacionar o fenótipo e o genótipo da doença.O projeto está bem descrito.

Consideraçoes sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE e o Assentimento para pacientes entre 8 e 18 anos explica a importância do estudo, reforçam que a biopsia muscular não será repetida. Os pacientes serão submetidos apenas a coleta de sangue para análise laboratorial.O projeto será submetido a FAPESP após aprovacão pelo CEP, entretanto, o pesquisador principal declara (carta de anuência) que se não houver apoio da FAPESP, o projeto será custeado com recursos próprios do setor de miopatias do Departamento de Neurologia do HC_FMUSP.

Recomendaçoes:

O projeto deverá iniciar apenas após a aprovacão pelo CEP.

Conclusoes ou Pendências e Lista de Inadequaçoes:

As descritas acima.

Consideraçoes Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS no 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c)apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1078351.pdf	16/04/2018 17:34:41		Aceito
Outros	Carta_anuencia.pdf	16/04/2018 17:34:04	Edmar Zanoteli	Aceito
Outros	EntrevistaquestionariomodeloPB.docx	16/04/2018 17:33:02	Edmar Zanoteli	Aceito
Outros	Executante_de_outra_instituicao_Clara.docx	16/04/2018 17:32:17	Edmar Zanoteli	Aceito
Outros	Compromisso_de_doutorado.pdf	16/04/2018 17:31:04	Edmar Zanoteli	Aceito
Outros	edmarclaraprojetoassinadoPB.pdf	10/04/2018 21:48:03	Edmar Zanoteli	Aceito
Cronograma	CronogramaDMCmerosinaPB.doc	10/04/2018 21:45:10	Edmar Zanoteli	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEmerosinaPB.doc	10/04/2018 21:45:00	Edmar Zanoteli	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	AssentimentoMerosinaPB.doc	10/04/2018 21:44:44	Edmar Zanoteli	Aceito

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDMCmerosinaPB.doc	10/04/2018 21:44:32	Edmar Zanoteli	Aceito
Folha de Rosto	FRassinadaZANOTELImerosina.pdf	10/04/2018 21:35:32	Edmar Zanoteli	Aceito

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SÃO PAULO, 23 DE MAIO DE 2018

Assinado por:

Joel Faintuch

(Coordenador)

Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título da pesquisa: Estudo clínico e molecular de pacientes com distrofia muscular congênita com deficiência de merosina
Pesquisador principal: Clara Gontijo Camelo, CRM 195.367-SP
Pesquisador orientador: Umbertina Reed, Edmar Zanoteli
Instituição: Departamento de Neurologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP)

Convidamos você a participar desta pesquisa que tem como objetivo a caracterização clínica, histológica e do perfil genético dos pacientes com distrofia muscular congênita com deficiência de merosina. Nesta pesquisa serão feitas avaliações clínicas, revisão das biópsias musculares já realizadas e estudo do DNA. O exame do DNA, neste caso, visa identificar alterações nos genes (mutações) que produzem proteínas importantes para a contração muscular. Para esse fim, iremos colher amostra de sangue por meio de punção de veia superficial visível na região do braço. A coleta será realizada no Laboratório Central do HCFMUSP, por profissional especializado. Este exame é feito com uso de agulha descartável e apresenta desconforto ou risco mínimo com retirada de no máximo 10 mL de sangue. O material será então enviado ao nosso laboratório para as análises. Os riscos para a retirada de sangue incluem sangramento local, a qual é pequeno e facilmente controlado, formação de hematoma e desconforto transitório relacionado a introdução da agulha de coleta.

Este estudo trará para você ou seu filho (a) o benefício de conhecer com exatidão o tipo de miopatia distal, para que a equipe médica possa orientar melhor o seu tratamento, além de oferecer informações sobre a evolução da doença e o risco de repetição, caso desejem ter outros filhos.

Em qualquer etapa do estudo, o Sr (a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra Clara Gontijo Camelo, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255, Cerqueira César, São Paulo, Prédio dos Ambulatórios, 6o andar, telefone (11) 26616000, ramal 6341 e na sua

sala 5131, quinto andar do Instituto Central, telefone (11) 26617878, das 7 às 16 horas de 2a a 5a feira, das 7 às 16 horas, e às 6as feiras, das 7 às 12 horas e no e-mail claragc@gmail.com. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

É garantida a liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

As informações obtidas serão analisadas pelos pesquisadores em conjunto com aquelas de todos os demais pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. O Sr (a) tem o direito de ser mantido (a) atualizado (a) sobre os resultados parciais e final da pesquisa que neste caso corresponde ao diagnóstico da distrofia muscular congênita com deficiência de merosina.

*Fui suficientemente informado a respeito do estudo "*Distrofia muscular congênita com deficiência de merosina*". Eu discuti as informações acima com o pesquisador responsável (Dra Clara Gontijo Camelo) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.*

_____

_____

Assinatura do participante /representante legal Assinatura do responsável pelo estudo

Data__/__/__

Data__/__/__

NOME:.....
..... DOCUMENTO DE IDENTIDADE No :
..... SEXO : .M ( ) F ( )
DATA NASCIMENTO: ...../...../..... TELEFONE: DDD
(.....).....

RESPONSÁVEL LEGAL
(menores):.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.).....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ( ) F ( )
DATA NASCIMENTO: ...../...../..... TELEFONE: DDD (.....)
.....

Anexo C - Escala MFM32 com posição inicial e score

Item	Dimensão	Posição inicial	Exercícios
1	D2	Supino	Mantenha a cabeça no eixo e faça a rotação completa para cada um dos lados
2	D2		Levante a cabeça e a mantenha elevada
3	D2		Flexione o quadril e o joelho além de 90º, deslocando o pé do tapete
4	D3		Perna sustentada pelo examinador: realize a flexão dorsal do pé em 90º em relação à perna
5	D2		Eleve uma das mãos do tapete e toque o ombro oposto
6	D1		Membros inferiores semi-fletidos, patelas para cima, pés apoiados sobre o tapete. Eleve a pelve, coluna lombar, bacia e coxas, mantendo-as alinhadas e com os pés próximos
7	D2		Passe para decúbito ventral e libere os membros superiores debaixo do corpo
8	D1		Sente-se sobre o tapete, sem apoio dos membros superiores
9	D2	Sentado na maca	Sem apoio dos membros superiores, mantenha a posição sentada e coloque as mãos em contato entre si
10	D2		Bola de tênis em frente ao sujeito, sem apoio dos membros superiores. Incline-se para frente, toque a bola e depois volte à posição ereta
11	D1		Fique em pé, sem apoio dos membros superiores
12	D1	Em pé	Sem apoio dos membros superiores, sente-se na cadeira, mantendo os pés ligeiramente afastados
13	D2	Sentado na cadeira	Sem apoio dos membros superiores e sem apoio do encosto da cadeira, mantenha a posição sentada, com a cabeça e o tronco alinhados
14	D2	Sentado na cadeira	Com a cabeça posicionada em flexão: levante a cabeça e a mantenha elevada. O movimento e a manutenção devem ser feitos com a cabeça no eixo
15	D2		Antebraços apoiados sobre a mesa e cotovelos para fora: coloque ao mesmo tempo as duas mãos sobre a cabeça, com a cabeça e o tronco alinhados
16	D2		Lápis sobre a mesa: toque o lápis com uma das mãos, com o cotovelo em extensão completa no final do movimento
17	D3		Dez moedas sobre a mesa: pegue sucessivamente e armazene dez moedas de dez centavos em uma das mãos, no tempo de 20 segundos
18	D3		Dedo colocado no centro de um CD-Rom fixo: realize a volta completa do CD-Rom com o dedo, sem apoio da mão
19	D3		Lápis sobre a mesa: pegue o lápis com uma das mãos; desenhe uma série contínua de voltas de 1cm de altura, dentro de um retângulo de 4cm de comprimento
20	D3		Folha de papel entre as mãos: rasgue a folha dobrada em quatro começando pela dobra
21	D3		Bola de tênis sobre a mesa: pegue a bola e depois vire a mão completamente para cima segurando a bola
22	D3		Dedo no centro de um quadrado fixo: levante o dedo e depois o coloque sucessivamente no centro das oito casas do quadrado, sem tocar as linhas
23	D2		Membros superiores ao lado do corpo: ao mesmo tempo coloque os dois antebraços e/ou as mãos sobre a mesa
24	D1	Sentado na cadeira	Levante-se, sem apoio dos membros superiores, com os pés próximos
25	D1	Em pé; apoio dos membros superiores	Solte-se e mantenha-se em pé, com os pés próximos; cabeça, tronco e membros alinhados
26	D1		Sem apoio dos membros superiores, levante um pé, por dez segundos
27	D1	Em pé	Sem apoio, incline-se, toque o solo com uma das mãos e depois se levante
28	D1	Em pé sem apoio	Ande dez passos à frente, sobre ambos os calcanhares
29	D1		Ande dez passos à frente, sobre uma linha reta
30	D1		Corra dez metros
31	D1		Salte no mesmo lugar, com um pé, dez vezes seguidas
32	D1		Sem apoio dos membros superiores, agache-se e levante-se duas vezes em seguida

Fonte: adaptação/versão Bérard C, et al.[4]

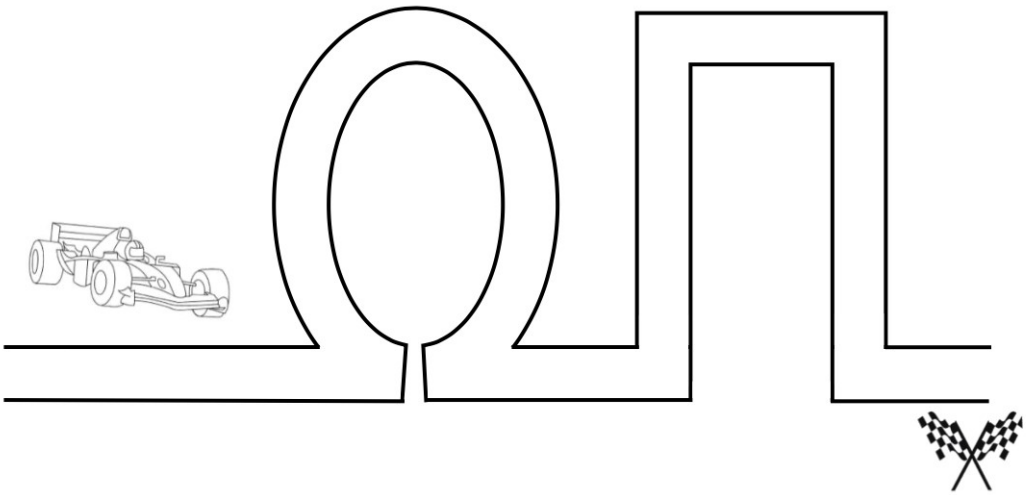
Anexo D – Escala RULM de avaliação de força de membros superiores

REVISED UPPER LIMB MODULE FOR SMA

Date of assessment: ☐☐/☐☐☐/☐☐☐☐ D D M M M Y Y Y Y **Preferred arm:** ❑ Right ❑ Left ❑Ambidextrous **TLSO worn:** ❑ Yes* ❑ No *If Yes, specify type: _____ **Right elbow contracture** ❑ Yes ❑ No **Left elbow contracture** ❑ Yes ❑ No **Salbutamol** ❑ Yes ❑ No **Spinal surgery** ❑ Yes ❑ No **Tested side** ❑ Right ❑ Left	Start Time: (HH:MM): _____:_____ 24-hour clock **Patient Name / ID:** **Assessor Name:** **Assessor Signature:**
Comments:	

A.ENTRY ITEM	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
	No useful function of hands.	Can use hands to hold pencil or pick up a coin/token or drive a powered chair, use phone key pad	Can raise 1 or 2 hands to mouth but cannot raise a cup with a 200g weight in it to mouth	Can raise standardized plastic cup with 200g weight in it to mouth using both hands if necessary.	Can raise both arms simultaneously to shoulder height with or without compensation. Elbows bent or in extension	Can raise both arms simultaneously above head only by flexing the elbows, shortening circumference of the movement /using accessory muscles	Can abduct both arms simultaneously elbows in extension in a full circle until they touch above the head

	Description	0	1	2	SCORE	
					R	L
B	**Bring hands from lap to table**	Unable to bring 1 hand to table	Brings one hand completely to table	Brings two hands completely to table, either together or one at a time	LBC	LBC
C	**Complete the path bringing the car to the finish line without stopping or taking pencil off of paper?**	With pencil in hand unable to hold it or make a mark	Able to complete the path but needs to stop or raises pencil from paper	Able to complete the path without stops or raising pencil from paper	LBC	LBC
D	**Pick up coins/tokens**	Cannot pick up one coin/token	Can pick up one coin/token	Can pick up and hold 2 coins/tokens	LBC	LBC
E	**Place coin/token into cup** • **On table: horizontal** • **At shoulder height: vertical**	Unable to bring coin/token Cup horizontal on table at wrist length with 90° shoulder flexion from the patient .	Able to bring coin/token to cup lying horizontally Cup horizontal on table at wrist length with 90° shoulder flexion from the patient	Able to bring coin/token into cup placed at shoulder level Cup vertical at arm length and 90° shoulder flexion from the patient with cup's upper rim at shoulder height under hand	LBC	LBC



	Description	0	1	2	SCORE	
F	**Reach to the side and touch the coin/token** **Bring hand at shoulder height and above**	*Target: Shoulder 90° abduction with coin/token at arm wrist length* Can't bring hand to shoulder height	*Target: Shoulder 90° abduction with coin/token at arm wrist length* Brings hand to shoulder height, elbow can be bent or extended	*Target: Shoulder 135° abduction, coin/token at fingertip length* Brings hand above shoulder height, elbow at least at eye level	LBC	LBC
G	**Push button light with one hand**	Unable to turn the light on with one hand	Able to turn the light on momentarily with fingers and/or thumb of one hand. *Elbow cannot be higher than the wrist*	Able to turn the light on permanently with fingers and/or thumb of one hand. *Elbow cannot be higher than the wrist*	LBC	LBC
H	**Tearing paper**	Cannot tear piece of paper folded in two	Tears the sheet of paper folded in 2, beginning from the folded edge	Tears the sheet of paper folded in 4, beginning from the folded edge	LBC	
I	**Open Ziploc container**	Unable to open.	Able to completely open container on table or against body		LBC	LBC
J	**Raise cup with 200g to mouth**	Unable to get cup to mouth	Cup with 200g to mouth with 2 hands	Cup with 200 g to mouth with 1 hand	LBC	LBC
K	**Lift weight and bring it from one circle to the other without sliding** **Between horizontal circles** **MIDLINE CIRCLE to OUTER on tested side**	Unable	Slide 200g	Lift 200g weight	LBC	LBC
L	**Lift weight and bring it from one circle to the other without sliding** **Between horizontal circles** **MIDLINE to OUTER CIRCLE on tested side**	Unable	Slide 500g	Lift 500g weight	LBC	LBC

M	**Lift weight and bring it from one circle to the other without sliding** **<u>Between diagonal circles</u>** **ACROSS MIDLINE, INNER TO OUTER CIRCLE on opposite side**	Unable	Slide 200g weight	Lift 200g weight	LBC	LBC

	Description	0	1	2	SCORE	
N	**Bring 500g sand weight from lap to table or eye level**	Unable to bring weight to table using two hand	Brings weight to table using two hands	Brings weight at eye level using two hands	LBC	
0 **Score from Entry item**	**Bring both arms above head -** ***Shoulder abduction***	Unable	Can raise both arms simultaneously above head only by flexing the elbow (using compensation) Entry item score 5	Can abduct both arms simultaneously elbows in extension in a full circle until they touch above the head Entry item score 6	LBC	
P	**Bring 500g weight above shoulder height-** ***Shoulder abduction***	Unable to lift 500g weight even with compensation	Able to lift 500g weight **with compensation**	Able to lift 500g weight **without compensation**	LBC	LBC
Q	**Bring 1kg weight above shoulder height-** ***Shoulder abduction***	Unable to lift 1 kg weight even with compensation	Able to lift 1 kg weight **with compensation**	Able to lift 1 kg weight **without compensation**	LBC	LBC
R	**Bring hand above shoulder height-** ***Shoulder flexion***	Unable	Able **with** compensation	Able **without** compensation	LBC	LBC
S	**Bring 500g weight above shoulder height-** ***Shoulder flexion***	Unable to lift 500g weight even with compensation	Able to lift 500g weight **with compensation**	Able to lift 500g weight **without compensation**	LBC	LBC
T	**Bring 1kg weight above shoulder height-** ***Shoulder flexion***	Unable to lift 1 kg weight even with compensation	Able to lift 1 kg weight **with compensation**	Able to lift 1 kg weight **without compensation**	LBC	LBC
				TOTAL		

9. Referências

Abdel Aleem, A., M. F. Elsaid, N. Chalhoub, A. Chakroun, K. A. S. Mohamed, R. AlShami, O. Kuzu, R. B. Mohamed, K. Ibrahim, N. AlMudheki, O. Osman, M. E. Ross and E. L. O (2020). "Clinical and genomic characteristics of LAMA2 related congenital muscular dystrophy in a patients' cohort from Qatar. A population specific founder variant." Neuromuscul Disord **30**(6): 457-471.

Allamand, V. and P. Guicheney (2002). "Merosin-deficient congenital muscular dystrophy, autosomal recessive (MDC1A, MIM#156225, LAMA2 gene coding for alpha2 chain of laminin)." Eur J Hum Genet **10**(2): 91-94.

Arreguin, A. J. and H. Colognato (2020). "Brain Dysfunction in LAMA2-Related Congenital Muscular Dystrophy: Lessons From Human Case Reports and Mouse Models." Front Mol Neurosci **13**: 118.

Bendixen, R. M., J. Butrum, M. S. Jain, R. Parks, B. Hodsdon, C. Nichols, M. Hsia, L. Nelson, K. C. Keller, M. McGuire, J. S. Elliott, M. M. Linton, I. C. Arveson, F. Tounkara, R. Vasavada, E. Harnett, M. Punjabi, S. Donkervoort, J. Dastgir, M. E. Leach, A. Rutkowski, M. Waite, J. Collins, C. G. Bonnemann and K. G. Meilleur (2017). "Upper extremity outcome measures for collagen VI-related myopathy and LAMA2-related muscular dystrophy." Neuromuscul Disord **27**(3): 278-285.

Bonnemann, C. G., C. H. Wang, S. Quijano-Roy, N. Deconinck, E. Bertini, A. Ferreiro, F. Muntoni, C. Sewry, C. Beroud, K. D. Mathews, S. A. Moore, J. Bellini, A. Rutkowski, K. N. North and D. Members of International Standard of Care Committee for Congenital Muscular (2014). "Diagnostic approach to the congenital muscular dystrophies." Neuromuscul Disord **24**(4): 289-311.

Brun, B. N., S. R. Mockler, K. M. Laubscher, C. M. Stephan, A. M. Wallace, J. A. Collison, M. B. Zimmerman, W. B. Dobyns and K. D. Mathews (2017). "Comparison of brain MRI findings with language and motor function in the dystroglycanopathies." Neurology **88**(7): 623-629.

Butterfield, R. J. (2019). "Congenital Muscular Dystrophy and Congenital Myopathy." Continuum (Minneap Minn) **25**(6): 1640-1661.

Carboni, N., G. Marrosu, M. Porcu, A. Mateddu, E. Solla, E. Cocco, M. A. Maioli, V. Oppo, R. Piras and M. G. Marrosu (2011). "Dilated cardiomyopathy with conduction defects in a patient with partial merosin deficiency due to mutations in the laminin-alpha2-chain gene: a chance association or a novel phenotype?" Muscle Nerve **44**(5): 826-828.

Carmignac, V. and M. Durbeej (2012). "Cell-matrix interactions in muscle disease." J Pathol **226**(2): 200-218.
Cho, J., S. H. Kim, K. H. Kim, S. W. Kim and H. Y. Shin (2021). "Rimmed vacuoles in late-onset LAMA2-related limb girdle muscular dystrophy." Acta Neurol Belg **121**(5): 1389-1391.
Darin, N. and M. Tulinius (2000). "Neuromuscular disorders in childhood: a descriptive epidemiological study from western Sweden." Neuromuscul Disord **10**(1): 1-9.
Di Blasi, C., E. Bellafiore, M. A. Salih, M. C. Manzini, S. A. Moore, M. Z. Seidahmed, M. M. Mukhtar, Z. A. Karrar, C. A. Walsh, K. P. Campbell, R. Mantegazza, L. Morandi and M. Mora (2011). "Variable disease severity in Saudi Arabian and Sudanese families with c.3924 + 2 T > C mutation of LAMA2." BMC Res Notes **4**: 534.
Di Blasi, C., M. Mora, D. Pareyson, L. Farina, A. Sghirlanzoni, N. Vignier, F. Blasevich, F. Cornelio, P. Guicheney and L. Morandi (2000). "Partial laminin alpha2 chain deficiency in a patient with myopathy resembling inclusion body myositis." Ann Neurol **47**(6): 811-816.
Di Muzio, A., M. V. De Angelis, P. Di Fulvio, A. Ratti, A. Pizzuti, L. Stuppia, D. Gambi and A. Uncini (2003). "Dysmyelinating sensory-motor neuropathy in merosin-deficient congenital muscular dystrophy." Muscle Nerve **27**(4): 500-506.
Ding, J., D. Zhao, R. Du, Y. Zhang, H. Yang, J. Liu, C. Yan, F. Zhang and H. Xiong (2016). "Clinical and molecular genetic analysis of a family with late-onset LAMA2-related muscular dystrophy." Brain Dev **38**(2): 242-249.
Durbeej, M. (2015). "Laminin-alpha2 Chain-Deficient Congenital Muscular Dystrophy: Pathophysiology and Development of Treatment." Curr Top Membr **76**: 31-60.
Ervasti, J. M. and K. J. Sonnemann (2008). "Biology of the striated muscle dystrophin-glycoprotein complex." Int Rev Cytol **265**: 191-225.
Fontes-Oliveira, C. C., M. Steinz, P. Schneiderat, H. Mulder and M. Durbeej (2017). "Bioenergetic Impairment in Congenital Muscular Dystrophy Type 1A and Leigh Syndrome Muscle Cells." Sci Rep **7**: 45272.
Gartman, E. J. (2018). "Pulmonary Function Testing in Neuromuscular and Chest Wall Disorders." Clin Chest Med **39**(2): 325-334.
Gavassini, B. F., N. Carboni, J. E. Nielsen, E. R. Danielsen, C. Thomsen, K. Svenstrup, L. Bello, M. A. Maioli, G. Marrosu, A. F. Ticca, M. Mura, M. G. Marrosu, G. Soraru, C. Angelini, J. Vissing and E. Pegoraro (2011). "Clinical and molecular characterization of limb-girdle muscular dystrophy due to LAMA2 mutations." Muscle Nerve **44**(5): 703-709.
Ge, L., A. Liu, K. Gao, R. Du, J. Ding, B. Mao, Y. Hua, X. Zhang, D. Tan, H. Yang, X. Fu, Y. Fan, L. Zhang, S. Song, J. Wu, F. Zhang, Y. Jiang, X. Wu and H. Xiong (2018). "Deletion of exon 4

in LAMA2 is the most frequent mutation in Chinese patients with laminin α2-related muscular dystrophy." Sci Rep **8**(1): 14989.
Geranmayeh, F., E. Clement, L. H. Feng, C. Sewry, J. Pagan, R. Mein, S. Abbs, L. Brueton, A. M. Childs, H. Jungbluth, C. G. De Goede, B. Lynch, J. P. Lin, G. Chow, C. Sousa, O. O'Mahony, A. Majumdar, V. Straub, K. Bushby and F. Muntoni (2010). "Genotype-phenotype correlation in a large population of muscular dystrophy patients with LAMA2 mutations." Neuromuscul Disord **20**(4): 241-250.
Gilhuis, H. J., H. J. ten Donkelaar, R. B. Tanke, D. M. Vingerhoets, M. J. Zwarts, A. Verrips and F. J. Gabreels (2002). "Nonmuscular involvement in merosin-negative congenital muscular dystrophy." Pediatr Neurol **26**(1): 30-36.
Graziano, A., F. Bianco, A. D'Amico, I. Moroni, S. Messina, C. Bruno, E. Pegoraro, M. Mora, G. Astrea, F. Magri, G. P. Comi, A. Berardinelli, M. Moggio, L. Morandi, A. Pini, R. Petillo, G. Tasca, M. Monforte, C. Minetti, T. Mongini, E. Ricci, K. Gorni, R. Battini, M. Villanova, L. Politano, F. Gualandi, A. Ferlini, F. Muntoni, F. M. Santorelli, E. Bertini, M. Pane and E. Mercuri (2015). "Prevalence of congenital muscular dystrophy in Italy: a population study." Neurology **84**(9): 904-911.
Gumerson, J. D. and D. E. Michele (2011). "The dystrophin-glycoprotein complex in the prevention of muscle damage." J Biomed Biotechnol **2011**: 210797.
Hayes, L. H., P. Yun, P. Mohassel, G. Norato, S. Donkervoort, M. E. Leach, R. Alvarez, A. Rutkowski, N. D. Shaw, A. R. Foley and C. G. Bonnemann (2020). "Hypoglycemia in patients with congenital muscle disease." BMC Pediatr **20**(1): 57.
Helbling-Leclerc, A., X. Zhang, H. Topaloglu, C. Cruaud, F. Tesson, J. Weissenbach, F. M. Tome, K. Schwartz, M. Fardeau, K. Tryggvason and et al. (1995). "Mutations in the laminin alpha 2-chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy." Nat Genet **11**(2): 216-218.
Holmberg, J. and M. Durbeej (2013). "Laminin-211 in skeletal muscle function." Cell Adh Migr **7**(1): 111-121.
Jain, M. and G. R. Passi (2005). "Assessment of a modified Mini-Mental Scale for cognitive functions in children." Indian Pediatr **42**(9): 907-912.
Jain, M. S., K. Meilleur, E. Kim, G. Norato, M. Waite, L. Nelson, M. McGuire, T. Duong, K. Keller, D. J. Lott, A. Glanzman, K. Rose, M. Main, C. Fiorini, I. Chrismer, M. Linton, M. Punjabi, J. Elliott, F. Tounkara, R. Vasavada, R. Logaraj, J. Winkert, S. Donkervoort, M. Leach, J. Dastgir, L. Hynan, C. Nichols, E. Hartnett, G. M. Averion, J. C. Collins, E. S. Kim, A. Kokkinis, A. Schindler, K. Zukosky, R. Fee, V. Hinton, P. Mohassel, D. Bharucha-Goebel, C. Vuillerot, P. McGraw, M. Barton, J. Fontana, A. Rutkowski, A. R. Foley and C. G. Bönnemann (2019). "Longitudinal changes in clinical outcome measures in COL6-related dystrophies and LAMA2-related dystrophies." Neurology **93**(21): e1932-e1943.

Jayakody, H., S. Zarei, H. Nguyen, J. Dalton, K. Chen, L. Hudgins, J. Day, K. Withrow, A. Pandya, J. Teasley, W. B. Dobyns, K. D. Mathews and S. A. Moore (2020). "Cobblestone Malformation in LAMA2 Congenital Muscular Dystrophy (MDC1A)." J Neuropathol Exp Neurol **79**(9): 998-1010.
Jones, K. J., G. Morgan, H. Johnston, V. Tobias, R. A. Ouvrier, I. Wilkinson and K. N. North (2001). "The expanding phenotype of laminin alpha2 chain (merosin) abnormalities: case series and review." J Med Genet **38**(10): 649-657.
Katsetos, C. D., S. Koutzaki and J. J. Melvin (2013). "Mitochondrial dysfunction in neuromuscular disorders." Semin Pediatr Neurol **20**(3): 202-215.
Koopman, R., C. H. Ly and J. G. Ryall (2014). "A metabolic link to skeletal muscle wasting and regeneration." Front Physiol **5**: 32.
Le Goff, L., K. G. Meilleur, G. Norato, P. Rippert, M. Jain, M. Fink, A. R. Foley, M. Waite, S. Donkervoort, C. G. Bonnemann and C. Vuillerot (2021). "Responsiveness and Minimal Clinically Important Difference of the Motor Function Measure in Collagen VI-Related Dystrophies and Laminin Alpha2-Related Muscular Dystrophy." Arch Phys Med Rehabil **102**(4): 604-610.
Leite, C. C., L. T. Lucato, M. G. Martin, L. G. Ferreira, M. B. Resende, M. S. Carvalho, S. K. Marie, J. R. Jinkins and U. C. Reed (2005). "Merosin-deficient congenital muscular dystrophy (CMD): a study of 25 Brazilian patients using MRI." Pediatr Radiol **35**(6): 572-579.
Løkken, N., A. P. Born, M. Duno and J. Vissing (2015). "LAMA2-related myopathy: Frequency among congenital and limb-girdle muscular dystrophies." Muscle Nerve **52**(4): 547-553.
Mazzone, E. S., A. Mayhew, J. Montes, D. Ramsey, L. Fanelli, S. D. Young, R. Salazar, R. De Sanctis, A. Pasternak, A. Glanzman, G. Coratti, M. Civitello, N. Forcina, R. Gee, T. Duong, M. Pane, M. Scoto, M. C. Pera, S. Messina, G. Tennekoon, J. W. Day, B. T. Darras, D. C. De Vivo, R. Finkel, F. Muntoni and E. Mercuri (2017). "Revised upper limb module for spinal muscular atrophy: Development of a new module." Muscle Nerve **55**(6): 869-874.
Meilleur, K. G., M. S. Jain, L. S. Hynan, C. Y. Shieh, E. Kim, M. Waite, M. McGuire, C. Fiorini, A. M. Glanzman, M. Main, K. Rose, T. Duong, R. Bendixen, M. M. Linton, I. C. Arveson, C. Nichols, K. Yang, K. H. Fischbeck, K. R. Wagner, K. North, A. Mankodi, C. Grunseich, E. J. Hartnett, M. Smith, S. Donkervoort, A. Schindler, A. Kokkinis, M. Leach, A. R. Foley, J. Collins, F. Muntoni, A. Rutkowski and C. G. Bonnemann (2015). "Results of a two-year pilot study of clinical outcome measures in collagen VI- and laminin alpha2-related congenital muscular dystrophies." Neuromuscul Disord **25**(1): 43-54.
Menezes, M. J., F. K. McClenahan, C. V. Leiton, A. Aranmolate, X. Shan and H. Colognato (2014). "The extracellular matrix protein laminin alpha2 regulates the maturation and function of the blood-brain barrier." J Neurosci **34**(46): 15260-15280.

Mercuri, E., J. Gruter-Andrew, J. Philpot, C. Sewry, S. Counsell, S. Henderson, A. Jensen, I. Naom, G. Bydder, V. Dubowitz and F. Muntoni (1999). "Cognitive abilities in children with congenital muscular dystrophy: correlation with brain MRI and merosin status." Neuromuscul Disord **9**(6-7): 383-387.
Messina, S., C. Bruno, I. Moroni, E. Pegoraro, A. D'Amico, R. Biancheri, A. Berardinelli, P. Boffi, D. Cassandrini, L. Farina, C. Minetti, M. Moggio, T. Mongini, E. Mottarelli, M. Pane, C. Pantaleoni, A. Pichiecchio, A. Pini, E. Ricci, S. Saredi, M. Sframeli, G. Tortorella, A. Toscano, C. P. Trevisan, C. Uggetti, G. Vasco, G. P. Comi, F. M. Santorelli, E. Bertini and E. Mercuri (2010). "Congenital muscular dystrophies with cognitive impairment. A population study." Neurology **75**(10): 898-903.
Miller, S. A., D. D. Dykes and H. F. Polesky (1988). "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells." Nucleic Acids Res **16**(3): 1215.
Mohassel, P., A. R. Foley and C. G. Bonnemann (2018). "Extracellular matrix-driven congenital muscular dystrophies." Matrix Biol **71-72**: 188-204.
Natera-de Benito, D., J. Muchart, D. Itzep, C. Ortez, L. Gonzalez-Quereda, P. Gallano, A. Ramirez, J. Aparicio, J. Dominguez-Carral, L. Carrera-Garcia, J. Exposito-Escudero, N. Pardo Cardozo, D. Cuadras, A. Codina, C. Jou, C. Jimenez-Mallebrera, F. Palau, J. Colomer, A. Arzimanoglou, A. Nascimento and V. San Antonio-Arce (2020). "Epilepsy in LAMA2-related muscular dystrophy: An electro-clinico-radiological characterization." Epilepsia **61**(5): 971-983.
Nelson, I., T. Stojkovic, V. Allamand, F. Leturcq, H. M. Becane, D. Babuty, A. Toutain, C. Beroud, P. Richard, N. B. Romero, B. Eymard, R. Ben Yaou and G. Bonne (2015). "Laminin alpha2 Deficiency-Related Muscular Dystrophy Mimicking Emery-Dreifuss and Collagen VI related Diseases." J Neuromuscul Dis **2**(3): 229-240.
Oliveira, J., A. Goncalves, M. E. Oliveira, I. Fineza, R. C. Pavanello, M. Vainzof, E. Bronze-da-Rocha, R. Santos and M. Sousa (2014). "Reviewing Large LAMA2 Deletions and Duplications in Congenital Muscular Dystrophy Patients." J Neuromuscul Dis **1**(2): 169-179.
Oliveira, J., A. Gruber, M. Cardoso, R. Taipa, I. Fineza, A. Goncalves, A. Laner, T. L. Winder, J. Schroeder, J. Rath, M. E. Oliveira, E. Vieira, A. P. Sousa, J. P. Vieira, T. Lourenco, L. Almendra, L. Negrao, M. Santos, M. Melo-Pires, T. Coelho, J. T. den Dunnen, R. Santos and M. Sousa (2018). "LAMA2 gene mutation update: Toward a more comprehensive picture of the laminin-alpha2 variome and its related phenotypes." Hum Mutat **39**(10): 1314-1337.
Oliveira, J., J. Parente Freixo, M. Santos and T. Coelho (1993). LAMA2 Muscular Dystrophy. GeneReviews((R)). M. P. Adam, D. B. Everman, G. M. Mirzaa et al. Seattle (WA).

Oliveira, J., R. Santos, I. Soares-Silva, P. Jorge, E. Vieira, M. E. Oliveira, A. Moreira, T. Coelho, J. C. Ferreira, M. J. Fonseca, C. Barbosa, J. Prats, M. L. Ariztegui, M. L. Martins, T. Moreno, K. Heinimann, C. Barbot, S. I. Pascual-Pascual, A. Cabral, I. Fineza, M. Santos and E. Bronze-da-Rocha (2008). "LAMA2 gene analysis in a cohort of 26 congenital muscular dystrophy patients." Clin Genet **74**(6): 502-512.

Perrin, A., J. Rousseau and J. P. Tremblay (2017). "Increased Expression of Laminin Subunit Alpha 1 Chain by dCas9-VP160." Mol Ther Nucleic Acids **6**: 68-79.

Philpot, J., A. Bagnall, C. King, V. Dubowitz and F. Muntoni (1999). "Feeding problems in merosin deficient congenital muscular dystrophy." Arch Dis Child **80**(6): 542-547.

Pike, N. A., M. K. Poulsen and M. A. Woo (2017). "Validity of the Montreal Cognitive Assessment Screener in Adolescents and Young Adults With and Without Congenital Heart Disease." Nurs Res **66**(3): 222-230.

Prandini, P., A. Berardinelli, M. Fanin, F. Morello, E. Zardini, A. Pichiecchio, C. Uggetti, G. Lanzi, C. Angelini and E. Pegoraro (2004). "LAMA2 loss-of-function mutation in a girl with a mild congenital muscular dystrophy." Neurology **63**(6): 1118-1121.

Previtali, S. C. and A. A. Zambon (2020). "LAMA2 Neuropathies: Human Findings and Pathomechanisms From Mouse Models." Front Mol Neurosci **13**: 60.

Quijano-Roy, S., J. Haberlova, C. Castiglioni, J. Vissing, F. Munell, F. Rivier, T. Stojkovic, E. Malfatti, M. Gomez Garcia de la Banda, G. Tasca, L. Costa Comellas, A. Benezit, H. Amthor, I. Dabaj, C. Gontijo Camelo, P. Laforet, J. Rendu, N. B. Romero, E. Cavassa, F. Fattori, C. Beroud, J. Zidkova, N. Leboucq, N. Lokken, A. Sanchez-Montanez, X. Ortega, M. Kyncl, C. Metay, D. Gomez-Andres and R. Y. Carlier (2022). "Diagnostic interest of whole-body MRI in early- and late-onset LAMA2 muscular dystrophies: a large international cohort." J Neurol **269**(5): 2414-2429.

Quijano-Roy, S., F. Renault, N. Romero, P. Guicheney, M. Fardeau and B. Estournet (2004). "EMG and nerve conduction studies in children with congenital muscular dystrophy." Muscle Nerve **29**(2): 292-299.

Reed, U. C. (2009). "Congenital muscular dystrophy. Part I: a review of phenotypical and diagnostic aspects." Arq Neuropsiquiatr **67**(1): 144-168.

Reinhard, J. R., S. Lin, K. K. McKee, S. Meinen, S. C. Crosson, M. Sury, S. Hobbs, G. Maier, P. D. Yurchenco and M. A. Rüegg (2017). "Linker proteins restore basement membrane and correct LAMA2-related muscular dystrophy in mice." Sci Transl Med **9**(396).

Relucio, J., M. J. Menezes, Y. Miyagoe-Suzuki, S. Takeda and H. Colognato (2012). "Laminin regulates postnatal oligodendrocyte production by promoting oligodendrocyte progenitor survival in the subventricular zone." Glia **60**(10): 1451-1467.

Richards, S., N. Aziz, S. Bale, D. Bick, S. Das, J. Gastier-Foster, W. W. Grody, M. Hegde, E. Lyon, E. Spector, K. Voelkerding, H. L. Rehm and A. L. Q. A. Committee (2015). "Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology." Genet Med **17**(5): 405-424.

Roca, J., F. Burgos, J. Sunyer, M. Saez, S. Chinn, J. M. Anto, R. Rodriguez-Roisin, P. H. Quanjer, D. Nowak and P. Burney (1998). "References values for forced spirometry. Group of the European Community Respiratory Health Survey." Eur Respir J **11**(6): 1354-1362.

Salvati, A., E. Bonaventura, G. Sesso, R. Pasquariello and F. Sicca (2021). "Epilepsy in LAMA2-related muscular dystrophy: A systematic review of the literature." Seizure **91**: 425-436.

Sarkozy, A., A. R. Foley, A. A. Zambon, C. G. Bonnemann and F. Muntoni (2020). "LAMA2-Related Dystrophies: Clinical Phenotypes, Disease Biomarkers, and Clinical Trial Readiness." Front Mol Neurosci **13**: 123.

Sarkozy, A., A. R. Foley, A. A. Zambon, C. G. Bönnemann and F. Muntoni (2020). "LAMA2-Related Dystrophies: Clinical Phenotypes, Disease Biomarkers, and Clinical Trial Readiness." Front Mol Neurosci **13**: 123.

Schorling, D. C., J. Kirschner and C. G. Bonnemann (2017). "Congenital Muscular Dystrophies and Myopathies: An Overview and Update." Neuropediatrics **48**(4): 247-261.

Sewry, C. A., M. D'Alessandro, L. A. Wilson, L. M. Sorokin, I. Naom, S. Bruno, A. Ferlini, V. Dubowitz and F. Muntoni (1997). "Expression of laminin chains in skin in merosin-deficient congenital muscular dystrophy." Neuropediatrics **28**(4): 217-222.

Shorer, Z., J. Philpot, F. Muntoni, C. Sewry and V. Dubowitz (1995). "Demyelinating peripheral neuropathy in merosin-deficient congenital muscular dystrophy." J Child Neurol **10**(6): 472-475.

Smeets, H. J. M., B. Verbrugge, P. Springuel, N. C. Voermans and M. A. W. Group (2021). "Merosin deficient congenital muscular dystrophy type 1A: An international workshop on the road to therapy 15-17 November 2019, Maastricht, the Netherlands." Neuromuscul Disord **31**(7): 673-680.

Specchio, N., E. C. Wirrell, I. E. Scheffer, R. Nabbout, K. Riney, P. Samia, M. Guerreiro, S. Gwer, S. M. Zuberi, J. M. Wilmshurst, E. Yozawitz, R. Pressler, E. Hirsch, S. Wiebe, H. J. Cross, E. Perucca, S. L. Moshé, P. Tinuper and S. Auvin (2022). "International League Against Epilepsy classification and definition of epilepsy syndromes with onset in childhood: Position paper by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions." Epilepsia **63**(6): 1398-1442.

Sunehag, A. L., M. S. Treuth, G. Toffolo, N. F. Butte, C. Cobelli, D. M. Bier and M. W. Haymond (2001). "Glucose production, gluconeogenesis, and insulin sensitivity in children and

adolescents: an evaluation of their reproducibility." Pediatr Res **50**(1): 115-123.
Tan, D., L. Ge, Y. Fan, X. Chang, S. Wang, C. Wei, J. Ding, A. Liu, S. Wang, X. Li, K. Gao, H. Yang, C. Que, Z. Huang, C. Li, Y. Zhu, B. Mao, B. Jin, Y. Hua, X. Zhang, B. Zhang, W. Zhu, C. Zhang, Y. Wang, Y. Yuan, Y. Jiang, A. Rutkowski, C. G. Bonnemann, X. Wu and H. Xiong (2021). "Natural history and genetic study of LAMA2-related muscular dystrophy in a large Chinese cohort." Orphanet J Rare Dis **16**(1): 319.
Tan, D., L. Ge, Y. Fan, X. Chang, S. Wang, C. Wei, J. Ding, A. Liu, S. Wang, X. Li, K. Gao, H. Yang, C. Que, Z. Huang, C. Li, Y. Zhu, B. Mao, B. Jin, Y. Hua, X. Zhang, B. Zhang, W. Zhu, C. Zhang, Y. Wang, Y. Yuan, Y. Jiang, A. Rutkowski, C. G. Bönnemann, X. Wu and H. Xiong (2021). "Natural history and genetic study of LAMA2-related muscular dystrophy in a large Chinese cohort." Orphanet J Rare Dis **16**(1): 319.
Tan, D., L. Ge, Y. Fan, C. Wei, H. Yang, A. Liu, J. Xiao, H. Xiong and Y. Zhu (2021). "Muscle magnetic resonance imaging in patients with LAMA2-related muscular dystrophy." Neuromuscul Disord **31**(11): 1144-1153.
Tan, E., H. Topaloglu, C. Sewry, Y. Zorlu, I. Naom, S. Erdem, M. D'Alessandro, F. Muntoni and V. Dubowitz (1997). "Late onset muscular dystrophy with cerebral white matter changes due to partial merosin deficiency." Neuromuscul Disord **7**(2): 85-89.
Taratuto, A. L., F. Lubieniecki, D. Diaz, M. Schultz, V. Ruggieri, M. Saccoliti and A. Dubrovsky (1999). "Merosin-deficient congenital muscular dystrophy associated with abnormal cerebral cortical gyration: an autopsy study." Neuromuscul Disord **9**(2): 86-94.
Toda, T., K. Kobayashi, E. Kondo-Iida, J. Sasaki and Y. Nakamura (2000). "The Fukuyama congenital muscular dystrophy story." Neuromuscul Disord **10**(3): 153-159.
Tome, F. M., T. Evangelista, A. Leclerc, Y. Sunada, E. Manole, B. Estournet, A. Barois, K. P. Campbell and M. Fardeau (1994). "Congenital muscular dystrophy with merosin deficiency." C R Acad Sci III **317**(4): 351-357.
Trundell, D., S. Le Scouiller, K. Gorni, T. Seabrook, C. Vuillerot and S. M. S. Group (2020). "Validity and Reliability of the 32-Item Motor Function Measure in 2- to 5-Year-Olds with Neuromuscular Disorders and 2- to 25-Year-Olds with Spinal Muscular Atrophy." Neurol Ther **9**(2): 575-584.
Uhlen, M., L. Fagerberg, B. M. Hallstrom, C. Lindskog, P. Oksvold, A. Mardinoglu, A. Sivertsson, C. Kampf, E. Sjostedt, A. Asplund, I. Olsson, K. Edlund, E. Lundberg, S. Navani, C. A. Szigyarto, J. Odeberg, D. Djureinovic, J. O. Takanen, S. Hober, T. Alm, P. H. Edqvist, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, J. Rockberg, P. Nilsson, J. M. Schwenk, M. Hamsten, K. von Feilitzen, M. Forsberg, L. Persson, F. Johansson, M. Zwahlen, G. von Heijne, J. Nielsen and F. Ponten (2015). "Proteomics. Tissue-based map of the human proteome." Science **347**(6220): 1260419.

Vuillerot, C., P. Rippert, V. Kinet, A. Renders, M. Jain, M. Waite, A. M. Glanzman, F. Girardot, D. Hamroun, J. Iwaz, R. Ecochard, S. Quijano-Roy, C. Berard, I. Poirot, C. G. Bonnemann and C. M. S. Group (2014). "Rasch analysis of the motor function measure in patients with congenital muscle dystrophy and congenital myopathy." Arch Phys Med Rehabil **95**(11): 2086-2095.

Wallgren-Pettersson, C., K. Bushby, U. Mellies, A. Simonds and Enmc (2004). "117th ENMC workshop: ventilatory support in congenital neuromuscular disorders -- congenital myopathies, congenital muscular dystrophies, congenital myotonic dystrophy and SMA (II) 4-6 April 2003, Naarden, The Netherlands." Neuromuscul Disord **14**(1): 56-69.

Wesstrom, G., J. Bensch and J. Schollin (1986). "Congenital myotonic dystrophy. Incidence, clinical aspects and early prognosis." Acta Paediatr Scand **75**(5): 849-854.

Xiong, H., D. Tan, S. Wang, S. Song, H. Yang, K. Gao, A. Liu, H. Jiao, B. Mao, J. Ding, X. Chang, J. Wang, Y. Wu, Y. Yuan, Y. Jiang, F. Zhang, H. Wu and X. Wu (2015). "Genotype/phenotype analysis in Chinese laminin-α2 deficient congenital muscular dystrophy patients." Clin Genet **87**(3): 233-243.

Yoshida-Moriguchi, T. and K. P. Campbell (2015). "Matriglycan: a novel polysaccharide that links dystroglycan to the basement membrane." Glycobiology **25**(7): 702-713.

Yurchenco, P. D. and K. K. McKee (2019). "Linker Protein Repair of LAMA2 Dystrophic Neuromuscular Basement Membranes." Front Mol Neurosci **12**: 305.

Yurchenco, P. D., K. K. McKee, J. R. Reinhard and M. A. Rüegg (2018). "Laminin-deficient muscular dystrophy: Molecular pathogenesis and structural repair strategies." Matrix Biol **71-72**: 174-187.

Zambon, A. A. and F. Muntoni (2021). "Congenital muscular dystrophies: What is new?" Neuromuscul Disord **31**(10): 931-942.

Zambon, A. A., D. Ridout, M. Main, R. Mein, R. Phadke, F. Muntoni and A. Sarkozy (2020). "LAMA2-related muscular dystrophy: Natural history of a large pediatric cohort." Ann Clin Transl Neurol **7**(10): 1870-1882.

Gmail Dra. Clara GC <claragc@gmail.com>

Submission Confirmation for Central Nervous system involvement in LAMA2 related dystrophy

1 message

Journal of Neuromuscular Diseases <em@editorialmanager.com> 20 November 2022 at 22:06
Reply-To: Journal of Neuromuscular Diseases <jnd@iospress.com>
To: Clara Gontijo Camelo <claragc@gmail.com>

Dear Dr. Camelo,

Your submission entitled "Central Nervous system involvement in LAMA2 related dystrophy" has been succesfully received by Journal of Neuromuscular Diseases, and has been assigned manuscript number JND-221638.

You will be able to check the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is https://www.editorialmanager.com/jnd/.

Thank you for submitting your work.

Kind regards,

Journal of Neuromuscular Diseases

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: https://www.editorialmanager.com/jnd/login.asp?a=r). Please contact the publication office if you have any questions.

Gmail **Dra. Clara GC <claragc@gmail.com>**

Submission to Pediatric Neurology - manuscript number

Pediatric Neurology <em@editorialmanager.com> 8 August 2022 at 06:35
Reply-To: Pediatric Neurology <support@elsevier.com>
To: Clara Gontijo Camelo <claragc@gmail.com>

This is an automated message.

Manuscript Number: PNU-D-22-00458
Hypoglycemia in patients with LAMA2-CMD

Dear Mrs. Camelo,

Your above referenced submission has been assigned a manuscript number: PNU-D-22-00458.

To track the status of your manuscript, please log in as an author at https://www.editorialmanager.com/pnu/, and navigate to the "Submissions Being Processed" folder.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
Pediatric Neurology

More information and support

You will find information relevant for you as an author on Elsevier's Author Hub: https://www.elsevier.com/authors

FAQ: How can I reset a forgotten password?
https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/
For further assistance, please visit our customer service site: https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/
Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about Editorial Manager via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email

#AU_PNU#

To ensure this email reaches the intended recipient, please do not delete the above code

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: https://www.editorialmanager.com/pnu/login.asp?a=r). Please contact the publication office if you have any questions.

Gmail **Dra. Clara GC <claragc@gmail.com>**

Your Submission PNU-D-22-00458

Pediatric Neurology <em@editorialmanager.com> 20 November 2022 at 12:46
Reply-To: Pediatric Neurology <support@elsevier.com>
To: Clara Gontijo Camelo <claragc@gmail.com>

ELSEVIER

Ref.: Ms. No. PNU-D-22-00458
Hypoglycemia in patients with LAMA2-CMD
Pediatric Neurology

Dear Mrs. Camelo,

Thank you for submitting your manuscript to Pediatric Neurology. Your paper should become acceptable for publication pending suitable minor revision and modification of the article in light of the appended reviewer comments.

When resubmitting your manuscript, please carefully consider all issues mentioned in the reviewers' comments and provide a point-by-point list of your responses to the reviewer comments. Please be certain that all responses are fully reflected in the manuscript itself, not just in the reply summary.

To submit your revised manuscript go to https://www.editorialmanager.com/pnu/ and log in as an Author where you will see a menu item called 'Submission Needing Revision'.

Please resubmit your manuscript by Jan 04, 2023.

Research Elements (optional)
This journal encourages you to share research objects - including your raw data, methods, protocols, software, hardware and more – which support your original research article in a Research Elements journal. Research Elements are open access, multidisciplinary, peer-reviewed journals which make the objects associated with your research more discoverable, trustworthy and promote replicability and reproducibility. As open access journals, there may be an Article Publishing Charge if your paper is accepted for publication. Find out more about the Research Elements journals at https://www.elsevier.com/authors/tools-and-resources/research-elements-journals?dgcid=ec_em_research_elements_email.

I look forward to receiving your revised manuscript.

Sincerely,

Yasmin Khakoo, MD, FAAN, FAAP
Editor-in-Chief
Pediatric Neurology

Comments from the Editors and Reviewers:

Reviewer 1: This is a single-center retrospective cohort study examining risk factors for hypoglycemia in a Brazilian cohort 48 patients with LAMA2-CMD. The authors identified several features predisposing to hypoglycemia. The sample size is fairly large for such a rare disease. Overall, this is a nicely conceived and executed study, with clinically actionable results that could be used to help identify patients at high risk and help guide preventive strategies. The results offer an important natural history foundation for future guidelines and future clinical trials. I have included

Gmail **Dra. Clara GC <claragc@gmail.com>**

Confirming submission to Pediatric Neurology

Pediatric Neurology <em@editorialmanager.com> 26 November 2022 at 10:35
Reply-To: Pediatric Neurology <support@elsevier.com>
To: Clara Gontijo Camelo <claragc@gmail.com>

ELSEVIER

This is an automated message.

Manuscript Number: PNU-D-22-00458R1

Hypoglycemia in patients with LAMA2-CMD

Dear Mrs. Camelo,

We have received the above referenced manuscript you submitted to Pediatric Neurology.

To track the status of your manuscript, please log in as an author at https://www.editorialmanager.com/pnu/, and navigate to the "Revisions Being Processed" folder.

Thank you for submitting your revision to this journal.

Kind regards,
Pediatric Neurology

More information and support

You will find information relevant for you as an author on Elsevier's Author Hub: https://www.elsevier.com/authors

FAQ: How can I reset a forgotten password?
https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/
For further assistance, please visit our customer service site: https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/
Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about Editorial Manager via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email

#AU_PNU#

To ensure this email reaches the intended recipient, please do not delete the above code

ELSEVIER

RELX™

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Remove my information/details). Please contact the publication office if you have any questions.