

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Anna Carolina Dias Munaier Lages

**AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DO METABOLISMO MINERAL ÓSSEO EM
PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE**

Belo Horizonte

2015

Anna Carolina Dias Munaier Lages

**AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DO METABOLISMO MINERAL ÓSSEO EM
PACIENTES COM Distrofia Muscular de Duchenne**

Versão final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Minas Gerais (UFMG), como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Goretti Moreira
Guimarães Penido

Coorientador: Profa. Dra. Juliana Gurgel
Gianetti

Belo Horizonte

2015

L174a Lages, Anna Carolina Dias Munaier.
Avaliação dos marcadores do metabolismo mineral ósseo em pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne [manuscrito]. / Anna Carolina Dias Munaier Lages. -- Belo Horizonte: 2015.
154f.: il.
Orientador: Maria Goretti Moreira Guimarães Penido.
Coorientador: Juliana Gurgel Gianetti.
Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Distrofia Muscular de Duchenne. 2. Hormônio Paratireóideo. 3. Vitamina D. 4. Densidade Óssea. 5. Cálcio. 6. Fósforo. 7. Ácido Cítrico. 8. Glucocorticoides. 9. Dissertações Acadêmicas. I. Penido, Maria Goretti Moreira Guimarães. II. Gianetti, Juliana Gurgel. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WS 270



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

UFMG

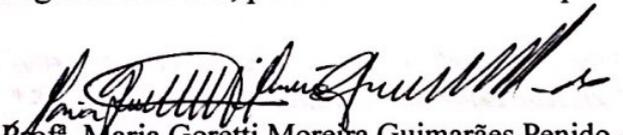
FOLHA DE APROVAÇÃO

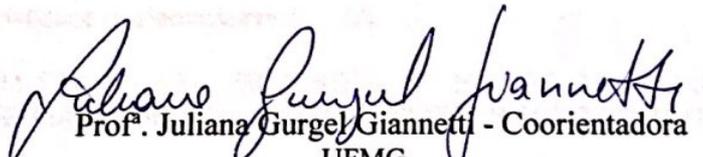
**AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DO METABOLISMO MINERAL ÓSSEO EM
PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE**

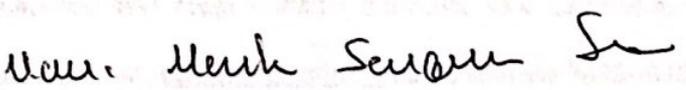
ANNA CAROLINA DIAS MUNAIER LAGES

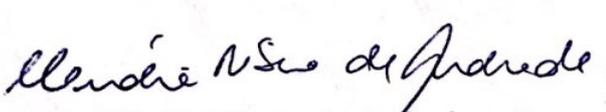
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração Ciências da Saúde.

Aprovada em 26 de agosto de 2015, pela banca constituída pelos membros:


Prof.^a Maria Goretti Moreira Guimarães Penido - Orientadora
UFMG


Prof.^a Juliana Gurgel Giannetti - Coorientadora
UFMG


Prof.^a Maria Marta Sarquis Soares
UFMG


Prof.^a Cláudia Ribeiro de Andrade
UFMG

Belo Horizonte, 26 de agosto de 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Jaime Arturo Ramirez

Vice-Reitora: Prof^a. Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-reitor da Pós-Graduação: Prof. Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

Pró-reitor de Pesquisa: Prof^a. Adelina Martha dos Reis

Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Vice-diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Humberto José Alves

Coordenadora do Centro de Pós-Graduação: Prof^a. Sandhi Maria Barreto

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação: Prof^a. Ana Cristina Cortes

Chefe do Departamento de Pediatria: Prof^a. Cláudia Regina Lindgren Alves

**Coordenador do Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde –
Saúde da Criança e do Adolescente:** Prof. Eduardo Araújo Oliveira

**Sub-coordenador do Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde –
Saúde da Criança e do Adolescente:** Prof. Jorge Andrade Pinto

**Membros Titulares do Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde –
Saúde da Criança e do Adolescente**

Ana Cristina Simões e Silva

Eduardo Araújo de Oliveira

Alexandre Rodrigues Ferreira

Jorge Andrade Pinto

Juliana Gurgel Gianetti

Maria Cândida Ferrarez Bouzada Viana Sérgio Veloso Brant Pinheiro

Roberta Maia de Casto Romanelli

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que direta ou indiretamente auxiliaram no desenvolvimento desta dissertação de mestrado.

À Deus por me guiar em cada passo, abençoando e estando presente em todos os dias da minha vida.

À Prof^a Maria Goretti Moreira Guimarães Penido, por todo ensinamento, incentivo e exemplo.
À Prof^a. Juliana Gurgel Gianetti, pela compreensão e apoio.

À equipe do Ambulatório São Vicente do Hospital das Clínicas da UFMG, em especial à Gicele Chagas, pela paciência e carinho sempre.

À equipe do Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica da Faculdade de Medicina, em especial à Profa Ana Cristina e à Érica.

À equipe do Laboratório do HC-UFMG, em especial, à equipe da coleta. Às crianças e seus pais que carinhosamente participaram na pesquisa.

Aos colegas de pós-graduação, pelos incentivos na hora certa.

À minha família por toda a compreensão e por me ajudarem a realizar um sonho.

“E eu vos repito ser a vida escuridão, exceto quando há um impulso.

E todo impulso é cego, exceto quando há saber.

E todo saber é vão, exceto quando há trabalho.

E todo trabalho é vazio, exceto quando há amor...”

Khalil Gibran

NOTA EXPLICATIVA

A presente dissertação foi organizada sob a forma de artigos, de acordo com a resolução 03/2010 de 05/02/2010 do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Área de concentração Saúde da Criança e do Adolescente, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (disponível em: http://ftp.medicina.ufmg.br/cpg/programas/saude_crianca/arquivos%202013/resolucao03_2010_regulamenta_formato_de_teses_e_dissertacoes.pdf).

O primeiro artigo consiste em uma revisão da literatura sobre o metabolismo ósseo em crianças e adolescentes portadores de Distrofia Muscular de Duchenne (DMD). O objetivo foi sumarizar e discutir os achados relevantes da literatura até o momento. As possíveis influências do tratamento na massa óssea e os métodos de avaliação também foram revisados. O segundo artigo teve como objetivo avaliar os marcadores do metabolismo ósseo de crianças e adolescentes portadores de DMD por meio de análise sanguínea, análise urinária e densitometria óssea (DXA), comparando-os com indivíduos saudáveis da mesma faixa etária.

As referências bibliográficas estão dispostas ao final de cada artigo e seção. Para as citações do texto foi utilizado o sistema denominado Vancouver, elaborado por um grupo de editores das principais publicações biomédicas internacionais da cidade de Vancouver, no Canadá, em 1979 e atualizado em 2004 (*Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication* – www.ICMJE.org).

RESUMO

Introdução: A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é a forma mais comum e severa de distrofia muscular na infância. Ela é uma doença progressiva, causada por mutações no gene da distrofina, culminando em fraqueza muscular progressiva. Apesar do rápido avanço na genética, essa doença ainda não possui cura. Os glicocorticoides (GC) são o pilar do tratamento, e, embora tenham ação benéfica, agem suprimindo a formação óssea. A saúde do osso é parte importante do cuidado destes pacientes e a redução da densidade mineral óssea (DMO) associada ao aumento do risco de fraturas é a evidência mais forte para a qualidade óssea degradada. **Objetivos:** Avaliar os marcadores do metabolismo mineral ósseo em crianças e adolescentes com DMD, por meio de marcadores bioquímicos de formação e reabsorção óssea e avaliar a massa óssea pela densitometria óssea. **Metodologia:** Foram avaliadas 29 crianças e adolescentes com DMD em acompanhamento na Unidade de Neurologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFMG e 13 crianças e adolescentes hígdas, que constituíram o grupo controle. A análise laboratorial incluiu dosagem de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina, uréia, creatinina, 25OH vitamina D e paratormônio (PTH) no sangue, e coleta de amostra de urina de 24 horas para dosagem de cálcio, citrato, fosfato e creatinina. Para a análise estatística pacientes e controles foram pareados por idade e os pacientes foram divididos em subgrupos: cadeirantes e não cadeirantes e usuários e não usuários de corticoides. **Resultados:** Entre cadeirantes e não cadeirantes foi observada diferença significativa para idade, peso, estatura e presença de escoliose. A presença da escoliose foi observada em 48,3% e a história de fratura de ossos longos em 27,6%. Foram observados níveis séricos baixos de 25OH vitamina D, de creatinina, fosfatase alcalina sérica e da excreção de creatinina e citrato urinários, quando comparou-se pacientes e controles. Observou-se níveis séricos maiores de fósforo e da reabsorção tubular de fosfato (TP de fosfato) que aquele dos controles. Entre cadeirantes e não cadeirantes houve diferença significativa para a creatinúria (mg/Kg/dia) e TP de fosfato, menores no grupo de cadeirantes, e para o PTH, com níveis maiores nos cadeirantes. Entre os usuários e não usuários de corticoides apenas o PTH foi significativo, menor no grupo dos usuários. Os pacientes do estudo apresentaram um escore-Z da DMOa da coluna lombar (CL) reduzido em relação aos controles e não foi observada diferença significativa entre os subgrupos. Foi observada correlação negativa entre a DMOa da CL e a citratúria mg/g creatinina em usuários de corticoide, entre a CMO da CL e fósforo sérico no grupo DMD e entre a CMO da CL e a citratúria mg/g creatinina no grupo que usou corticoide. **Conclusões:** Os pacientes com DMD apresentaram diferenças significativas clínicas e laboratoriais e uma redução global da DMO, comparados com controles saudáveis. Não houve diferença significativa entre o grupo com história de uso de GC e aquele sem história. Houve correlações negativas significativas entre os sítios ósseos avaliados e a excreção urinária de citrato e de creatinina, que sugerem envolvimento dessa molécula na saúde óssea desses pacientes.

Palavras-chave: Distrofia muscular de Duchenne. Hormônio Paratireoidiano. Vitamina D. Cálcio. Fósforo. Citrato. Densidade mineral óssea. Glicocorticoides.

ABSTRACT

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is the most common and severe form of childhood muscular dystrophy. It is a progressive disease, caused by mutations in the dystrophin gene, culminating in progressive muscle weakness. Despite the rapid advance in genetics, this disease has no cure yet. Glucocorticoids (CG) are the mainstay of treatment and, although beneficial, act by suppressing bone formation. Bone health is an important part of the care of these patients and the reduction in bone mineral density (BMD) associated with increased fracture risk is the strongest evidence for degraded bone quality. Objectives: To evaluate bone mineral metabolism markers in children and adolescents with DMD by means of biochemical markers of bone formation and resorption and to evaluate bone mass by bone densitometry. Methodology: Twenty-nine children and adolescents with DMD were followed-up at the Pediatric Neurology Unit of the Hospital das Clínicas of UFMG and 13 healthy children and adolescents, which constituted the control group. Laboratory analysis included blood calcium, phosphorus, alkaline phosphatase, urea, creatinine, 25OH vitamin D and parathyroid hormone (PTH) measurements, and 24-hour urine collection for calcium, citrate, phosphate, and creatinine measurements. For statistical analysis patients and controls were matched for age and patients were divided into subgroups: wheelchair users and non-wheelchair users and users and non-users of corticosteroids. Results: Between wheelchair and non-wheelchair users a significant difference was observed for age, weight, height and presence of scoliosis. The presence of scoliosis was observed in 48.3% and the history of long bone fracture in 27.6%. Low serum levels of 25OH vitamin D, creatinine, serum alkaline phosphatase and urinary creatinine and citrate excretion were observed when patients and controls were compared. Higher serum phosphorus and phosphate tubular reabsorption (phosphate TP) levels were observed than controls. Between wheelchair and non-wheelchair users there was a significant difference for creatinuria (mg / kg / day) and phosphate TP, lower in the wheelchair group, and for PTH, with higher levels in the wheelchair. Among users and non-users of corticosteroids only PTH was significant, lower in the group of users. The study patients had a reduced lumbar spine BMD (CL) z-score compared to controls and no significant difference was observed between the subgroups. Negative correlation was observed between CL BMD a and creatinine citraturia mg / g in corticosteroid users, between CL BMC and serum phosphorus in the DMD group and between CL BMC and creatinine citraturia mg / g in the corticosteroid group. Conclusions: Patients with DMD had significant clinical and laboratory differences and an overall reduction in BMD compared with healthy controls. There was no significant difference between the group with history of CG use and the one without history. There were significant negative correlations between the evaluated bone sites and urinary citrate and creatinine excretion, which suggest involvement of this molecule in the bone health of these patients.

Keywords: Duchenne muscular dystrophy. Parathyroid Hormone. Vitamin D. Calcium. Phosphorus. Citrate. Bone Mineral Density. Glucocorticoids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO 1

Quadro 1 – Resumo dos achados na literatura sobre DMO em pacientes com DMD	39
Figura 1 – Remodelamento Ósseo	47
Quadro 2 - Principais marcadores de formação e reabsorção óssea	52

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO 2

QUADROS

Quadro 1 - Valores de referência dos parâmetros laboratoriais séricos avaliados de acordo com a faixa etária estudada

Quadro 2 - Valores de referência dos parâmetros laboratoriais urinários avaliados de acordo com a faixa etária estudada

GRÁFICOS

Gráfico 1 - Comparação entre os parâmetros bioquímicos séricos e urinários [PTH (A), creatinúria mg/Kg/dia (B) e TP de fósforo (C)] dos grupos DMD e C

Gráfico 2 - Comparação dos valores do escore-Z da DMOa da coluna lombar medidos pela DXA entre os grupos DMD e C.

Gráfico 3 - (a) Correlação entre os valores de DMOa CL medidos pela DXA e a citratúria mg/g creatinina. (b) Correlação entre os valores absolutos de DMOv CL medidos pela DXA e a citratúria mg/g creatinina.

LISTA DE TABELAS
ARTIGO 2

Tabela 1 - Parâmetros antropométricos entre o grupo de pacientes (DMD) e o grupo controle (C)

Tabela 2 - Características clínicas do grupo DMD

Tabela 3 - Comparação dos parâmetros antropométricos e das características clínicas entre os subgrupos DMD1 e DMD2

Tabela 4 - Comparação dos parâmetros antropométricos e das características clínicas entre os subgrupos DMD3 e DMD4

Tabela 5 - Comparação dos parâmetros bioquímicos séricos e da urina 24h entre os grupos DMD e C

Tabela 6 - Valores encontrados na análise de 25-OH vitamina D do grupo DMD

Tabela 7 - Comparação dos parâmetros laboratoriais séricos e da urina 24h entre os subgrupos DMD1 e DMD2

Tabela 8 - Comparação dos parâmetros bioquímicos séricos e da urina 24h entre os subgrupos com DMD3 e DMD4

Tabela 9 - Comparação dos parâmetros densitométricos entre os grupos DMD e C

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Área CL	Área de coluna lombar
BTT	<i>Bone transmission time</i> (tempo de transmissão óssea)
BUA	<i>Broadband ultrasound attenuation</i> (atenuação da onda sonora)
CL	Coluna lombar
CMO	Conteúdo mineral ósseo
CMO CL	Conteúdo mineral ósseo de coluna lombar
CMO CT	Conteúdo mineral ósseo de corpo total
CMO CT _{sc}	Conteúdo mineral ósseo de corpo total sem a cabeça
COEP	Comitê de ética em pesquisa
CT	Corpo total
CT _{sc}	Corpo total sem a cabeça
Curva ROC	<i>Receiver operating characteristic curve</i>
DMD	Distrofia Muscular de Duchenne
DMO	Densidade mineral óssea
DMO _a	Densidade mineral óssea areal
DMO _v	Densidade mineral óssea volumétrica
DMO _v CL	Densidade mineral óssea volumétrica estimada da coluna lombar
DXA	Absorciometria por duplo feixe de raios – X ou densitometria óssea
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FA	Fosfatase alcalina
FGF-23	Fator de crescimento de fibroblastos- 23
HC-UFGM	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais
IGF-1	Fator de crescimento insulina-símile tipo 1
IMC	Índice de massa corporal
ISCD	International Society for Clinical Densitometry
MMCT	Massa magra corporal total

OMS	Organização mundial da saúde
OPG	Osteoprotegerina
OPN	Osteopontina
PMO	Pico de massa óssea
PTH	Paratormônio
RANK	Receptor ativador nuclear kappa beta
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido

SUMÁRIO

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	15
1.2 Referências Bibliográficas	18
2. ARTIGO 1: Distrofia Muscular de Duchenne e suas Alterações Osteo Metabólicas (Artigo de Revisão)	21
2.1 INTRODUÇÃO	23
2.1.1 Manifestações Clínicas	24
2.1.2 Diagnóstico	26
2.1.3 Tratamentos e seus Efeitos Colaterais	28
2.2 METABOLISMO MINERAL ÓSSEO	37
2.2.1 Saúde do Osso	40
2.2.2 Remodelação Óssea	41
2.2.3 Qualidade da Massa Óssea	43
2.2.4 Marcadores Bioquímicos do Metabolismo Mineral Ósseo	45
2.2.4.1 Fosfatase Alcalina	47
2.2.4.2 Cálcio e Fósforo	48
2.2.4.3 Vitamina D	49
2.2.4.4 Paratormônio	51
2.2.4.5 Marcadores Urinários	52
2.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
2.4 Referências Bibliográficas	55
3. OBJETIVOS	65
3.1 Objetivo Geral	65
3.2 Objetivos Específicos	65
4. PACIENTES E MÉTODOS	66
4.1 DESENHO DO ESTUDO	66
4.2 PACIENTES	66
4.2.1 Critérios de Inclusão	66
4.2.2 Critérios de Exclusão	66
4.2.3 Controles	67
4.2.3 Grupos e Sub Grupos	67
4.3 MÉTODOS	67
4.3.1 Protocolo do Estudo	67
4.2.3.1 Avaliação Clínica e Antropométrica	68
4.2.3.2 Coleta e Processamento das Amostras	69
4.2.3.3 Avaliação da Massa Óssea	70
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	71
4.5 ASPECTOS ÉTICOS	73
4.6 Referências Bibliográficas	73
5. ARTIGO 2: AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DO METABOLISMO MINERAL ÓSSEO EM PACIENTES COM Distrofia Muscular de Duchenne	76

5.1 INTRODUÇÃO	78
5.2 PACIENTES E MÉTODOS	80
5.2.1 Desenho do Estudo	80
5.2.2 Pacientes	80
5.2.3 Controles	81
5.2.4 Protocolo do Estudo	81
5.2.4.1 Avaliação Clínica e Antropométrica	82
5.2.4.2 Coleta e Processamento das Amostras	83
5.2.4.3 Avaliação da Massa Óssea	83
5.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	85
5.2.6 ASPECTOS ÉTICOS	86
5.3 RESULTADOS	86
5.3.1 Avaliação Clínica e Antropométrica	86
5.3.2 Avaliação Bioquímica	89
5.3.3 Avaliação Densitométrica	92
5.3.4 Correlações	93
5.4 DISCUSSÃO	94
5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	95
5.6 Referências Bibliográficas	106
6 ANEXOS	115
6.1 Protocolo para Avaliação dos Marcadores do metabolismo Mineral Ósseo em Crianças com Distrofia Muscular de Duchenne	115
6.2 Termos de Consentimento Livre e Esclarecido	117
6.3 Lista de Ilustrações – Artigo 1:	138
6.4 Lista de Ilustrações – Artigo 2:	142
6.4.1 Lista de Quadros	142
6.4 Lista de Gráficos	143
6.5 Lista de tabelas – Artigo 2:	145
6.6 Parecer Consubstanciado do CEP	151

1- CONSIDERAÇÕES INICIAIS

As doenças neuromusculares são um grupo de doenças decorrentes do acometimento primário da unidade motora, composta pelo motoneurônio medular, raiz nervosa, nervo periférico, junção mioneural e músculo. Nas crianças a maior parte destas afecções é geneticamente determinada, sendo as doenças neuromusculares adquiridas bem mais raras do que em adultos (1).

Estima-se uma prevalência de uma em cada 3000 pessoas com doença neuromuscular, que geralmente acomete progressivamente a parte motora, com preservação intelectual (2,3). Atualmente, ainda não é possível obter cura dessas enfermidades, porém o avanço diagnóstico possibilita detectar doenças pré-clínicas, identificar portadores e fazer diagnóstico pré-natal. Portanto, a possibilidade de tratamento de cura num futuro próximo torna-se uma realidade (1).

A distrofia muscular de Duchenne, também conhecida como distrofia muscular pseudo-hipertrófica, é uma das mais prevalentes e graves incapacidades entre as miopatias infantis, afetando um em cada 3.000 a 6.000 meninos nascidos vivos. É uma doença genética progressiva, que possui herança recessiva ligada ao cromossomo X. Portanto, afeta a metade dos membros masculinos da família, e a metade dos membros do sexo feminino são portadores assintomáticos (1,3-5). Em um terço dos casos o paciente pode apresentar uma mutação nova e, conseqüentemente, sua mãe não seria uma portadora. O gene anormal localiza-se no braço curto do cromossomo X, locus Xp21, sub banda Xp212. Em condições normais o gene é o responsável pela produção de uma proteína chamada distrofina, localizada no sarcolema das fibras musculares. No músculo esquelético, a distrofina, junto a várias outras glicoproteínas, forma um complexo que atua na estabilidade da fibra muscular (4-6). A deficiência da expressão da distrofina afeta a formação deste complexo glicoproteína-distrofina, favorecendo a necrose da fibra muscular, o que é considerado o gatilho para o estado inflamatório do músculo esquelético nestes pacientes (4-7).

A DMD caracteriza-se por apresentar um período pré-clínico, iniciando os sinais clínicos entre três e cinco anos de idade, geralmente associados ao atraso dos marcos de desenvolvimento motor (1,8). A fraqueza muscular é simétrica e acomete inicialmente extensores da coxa e da coluna. Com a progressão da doença, há

comprometimento da musculatura dos membros superiores inicialmente proximais e depois dos grupos distais (1,3).

A fraqueza muscular torna-se evidente por volta dos cinco anos de idade, quando as crianças apresentam sintomas iniciais, tais como dificuldade de deambular, pular e correr, além de quedas frequentes (2,4,5). A força muscular, tanto extensora do joelho quanto do quadril, não é suficiente para permitir a extensão voluntária do tronco quando o paciente levanta-se do solo, desencadeando o sinal de Gowers. Nesta manobra observa-se a dificuldade da criança em se levantar do chão, confirmando a fraqueza muscular proximal. A criança geralmente usa como alternativa a “escalada”, onde estabiliza suas pernas com os braços e vai se “escalando” até ficar de pé (3,4,9,10).

À medida que a doença evolui a fraqueza dos músculos glúteo médio e mínimo resulta em inclinação da pelve quando a criança se mantém em bipedestação. Com a progressão da doença essa inclinação fica ainda mais perturbada, assumindo um aspecto típico devido ao excesso de movimento em cintura pélvica, a denominada marcha miopática ou anserina (1,2,4,9). Outros sintomas iniciais comumente encontrados são a marcha na ponta dos pés, desorganização e aumento no tamanho de vários grupos musculares, como por exemplo, os gastrocnêmios, músculos infra-espinhais e deltóide, apresentando uma consistência firme quando palpados (3,4,9).

A perda da capacidade de deambulação ocorre em torno de doze anos de idade e a dinâmica respiratória estará alterada mais tardiamente, pelo comprometimento dos músculos intercostais. À medida que a musculatura respiratória se atrofia, a tosse se torna não efetiva e as infecções são mais frequentes, muitas vezes levando o paciente à morte precoce. Ainda, há envolvimento da musculatura cardíaca em 70% dos casos, e problemas ortopédicos, que surgem em fase mais avançada da doença (4,9,11,12).

A suspeita diagnóstica da DMD ocorre em casos de história familiar associada a um dos seguintes fatores: achados clínicos de fraqueza muscular em criança do sexo masculino, aumento sérico de CPK, e aumento sérico inexplicável de transaminases. O diagnóstico pode ser confirmado através de biópsia muscular, evidenciando a ausência da proteína distrofina, e pelo estudo molecular do gene da distrofina, que pode revelar deleções e duplicações (1,3–5,9,13).

A doença ainda não possui cura e com o rápido avanço no conhecimento sobre

genética na DMD novos tratamentos para correção do defeito genético vem surgindo e começam a ser disponibilizados aos pacientes (oligonucleotídeos antissense, PTC124). Os objetivos do tratamento são reduzir as incapacidades, prevenir complicações, prolongar a mobilidade e melhorar a qualidade de vida (1,3,11,14). Consistente com essas observações, os glicocorticoides, como a prednisona e deflazacorte, são utilizados com o objetivo de atrasar a perda da força muscular e a perda da capacidade respiratória (1,9,15,16). Estudos observaram a melhora da força muscular após dois a quatro meses de terapia com esteroides, com melhora da deambulação por pelo menos dois anos (17– 19).

Mais recentemente, a abordagem ortopédica mostrou-se fundamental na correção da escoliose, que é progressiva e traz repercussões pulmonares (5,9,11). Métodos não-invasivos de ventilação mecânica são hoje abordagens paliativas importantes na qualidade de vida destes pacientes (11–13).

O envolvimento do sistema esquelético na DMD é muito comum. A perda óssea é caracterizada por redução da massa óssea e deterioração na microarquitetura do tecido ósseo, aumentando a fragilidade dos ossos e a probabilidade de fraturas. A redução da densidade mineral óssea é observada em muitos pacientes, e mais de um terço destes são acometidos por fraturas patológicas em ossos longos e vértebras. As fraturas têm um impacto significativo na mobilidade e qualidade de vida dos pacientes, mas o mecanismo envolvido na dinâmica óssea ainda é incerto (15,20,21). Dados na literatura são escassos, porém sabe-se que há uma redução da densidade mineral óssea na DMD, independente da terapia com glicocorticoide (6,17,22,23).

Para monitorizar o grau de perda óssea é importante a avaliação de marcadores do metabolismo mineral ósseo como os níveis séricos de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina, 25OH vitamina D, paratormônio (PTH); e os níveis urinários de cálcio, citrato, fosfato e creatinina. A densitometria óssea é utilizada como coadjuvante para avaliar a qualidade do osso e sua densidade mineral óssea (4,7,16,18,24). De acordo com as recomendações da Sociedade Internacional de Densitometria Óssea, o sítio utilizado é a coluna lombar entre as vértebras L1 – L4, com correção para a idade, ou seja, o escore- Z (25).

Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado a participação de citocinas, em particular o TNF- α , a IL-1 e a IL-6, no processo de reabsorção óssea nos pacientes

com DMD (6,21,26–28). As alterações ósseas são secundárias não apenas à falência da tração muscular, mas também ao marcante desequilíbrio da atividade entre osteoblastos e osteoclastos, causado pela circulação e produção local de citocinas (18,20,24).

O fator de crescimento fibroblástico 23 (FGF-23) tem participação especial no metabolismo mineral e tem sido indicado como um marcador muito precoce de doença mineral óssea. Sua alteração sanguínea é muito anterior àquela dos habituais marcadores de lesão óssea, facilitando identificar o início da reabsorção óssea muito precocemente. A relação entre os valores do FGF-23 circulante e a doença óssea da DMD são ainda desconhecidas (5,20,21,29).

Nesse escopo, o presente estudo teve como objetivos avaliar os marcadores “tradicionais” do metabolismo mineral ósseo de crianças e adolescentes com DMD.

1.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Reed U. Doenças neuromusculares. *J Pediatr.* 2002; 78:89–103.
2. Caromano F. Características do portador de distrofia muscular de Duchene (DMD): revisão. *Arq ciências saúde UNIPAR.* 1999; 3(3):211–8.
3. Santos NM. Perfil clínico e funcional dos pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne assistidos na Associação Brasileira de Distrofia Muscular (ABDIM). *Revista Neurociências* 2006; 56:15–22.
4. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.* 2010; 9(1):77–93.
5. Bushby K, Finkel R, Birnkrant D. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. *Lancet Neurol.* 2010;9(2):177–89.
6. Rufo A, Del Fattore A, Capulli M, Carvello F, De Pasquale L, Ferrari S, et al. Mechanisms inducing low bone density in Duchenne muscular dystrophy in mice and humans. *J Bone Miner Res.* 2011;26(8):1891–903.
7. Söderpalm a C, Magnusson P, Ahlander a C, Karlsson J, Kroksmark a K, Tulinius M, et al. Bone markers and bone mineral density in Duchenne muscular dystrophy. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2008;8(1):24.
8. Fenton-May J, Bradley DM, Sibert JR, Smith R, Parsons EP, Harper PS, et al.

- Screening for Duchenne muscular dystrophy. *Arch Dis Child*.1994;70(6):551–2.
9. Manzur a Y, Kinali M, Muntoni F. Update on the management of Duchenne muscular dystrophy. *Arch Dis Child*. 2008;93(11):986–90.
 10. Biggar WD. Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Rev*. 2006;27(3):83–8.
 11. Simon V, Resende M. Duchenne muscular dystrophy: Quality of life among 95 patients evaluated using the Life Satisfaction Index for Adolescents. *Arq neuropsiquiatr*.2011;69(1):19–22.
 12. Rosa Güell M, Avendano M, Fraser J, Goldstein R. Alteraciones pulmonares y no pulmonares en la distrofia muscular de Duchenne. *Arch Bronconeumol* 2007;43(10):557–61.
 13. Ciafaloni E, Fox DJ, Pandya S, Westfield CP, Puzhankara S, Romitti PA, et al. Delayed diagnosis in duchenne muscular dystrophy: data from the Muscular Dystrophy Surveillance, Tracking, and Research Network (MD STARnet). *J Pediatr*. 2009; 155(3):380–5.
 14. Bushby K, Bourke J, Bullock R, Eagle M, Gibson M, Quinby J. The multidisciplinary management of Duchenne muscular dystrophy. *Curr Paediatr*. 2005;15(4):292–300.
 15. Bianchi ML, Mazzanti a, Galbiati E, Saraifoger S, Dubini a, Cornelio F, et al. Bone mineral density and bone metabolism in Duchenne muscular dystrophy. *Osteoporos Int*. 2003; 14(9):761–7.
 16. Biggar W, Bachrach L. Bone health in Duchenne muscular dystrophy: a workshop report from the meeting in Cincinnati, Ohio, July 8, 2004. *Neuromuscul Disord*. 2005; 15:80–5.
 17. Angelini C. The role of corticosteroids in muscular dystrophy: a critical appraisal. *Muscle Nerve*. 2007; 36(4):424–35.
 18. Joyce NC, Hache LP, Clemens PR. Bone health and associated metabolic complications in neuromuscular diseases. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2012; 23(4):773–99.
 19. Connolly AM, Schierbecker J, Renna R, Florence J. High dose weekly oral prednisone improves strength in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 2002; 12(10):917–25.
 20. Bianchi ML, Morandi L, Andreucci E, Vai S, Frasunkiewicz J, Cottafava R. Low bone density and bone metabolism alterations in Duchenne muscular dystrophy: response to calcium and vitamin D treatment. *Osteoporos Int*. 2011; 22(2):529– 39.

21. Morgenroth VH, Hache LP, Clemens PR. Insights into bone health in Duchenne muscular dystrophy. *Bonekey Rep.* 2012;1:9. doi: 10.1038/bonekey.2012.5. eCollection 2012
22. Angelini C, Peterle E. Old and new therapeutic developments in steroid treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol.* 2012; 31(1):9–15.
23. Bachrach L. Taking steps towards reducing osteoporosis in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 2005; 15:86–7.
24. Crabtree NJ, Roper H, McMurchie H, Shaw NJ. Regional changes in bone area and bone mineral content in boys with duchenne muscular dystrophy receiving corticosteroid therapy. *J Pediatr.* 2010; 156(3):450–5.
25. Crabtree NJ, Arabi A, Bachrach LK, Fewtrell M, El-Hajj Fuleihan G, Kecskemethy HH, et al. Dual-energy X-ray absorptiometry interpretation and reporting in children and adolescents: the revised 2013 ISCD Pediatric Official Positions. *J Clin Densitom.* 2014; 17(2):225–42.
26. De Paepe B, De Bleecker JL. Cytokines and chemokines as regulators of skeletal muscle inflammation: presenting the case of Duchenne muscular dystrophy. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013:1-10.
27. Lebel D, Corston J, McAdam L. Glucocorticoid treatment for the prevention of scoliosis in children with Duchenne muscular dystrophy: long-term follow-up. *J Bone Joint Surg Am.* 2013; 95:1057-61
28. Lovering R, Porter N, Bloch R. The muscular dystrophies: from genes to therapies. *Phys Ther.* 2005; 85:1372–88.
29. Söderpalm A, Magnusson P. Low bone mineral density and decreased bone turnover in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 2007; 17:919–28.

2- ARTIGO 1: ARTIGO DE REVISÃO

DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E SUAS ALTERAÇÕES OSTEO METABÓLICAS

RESUMO

Poucos estudos avaliando a densidade mineral óssea (DMO) e o metabolismo mineral ósseo nos pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) foram relatados até o momento. O presente estudo é uma revisão bibliográfica não sistemática, cujo objetivo foi rever a literatura referente à DMD e suas alterações osteo-metabólicas. Foram utilizadas as bases de dados PubMed/MEDLINE e LILACS, com as palavras-chave distrofia muscular de Duchenne, hormônio paratireoideiano, fósforo, cálcio, 25OH vitamina D, densidade mineral óssea, biomarcadores e citocinas. A DMD é a forma mais comum e severa de distrofia muscular na infância. Ela é uma doença progressiva, ligada ao cromossomo X, causada por mutações no gene da distrofina que levam à ausência de expressão dessa proteína no tecido muscular, culminando em fraqueza muscular progressiva, com preservação das habilidades cognitivas. Apesar do rápido avanço atual no conhecimento sobre genética, essa doença ainda não possui cura. Os glicocorticoides (GC) são o pilar do tratamento para a DMD, e são oferecidos para os meninos que deambulam e que já não estão ganhando habilidades motoras, ou cujas habilidades motoras estão em declínio. Seu mecanismo de ação ainda não está claro e, embora os GC tenham ação benéfica no músculo retardando a perda da força muscular, eles também agem suprimindo a formação óssea devido ao aumento da apoptose osteoblástica e aumentam a reabsorção óssea devido ao aumento da osteoclastogênese. Ainda é controverso se a própria DMD afeta diretamente a massa óssea e quais as outras possíveis causas, mas é certo que a perda óssea e o aumento do risco de fraturas são alguns dos efeitos colaterais indesejados do tratamento com GC em longo prazo. A saúde do osso é parte importante do cuidado de pacientes com DMD e a redução da DMO associada ao aumento do risco de fraturas é a evidência mais forte para a qualidade óssea degradada, nestes pacientes. A manutenção de um estado nutricional apropriado é fundamental para o desenvolvimento do esqueleto e da saúde óssea e marcadores bioquímicos e exames de imagem podem ser utilizados para monitorização e controle do metabolismo ósseo, predizendo precocemente o risco de fraturas. Uma abordagem preventiva é imprescindível para garantir o crescimento saudável do esqueleto e intervenções que aumentem a formação óssea devem ser consideradas.

Palavras-chave: Distrofia Muscular de Duchenne. Hormônio Paratireoideiano, Fósforo. Cálcio. 25OH vitamina D. Densidade Mineral Óssea. Biomarcadores e citocinas.

DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY AND ITS OSTEO METABOLIC ALTERATIONS (REVIEW ARTICLE)

ABSTRACT

Few studies evaluating bone mineral density (BMD) and bone mineral metabolism in patients with Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) have been reported to date. This study is a non-systematic literature review, whose objective was to review the literature concerning DMD and their osteo-metabolic changes. We used the bases of PubMed / MEDLINE and LILACS data, keywords Duchenne Muscular Dystrophy, parathyroid hormone, phosphorus, calcium, 25 OH Vitamin D, BMD, and cytokine biomarkers. DMD is the most common and severe form of muscular dystrophy in childhood. It is a progressive disease, X-linked, caused by mutations in the dystrophin gene that lead to the absence of expression of this protein in muscle tissue, resulting in progressive muscle weakness with preservation of cognitive abilities. Despite the rapid advancement in current knowledge of genetics, this disease does not have any cure. Glucocorticoids (GC) are the mainstay of treatment for DMD, and are offered for boys who roam and are no longer gaining motor skills, or whose motor skills are declining. Its mechanism of action is unclear and although the GC have a beneficial effect in slowing muscle loss of muscle strength, they also act suppressing bone formation due to increased osteoblast apoptosis and increase bone resorption due to increased osteoclastogenesis. It is still controversial whether the very DMD directly affects bone mass and what other possible causes, but it is certain that bone loss and increased risk of fractures are some of the unwanted side effects of treatment with GC long-term. The bone health is an important part of the care of patients with DMD and BMD reduction associated with an increased risk of fractures is the strongest evidence for the degraded bone quality in these patients. Maintaining an appropriate nutritional status is essential for skeletal development and bone health and biochemical markers and imaging can be used for monitoring and control of bone metabolism, early predicting the risk of fractures. A preventive approach is essential to ensure the healthy growth of the skeleton and interventions that increase bone formation should be considered.

Keywords: Duchenne Muscular Dystrophy. Parathyroid Hormone. Phosphorus. Calcium. 25 OH Vitamin D. BMD. Biomarkers and cytokines.

2.1 INTRODUÇÃO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é a forma mais comum e grave de distrofia muscular na infância, que resulta em fraqueza muscular progressiva e debilitante, com incapacidade grave e morte precoce quando não tratada¹⁻⁴. É uma doença hereditária progressiva que afeta um em cada 3.000 a 6.000 nascimentos do sexo masculino, que possui herança ligada ao cromossomo X. Portanto, afeta a metade dos membros masculinos da família, e a metade dos membros do sexo feminino são portadores assintomáticos^{5,3,6,7}.

A DMD é a primeira doença genética em que o defeito foi identificado por clonagem posicional. Aproximadamente 65% dos pacientes apresenta deleções intragênicas com rearranjo genético e aproximadamente 10% têm duplicações de um ou mais éxons do gene da distrofina. Os demais pacientes apresentam mutações pontuais ou outros rearranjos genéticos menores (deleções intrônicas puras, inserções de sequências repetitivas, mutações no local de emenda). Dependendo do tipo de mutação, pode haver uma grave redução ou ausência de distrofina no músculo, o que resulta no fenótipo DMD, ou uma proteína-truncada parcialmente funcional, resultando na distrofia muscular de Becker, um quadro de distrofia mais branda^{5,2,4}.

O gene anormal localiza-se no braço curto do cromossomo X, locus Xp21, sub banda Xp212. Em condições normais o gene é o responsável pela produção de uma proteína chamada distrofina, localizada no sarcolema das fibras musculares. Sem a distrofina, a estrutura de glicoproteína do sarcolema é menos estável, levando à instabilidade da membrana. Em consequência, ocorre lesão muscular com iniciação de uma cascata inflamatória que contribui ainda mais para o dano muscular, necrose e fibrose. A fragilidade do complexo glicoproteico também altera a permeabilidade da membrana, levando a ruptura da homeostase^{5,1,8,7}. A elevação resultante dos níveis de cálcio intracelular provocam o aumento dos radicais de oxigênio pela mitocôndria, contribuindo para a perpetuação do ciclo de estresse oxidativo, dano sarcolemal e morte celular^{8,7,9}.

A ativação crônica das vias de sinalização envolvidas na resposta inflamatória e a degeneração muscular agravam a doença, alterando a histocompatibilidade do complexo glicoproteico e secretando mediadores inflamatórios, como neutrófilos, macrófagos e citocinas, o que resulta em maior lesão tecidual. Ocorre também o comprometimento do mecanismo de reparação dos miofibroblastos, levando à fibrose

e perpetuação da inflamação^{1,10,11,8,7}.

Uma contribuição significativa neste processo inflamatório envolve a ativação da via do fator nuclear kappa B (NF- κ B) pelo fator de necrose tumoral α (TNF- α). O fator nuclear kappa B induz a ativação transcricional do gene da interleucina e aumenta a produção de interleucinas. As alterações deletérias da homeostase do cálcio, o dano aos miofibroblastos pelos radicais livres de oxigênio e a falha da proliferação dos miofibroblastos contribuem para a falha de regeneração eficaz do músculo esquelético^{9,12-14}. A osteopontina (OPN) foi descrita recentemente e promove a fibrose na fibra muscular do paciente com distrofia, modulando as células imunes e o fator de crescimento fibroblástico (FGF). Estudos mostraram também que a OPN é um fator determinante da gravidade da doença nestes pacientes e que a mutação do gene promotor da OPN está associada à perda precoce da força muscular e da deambulação^{10,15}.

2.1.1 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As manifestações clínicas nos pacientes portadores de DMD normalmente começam na infância, geralmente nos três primeiros anos de vida. As alterações funcionais iniciam-se com o enfraquecimento muscular, que ocorre gradualmente e de forma ascendente, simétrica e bilateral, com início na cintura pélvica e membros inferiores. Os músculos são afetados ao nascimento, mas os sintomas clínicos de fraqueza muscular proximal geralmente se manifestam entre três e cinco anos de idade^{5,1,2}.

A apresentação comum é de atraso dos marcos do desenvolvimento, com perturbações na marcha e dificuldade em levantar do chão. A fraqueza muscular torna-se evidente por volta dos cinco anos de idade, quando as crianças apresentam sintomas iniciais, tais como dificuldade de deambular, pular e correr, além de quedas frequentes¹⁶⁻¹⁸. Ao contrário de sua fraqueza muscular que é progressiva, suas habilidades cognitivas não deterioram ao longo do tempo, e apenas 30% dos casos estão associados a deficiência mental e distúrbios de linguagem^{5,19,18}. A maneira como essas crianças levantam do chão é característica. A força muscular tanto extensora do joelho quanto do quadril não é suficiente para permitir a extensão voluntária do tronco quando o paciente levanta-se do solo, desencadeando o sinal de Gowers. Nesta manobra observa-se a dificuldade da criança em se levantar do chão, confirmando a

fraqueza muscular proximal. A criança geralmente usa como alternativa a “escalada”, onde estabiliza suas pernas com os braços e vai se “escalando” até ficar de pé^{5,16,3}.

À medida que a doença evolui, a fraqueza dos músculos glúteo médio e mínimo resultam em inclinação da pelve quando a criança se mantém em bipedestação. Para suportar melhor esta posição da pelve, a criança realiza uma compensação alargando sua base de sustentação, assumindo o aspecto típico da marcha do tipo anserina^{5,16}. A fraqueza do músculo glúteo máximo (o mais potente extensor do quadril) também induz a inclinação anterior da pelve, que é compensada com o aumento da lordose lombar. Com o encurtamento dos músculos responsáveis pela flexão dorsal dos pés, ocorre a adoção de marcha na ponta dos pés, com deslocamentos laterais do tronco^{16,1,2}. A hiperlordose lombar é a deformação mais precoce resultante da fraqueza do músculo glúteo máximo e abdominais. A pelve fica em anteversão. A fim de compensar esse desequilíbrio e se manter em pé, o indivíduo projeta o tronco para trás, aumentando ainda mais a curvatura lombar^{5,20}.

As deformidades ortopédicas são devidas a posições viciosas nas várias articulações. Tais posições levam frequentemente a retrações músculo-tendinosas, envolvendo vários grupos musculares agindo numa mesma articulação. As deformidades são progressivas, surgindo contraturas e retrações fibrotendíneas, sobretudo nas articulações do tornozelo e joelho, tornando-se evidentes em torno do sétimo e oitavo anos de vida. Nesta fase a criança torna-se incapaz de esticar o braço por completo e, ao deambular, apoia-se na ponta dos pés^{2,21,22}. Nos membros superiores, em estágios intermediários, observa-se o envolvimento do músculo peitoral maior, grande dorsal, bíceps, tríceps e braquiorradial. Tardamente, a força se mantém mais preservada nos músculos flexores do punho, inversores do pé e extensores do pescoço, mas suas ações estarão limitadas pelas extensas lesões articulares^{5,3}.

As alterações ósseas não são decorrentes da falha genética, mas decorrentes exclusivamente do desuso, incluindo a rarefação encontrada na extremidade dos ossos longos e formação de ossos chatos. Em estágios tardios ocorre a descalcificação e distorções grosseiras com a desorganização do sistema esquelético. Estas alterações tornam os ossos dos pacientes bastante susceptíveis a fraturas por pequenos traumas^{16,2,13,23}.

A progressão da perda da força muscular e das contraturas leva à perda da deambulação e ao confinamento na cadeira de rodas por volta dos 10 a 12 anos, e os

primeiros anos da adolescência são marcados pelo desenvolvimento de escoliose progressiva^{3,6,24,20}. Após a restrição no leito, o paciente apresenta rápida perda da força muscular devido à imobilidade, o que vem acarretar complicações respiratórias. A apneia obstrutiva do sono ocorre em até um terço dos pacientes e é a causa predominante de respiração desordenada durante o sono na primeira década de vida, evoluindo muitas vezes com a dependência de ventiladores na segunda década. À medida que a musculatura respiratória se atrofia, a tosse torna-se inefetiva e as infecções são mais frequentes, muitas vezes levando o paciente à morte precoce^{5,25,26,19,27}.

Ainda, há envolvimento da musculatura cardíaca em 70% dos casos, com quadros de arritmias, cardiopatia dilatada e insuficiência cardíaca congestiva, que surgem em fase mais avançada da doença^{25,2,22,27}. A enfermidade também se complica com alterações na deglutição, perda de peso, dilatação gástrica, constipação e alterações no controle vesical. Classicamente o prognóstico é ruim, com a morte ocorrendo entre 18 e 25 anos de idade, principalmente devido à insuficiência respiratória (> 80% dos casos) e insuficiência cardíaca (10-20%)^{25,26,19,21}.

2.2.2 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da DMD pode ser estabelecido, na maioria dos casos, através da história familiar, de achados clínicos, laboratoriais e genéticos, podendo ser utilizados eventualmente, exames eletrofisiológicos e histológicos^{5,1-3,19}. A suspeita diagnóstica deve ser considerada independentemente da história familiar e geralmente é desencadeada devido a: (1) a mais comum que é a observação da função muscular anormal em uma criança do sexo masculino; (2) a detecção de aumento de creatina quinase no soro testada para indicações não relacionadas; ou (3) após a descoberta de aumento de transaminases (aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase que são produzidas por músculo, assim como as células do fígado)^{16,1,2}.

A creatina quinase no soro (CK) geralmente é extremamente elevada (10-100 vezes o valor normal desde o nascimento) e deve ser a primeira investigação quando se suspeita de DMD. O valor de CK normal exclui o diagnóstico. Os níveis de CK caem com a progressão da doença, refletindo a perda da massa muscular e a redução da atividade física. Portanto CK não é um teste de triagem de confiança em crianças já usuárias de cadeiras de rodas^{1,2,19}. A eletromiografia (EMG) pode mostrar alterações

inespecíficas e não tem qualquer papel na investigação de DMD. Não deve ser solicitada de rotina^{1,3,18}.

O fluxograma para confirmação diagnóstica depende da disponibilidade local e confiabilidade dos testes, que devem ser interpretados em conjunto com a apresentação clínica, devido à gama de possíveis mutações da distrofina^{16,3}. O teste para a detecção de mutação nos pacientes com DMD são sempre necessários, mesmo que primeiro tenha sido confirmada a ausência da proteína distrofina na biópsia muscular. Os resultados do teste genético fornecem informações necessárias para o aconselhamento genético, diagnóstico pré-natal e informações para futuros tratamentos^{5,1,3,19}. Os testes genéticos comuns utilizados para identificar mutações da distrofina são o multiplex PCR, multiplex MLPA (*multiplex-ligation probe amplification*), SCAIP (*single-condition amplification/internal primer*) e o MAPH (*multiplex amplifiable probe hybridization*)^{1,2}. Mais recentemente, através de sequenciamento de nova geração, o sequenciamento completo do gene da distrofina tornou-se viável e passou a ser aplicado na prática clínica.

O PCR é amplamente disponível e tem menor custo, entretanto, não analisa todos os exons, de modo que uma mutação ou deleção pode não ser identificada. Os testes genéticos MPLA e MAPH conseguem cobrir todos os éxons e identificar as deleções e duplicações. Já o teste SCAIP cobre estes recursos e ainda apresenta as informações em sequência genética. Nenhuma destas técnicas é universalmente disponível^{1,21,22,28}. Se a análise por meio de uma ou mais destas técnicas identificar e caracterizar uma mutação da distrofina, nenhum outro teste posterior é necessário. Entretanto, se não for identificada deleção ou duplicação, o sequenciamento deve ser feito buscando mutações pontuais ou pequenas deleções¹⁻³. A caracterização completa da mutação é necessária para permitir a correta correlação com o quadro clínico, e é considerado o principal fator determinante da variação fenotípica bem como o determinante para elegibilidade dos possíveis tratamentos^{5,1,28}.

A biópsia muscular continua sendo o padrão ouro diagnóstico embora não seja mais rotina em alguns centros, sendo realizada somente nos casos onde o teste genético é negativo, ou o fenótipo clínico é atípico^{5,1,3,21}. À microscopia ótica as alterações precoces incluem fibras musculares em degeneração necróticas com invasão por macrófagos, bem como grupos de fibras musculares em regeneração de tamanho intermediário, contendo citoplasma basofílico. O aumento da variabilidade do tamanho da fibra muscular também é visto, inicialmente como maior do que o normal,

e inversão desse padrão com a progressão da doença. Em fases avançadas da doença há substituição significativa de fibras musculares por gordura e tecido conjuntivo endomisial^{2,19,18,21}.

A ausência ou diminuição importante da distrofina em biópsias musculares de meninos com DMD pode ser demonstrado em imunohistoquímica e/ou análise de Western blot, utilizando anticorpos dirigidos contra diferentes epítomos da distrofina. Geralmente, os anticorpos que reconhecem os domínios amino-terminal e carboxi-terminal da haste são os utilizados. A imunocoloração utilizando anticorpos amino-terminal ou domínio haste mostra uma coloração sarcolemal fraca em até 60% dos pacientes com DMD. A imunorreatividade para anticorpos carboxi-terminal, entretanto, está ausente na DMD, sendo útil na diferenciação entre a DMD e a Distrofia Muscular de Becker^{1,3,19,18}. A análise de Western blot permite a quantificação da quantidade de proteína distrofina bem como a avaliação do tamanho da proteína presente. Na DMD observa-se a presença de quantidade inferior a 5% do normal de distrofina quando os anticorpos carboxi-terminal são utilizados, e de até 25% dos níveis normais de distrofina com o uso de anticorpos de domínio haste^{1-3,18}. Para diagnóstico pré-natal, a análise molecular é mais segura do que a detecção imunohistoquímica de distrofina, sendo o procedimento sempre bem sucedido nos casos de deleções já identificadas em outro irmão acometido^{5,16,1}.

2.2.3 TRATAMENTO E SEUS EFEITOS COLATERAIS

Apesar do rápido avanço no conhecimento sobre genética na DMD, essa doença ainda não possui cura. Os objetivos do tratamento são reduzir as incapacidades, prevenir complicações, prolongar a mobilidade e melhorar a qualidade de vida^{3,29,19,22}. Várias estratégias de tratamento estão sendo estudadas. Elas incluem técnicas de transferência de miofibroblastos e terapia gênica, e vários medicamentos, como os corticosteroides^{1,30}. Os glicocorticoides (GC) são o pilar do tratamento para a DMD, e são oferecidos para os meninos de cinco anos de idade e mais velhos, que já não estão ganhando habilidades motoras, ou cujas habilidades motoras estão em declínio^{1,31,32}. A corticoterapia está sendo universalmente empregada para diminuir o ritmo de perda da força e função muscular, retardar de um a três anos a época do confinamento à cadeira de rodas, melhorar a função pulmonar e retardar a progressão da cifoescoliose e da miocardiopatia^{5,24,33}. Seu mecanismo de ação ainda não está claro e várias

hipóteses têm sido propostas³⁴, como ações na alteração da regulação de genes nas fibras musculares, na desaceleração da taxa de lesões musculares esqueléticas, na redução das células T citotóxicas e da concentração de cálcio intracelular, e no aumento da reparação miogênica^{31,18,30}. Foi também observado que os esteróides podem agir sobre a regulação do sinal de transdução e têm um efeito direto nuclear. No caso do Deflazacorte, o efeito benéfico no músculo tem sido associado com a ativação da via de calcineurina / NF-AT^{32,35,36}.

Estudos de transcrição por análise microarray e no nível protéico estão em curso na DMD, buscando identificar alvos genéticos e proteínas responsáveis pela resposta dos esteroides³⁷. Um efeito direto na degeneração do músculo foi observado em *Caenorhabditis elegans*³⁸, no qual a prednisona reduziu a degeneração da célula muscular em 40%. Outras hipóteses são de que os esteróides reduziram a necrose e a inflamação muscular por meio de ações nas vias alternativas da modulação da resposta inflamatória, havendo inclusive deposição de complemento nas fibras distróficas. Alternativamente, os esteróides podem aumentar a proliferação das células precursoras miogênicas ou os mioblastos, e assim, aumentar o crescimento e a regeneração do músculo devido ao seu efeito anabólico^{31,4,39}. Acredita-se que o seu efeito pode se manter por três ou mais anos, e é encarado como uma forma de “comprar tempo” para o doente à espera de uma eventual terapia eficaz. Assim, o ideal é começá-la por volta de cinco a seis anos, quando o músculo está preservado e ainda não se iniciou a fase de declínio mais rápido da força muscular^{5,1,40}. É necessária uma monitoração cuidadosa dos numerosos efeitos colaterais possíveis, mas, de um modo geral, pode-se considerar que os efeitos colaterais são de âmbito menor, e muito raramente obrigam a suspensão da droga^{30,40,41}. Os principais efeitos colaterais da terapia de glicocorticoides incluem ganho significativo de peso, baixa estatura, redução da densidade mineral óssea (DMO) e puberdade atrasada^{8,33,41,42}.

Um consenso sobre o papel dos corticosteroides em DMD está emergindo após avaliação cuidadosa das vantagens e desvantagens do tratamento em longo prazo, com base em estudos clínicos^{2,19}. Os corticosteroides devem ser oferecidos aos meninos enquanto eles ainda deambulam. Devem ser iniciados precocemente entre quatro e seis anos de idade e na maioria das crianças mais velhas ambulantes, a menos que contraindicado^{1,8,34,43}. Revisões regulares permitem adequado monitoramento, dosagem e gestão dos efeitos adversos. É importante otimizar a saúde óssea em pacientes tratados com corticosteroides, incluindo aconselhamento dietético em

relação cálcio e vitamina D, e suplementação se os níveis plasmáticos de vitamina D forem baixos^{25,4,40,41}.

Dois corticosteroides têm sido amplamente utilizados: prednisona e deflazacort, com diferentes esquemas. A dose inicial ótima de prednisolona 0,75 mg/kg/dia muitas vezes não é tolerada em longo prazo e, ao longo de anos, é necessário um ajuste cuidadoso da dose, com alguns estudos citando seu uso em dias alternados^{8,34,43}. Outros estudos foram realizados usando esteróides com um esquema intermitente por 10 dias por mês, alguns intercalando 10 dias de uso com 10 dias de folga, e outros só nos finais de semana. O esquema intermitente demonstrou benefícios nos parâmetros funcionais com menos efeitos colaterais^{44,33}. O regime com uso apenas no final de semana permitiu o crescimento linear, mas não preveniu contraturas, o que resultou na perda da deambulação com dez anos em 25% dos tratados⁴⁴. Outros regimes com baixa dose diária de prednisona (0,35 mg/kg/dia) foram realizados visando a redução da dose cumulativa de esteróide, mas não mostraram alto benefício^{32,45}.

Em 2005, a Academia Americana de Neurologia (AAN) e a Sociedade de Neurologia Infantil (CNS) definiram alguns parâmetros de manejo a partir de estudos baseados em evidência. Sete estudos de classe I e numerosos ensaios menos rigorosos demonstraram que o tratamento com corticosteróides por seis meses com prednisona (0,75 ou 1,5 mg/kg/dia) aumentou a força muscular, o desempenho e a função pulmonar, além de ter diminuído significativamente a progressão da fraqueza. Dois ensaios de classe I examinaram o efeito da menor dose de prednisona (0,30 e 0,35 mg/kg/dia), e demonstraram menores benefícios, mas com menor frequência de efeitos colaterais (por exemplo, o ganho de peso). Os únicos efeitos secundários significativos em todos os ensaios de classe I foram o ganho de peso e o desenvolvimento de uma aparência facial cushingóide^{1,25,33,40}. Um ensaio de longo prazo de prednisona dose diária (0,3 a 0,7 mg/kg/dia), estudo de classe III, apresentou prolongamento da capacidade funcional e uma progressão mais lenta de fraqueza durante três anos de tratamento (3). Um estudo classe IV, ensaio aberto de prednisona em dias alternados (2 mg/kg por dois meses, em seguida, dois terços da dose a cada dois dias) observou um prolongamento de aproximadamente dois anos na deambulação em comparação com pacientes não tratados^{18,33,40,43}. Um estudo randomizado controlado realizado com 64 meninos com DMD (idades de 4 a 10 anos) também observou a igual eficácia para a dose diária padrão de prednisona (0,75mg/Kg/dia) em relação a dose de prednisona

realizada apenas no final de semana de prednisona (10 mg/kg por semana dado ao longo de dois dias)³³. A análise de perfis de efeitos colaterais demonstrou tolerabilidade global de ambos os regimes de tratamento⁴³.

O deflazacort é um derivado de oxazolina de prednisona também utilizado no tratamento e geralmente recomendado na dose de 0,9mg/kg/dia, com uma equivalência de dosagem prevista de 1:1,3, comparativamente com prednisona. Ele pode preservar a função muscular, mas muitas vezes sem a tendência de ganho de peso excessivo encontrado na maioria dos meninos tratados com prednisona diariamente^{30,34,40}. Ele não é aprovado nos EUA pela Food and Drug Administration (FDA), mas encontra-se disponível como um produto farmacêutico licenciado no Canadá e em alguns países europeus, asiáticos e sul-americanos^{1,3}. Estudos apontados pela AAN e CNS em 2005 observaram melhorias semelhantes com o uso do deflazacort na força e na função muscular, quando comparado ao uso da prednisona. O perfil de efeitos secundários também foi semelhante, embora em alguns estudos com deflazacort tenha sido observado menor ganho de peso e maior incidência de catarata assintomática^{33,36,46}. Com base nesses estudos, alguns centros de referência têm indicado preferencialmente o deflazacort para pacientes com DMD que estão predispostos à obesidade de acordo com seu biotipo ou história familiar^{33,47,48}.

Dados clínicos disponíveis sobre o impacto do deflazacort na função cardíaca em pacientes com DMD são limitados. Em um estudo de coorte retrospectivo com 33 pacientes com DMD foi observada maior preservação da função cardíaca naqueles em uso de deflazacort do que naqueles que não receberam a medicação^{22,49}. Resultados de vários estudos não randomizados sugerem que o tratamento com corticoides para DMD reduz a progressão da cardiomiopatia e reduz a mortalidade por meio de uma redução no número de mortes relacionadas com a insuficiência cardíaca^{4,22}. Dados retrospectivos também sugerem que a terapia em longo prazo com glicocorticoides para DMD reduz o risco de escoliose e prolonga a deambulação^{24,20}. Alguns estudos, entretanto, observaram maior risco de osteoporose em ossos longos e fraturas por compressão vertebral^{50,20}.

Os benefícios e os efeitos secundários da terapia com GC devem ser monitorados para avaliação dos riscos potenciais. Testes musculares funcionais cronometrados, testes de função pulmonar e cardíacos geralmente são parâmetros úteis para avaliar os benefícios. Efeitos colaterais como o ganho de peso, aparência cushingóide, hiperglicemia, diabetes, catarata, baixa estatura, diminuição do

crescimento linear, puberdade atrasada, fraturas de ossos longos e vértebras, acne, crescimento excessivo de pelos, sintomas gastrointestinais, e mudanças de comportamento são citados^{31,30,33,42}. Para qualquer criança com DMD é essencial documentar o peso e definir claramente o ponto em que o ganho de peso torna-se um evento adverso substancial. É importante que seja realizado um acompanhamento dietético, reduzindo os alimentos de alto teor calórico e controlando o excesso de peso, que podem causar redução da mobilidade³¹.

A redução da DMO é observada em meninos com DMD, mesmo antes do uso de esteroides e está associada a um risco aumentado de fraturas dos membros. Provavelmente, isto está relacionado a baixa atividade física, embora estudos recentes tenham mostrado que as crianças com DMD podem ter níveis anormalmente baixos de vitamina D e osteoporose, mesmo no momento do diagnóstico^{51,31,52}. As fraturas vertebrais são raramente vistas em pacientes com DMD que não são tratados com esteroides e o aumento da incidência de fraturas por fragilidade vertebral não pode ser explicada exclusivamente pelo seu uso⁵³. Demonstrou-se um período de latência de 40 meses entre o início do uso do corticoide e o início do quadro de fraturas vertebrais, com uma incidência de 75% de fraturas vertebrais após 100 meses de uso da terapia⁵⁴. Uma meta-análise com mais de 80 estudos demonstrou a associação do uso da prednisolona ($\geq 5\text{mg/dia}$ de prednisolona ou de equivalente) com reduções significativas na DMO e aumento no risco de fraturas dentro de três a seis meses após o início do tratamento, e com o aumento do risco de fratura independente da idade do paciente, sexo e doença de base⁵⁵.

Foi demonstrado que os GC estimulam inicialmente a atividade osteoclástica (primeiros seis a 12 meses de terapia), seguido por diminuição na formação dos ossos, que ocorre devido à redução da atividade osteoblástica e redução da função e tempo de vida dos osteoblastos, promovendo maior nível de apoptose dos osteoblastos e osteócitos^{53,42,47}. Ações combinadas dos GC sobre a remodelação óssea podem, portanto, causar osteoporose, aumentando o risco de fraturas. Além disso, tem sido relatado que as crianças tratadas com GC via oral têm menos massa óssea⁵⁶. Nesses pacientes, observa-se desmineralização do osso trabecular e aumento da incidência de fraturas de vértebras e costelas. Em contraste, o osso cortical é poupado e fraturas apendiculares são raras. Assim, meninos com DMD têm redução da DMO, da massa muscular, maior massa gorda e maior incidência de fraturas por fragilidade do que os meninos saudáveis da mesma faixa etária. Isto é em parte devido à mobilidade reduzida,

perda de massa muscular e tratamento com corticosteróides em longo prazo^{57,56,47}. Ao contrário de pacientes com outras formas de Osteoporose Induzida pelo Uso de Glicocorticoides (GIOP), as crianças com DMD também têm anormalidades estruturais e funcionais adicionais de seu músculo. Os efeitos combinados da GIOP e progressão da DMD podem contribuir para a distorção da unidade músculo-óssea e aumentar a fragilidade óssea⁴⁷. Alguns estudos com uso de GC mostraram redução significativa no risco de escoliose sem associação com o aumento de fraturas em ossos longos, entretanto, confirmaram um maior risco de fraturas vertebrais^{24,56,53}.

Nenhuma dose segura de GC parece existir, uma vez que observou-se aumento nas fraturas vertebrais com doses baixas como 2,5 mg de prednisona por dia⁵⁸. Foram relatados como fatores associados à indução da osteoporose induzida pelos GC: a inibição da osteoprotegerina (OPG), inibição da absorção intestinal do cálcio, e a estimulação do fator-kB nuclear (RANK-L)⁵⁹. Uma das consequências clássicas do tratamento com GC é a redução do número e da função dos osteoblastos, influenciando diretamente os processos de síntese, replicação e apoptose celular. Além disso, inibem a produção de fatores de crescimento pelo osso, como o *insulin-like growth factor 1* (IGF-I) e o *transforming growth factor β* (TGF-β), que têm atividade anabólica sobre o tecido ósseo⁵⁸.

Há grande preocupação sobre a prevenção e tratamento de redução da DMO em pacientes com DMD tratados com esteroides e a prática rotineira e o tratamento de problemas relacionados com a massa óssea variam consideravelmente. Vários centros de referência orientam a suplementação de cálcio e vitamina D e outros orientam o uso de bisfosfonados (BPs). Em mãos experientes, os bisfosfonados são um bom tratamento para a fratura vertebral e para a dor óssea causada por micro fraturas em pacientes com baixa DMO. Recomenda-se ainda a promoção do exercício físico e a exposição solar^{31,39,40,59}.

Os bisfosfonados estão sendo considerados e estudados em crianças com redução da massa óssea associada ao esteroide, podendo ser usados com segurança e sem efeito negativo sobre o crescimento linear ou mineralização óssea⁶⁰. Eles são análogos endógenos dos pirofosfatos e apresentam elevada afinidade pela hidroxiapatita presente no osso. São geralmente bem tolerados, embora os efeitos adversos possam envolver todos os principais sistemas, incluindo osteonecrose da mandíbula. Seu mecanismo de ação ainda é desconhecido, mas sabe-se que atuam na estrutura do osteoclasto, bem como em sua função e viabilidade⁶¹⁻⁶³. O alendronato e

risedronato foram os primeiros BPs utilizados em GIOP e sua eficácia foi demonstrada na prevenção e tratamento da perda óssea associada com GC. Estudo realizado com alendronato oral em crianças com DMD tratadas com deflazacort confirmou a associação com a manutenção da DMO em relação aos meninos saudáveis da mesma faixa etária⁶⁰.

No contexto da distrofia muscular, existem várias maneiras pelas quais os bifosfonados podem atuar. Aqueles não aminos agem na formação de análogos não-hidrolisáveis de trifosfato de adenosina dentro dos osteoclastos e, assim, promovem a inibição das principais enzimas metabólicas envolvidas no crescimento, diferenciação e ativação celular. Em comparação, os amino bisfosfonados alteram a reabsorção óssea através da inibição da via do mevalonato, afetando assim as pequenas proteínas de sinalização (GTPases) que regulam o processo^{61,62}. Um importante efeito dos amino bisfosfonados é sua influência no metabolismo do cálcio. Na DMD, a ausência de distrofina conduz a perda da estabilização da membrana produzindo aumento da concentração de cálcio intracelular. Este aumento de cálcio intracelular causa uma contração localizada sustentada, contribuindo para a miofibrilação e ativação das proteases, tal como a calpaína, que tem sido implicada na patogênese da DMD. Assim, baixando os níveis de cálcio extracelulares, os BPs poderiam aumentar a viabilidade das células do músculo^{61,64}. Os amino bisfosfonados também podem efetuar a apoptose normal através de várias vias e também podem modificar a apoptose, inibindo a proteína quinase C e suprimindo o fator ativador de plasminogênio uPA. Por conseguinte, sua ação na DMD pode resultar na inibição da atividade celular patológica na fibrose, inibindo a viabilidade dos fibroblastos^{62,64}.

Estudo foi realizado com 44 crianças selecionadas para receber terapia de bisfosfonados por quadro de declínio da DMO e risco de fraturas. Foi observada associação notável entre a longevidade e o tratamento com a combinação dos esteroides e bisfosfonados em comparação ao tratamento com esteroides isolado. O efeito foi também associado à duração do tratamento com BPs, sendo melhor naqueles tratados por mais tempo⁶¹. Apesar dos estudos já realizados e daqueles em andamento, ainda não existe protocolo que oriente o uso profilático dos BPs orais em pacientes em uso prolongado de corticoterapia². Protocolos de tratamento padronizados devem ser desenvolvidos para confirmar os efeitos de tais agentes sobre a redução das fraturas por fragilidade^{51,50}.

Outras terapias imunossupressoras têm sido estudadas para o tratamento da DMD. A oxandrolona, um esteroide anabolizante, tem mostrado alguma promessa no aumento da força muscular quantitativa. Esta droga poderia ser útil antes de iniciar a terapia com GC porque é segura e acelera o crescimento linear. No entanto, seu efeito benéfico para retardar a progressão da fraqueza não é de magnitude suficiente para justificar seu uso rotineiro^{18,39,43}.

Ainda agentes imunossupressores como azatioprina e ciclosporina também foram estudados^{18,40}. A azatioprina não mostrou nenhum benefício. A ciclosporina A em combinação com a prednisona ou isoladamente não mostrou melhora da força muscular ou das habilidades funcionais em 77 crianças ambulantes com DMD⁶⁵. Entretanto, estudos sugeriram possível potencialização da corticoterapia com a ciclosporina A e melhoria da força muscular^{66,67}.

Há evidências de estudos controlados e aleatorizados que o tratamento com creatina aumenta a força muscular, melhora a atividade diária e é bem tolerado em pacientes com disfunção muscular e miopatias inflamatórias^{66,68}. No entanto, não foram estabelecidas recomendações para seu uso na DMD^{1,18,66}. Suplementos como a coenzima Q10, carnitina, aminoácidos (glutamina, arginina), anti inflamatórios / antioxidantes (óleo de peixes, a vitamina E, extrato de chá verde) e outros, estão sendo usados em alguns países e são endossados por alguns médicos, mas não há recomendações definidas^{1,2,18,39}.

Fowler e colaboradores relatam os resultados de um estudo pequeno com salbutamol oral no tratamento de crianças com DMD e distrofia muscular de Becker. Os pesquisadores observaram melhora da força muscular, principalmente dos músculos da coxa, após três meses de uso do salbutamol⁶⁹. Terapias gênicas e recombinantes também tem sido alvo de inúmeras pesquisas atuais. Como o código da distrofina é um mRNA com 14 kb, várias técnicas de transferência de regiões críticas do gene através de vírus recombinante (rAAV) e vetores de plasmídeo não virais estão sendo exploradas^{8,70}.

Oligonucleotídeos também podem ser utilizados com o objetivo de produzir uma distrofina parcialmente funcional. Isto é ideal para a maioria das mutações de DMD, que são deleções ou duplicações de exons. Limitações a esta forma de terapia incluem assegurar efeito benéfico sustentado e seguro do oligonucleotídeo, tal como a administração repetida ao longo da vida. Além disso, diferentes deleções exigirão diferentes oligonucleotídeos, tornando a produção difícil e dispendiosa em grande

escala^{39,70}. Alguns antibióticos aminoglicosídeos como a gentamicina também são citados como terapia por causarem alterações nas regiões de mutação. O PTC124 é uma nova droga oral que promove a leitura ribossomal, permitindo a continuação da tradução e a produção de uma proteína funcional. Foi mostrada restauração dos níveis de distrofina em ratinhos mdx com melhoria associada da função muscular e diminuição dos níveis de CK^{18,66,70}.

Mais estudos clínicos estão em andamento. A terapia com células-tronco mostrou resultados positivos nos primeiros experimentos com mioblastos transplantados. Entretanto, estudo subsequente mostrou rejeição pela resposta imune do hospedeiro. Células-tronco miogênicas com menor risco de rejeição e células tronco derivadas da medula óssea estão também em estudo. A utrofina, um homólogo da proteína da distrofina no sarcolema, também tem sido alvo de pesquisas, e seus fatores de expressão como a heregulina e a L-arginina estão sendo explorados^{1,18,40,70,71}.

A elucidação de novos biomarcadores e alvos potenciais das drogas também têm sido uma tarefa desafiadora devido ao número limitado de amostras biológicas disponíveis^{37,72}. Um biomarcador candidato para a DMD é metaloproteinase-9 da matriz de soro (MMP9), a qual está envolvida na degradação da matriz extracelular, nomeadamente colágeno IV e V. Foi observada correlação do aumento nos níveis de soro de MMP9 com a progressão da doença em pacientes com DMD³⁷. Outro estudo também evidenciou o gene regulador do SPP1 (Osteopontina) como modificador genético da severidade da doença⁷³.

Em geral, os reguladores de genes correspondem aos principais processos que ocorrem no músculo distrófico, tais como inflamação, fibrose e regeneração muscular. Entre os reguladores de genes podemos separar membros de várias cascatas de sinalização conhecidos: NFK β , sinalização de angiotensina (AGT, classe funcional do receptor de angiotensina II, quimase (CMA1)), de sinalização TGF (família TGF classe funcional, TGFB1, TGFB2, BMP 2, classe funcional SMAD, SMAD7), e sinalização interferon gamma (IFN γ , STAT1, IRF1), sugerindo que essas vias podem estar perturbadas na DMD³⁷. A constatação de que as células T infiltram o músculo do paciente com DMD também tem sido objeto de estudo. Os linfócitos T podem expressar a perforina, molécula prejudicial para a função dos linfócitos, e promover efeito deletério muscular, como ocorre na Polimiosite. As citocinas Th2 protótipos IL-

4 e IL-13 são potentes fatores fibrogênicos: células Th2 podem estar envolvidas nos estágios finais de DMD, quando a fibrose é proeminente. As células T reguladoras (Tregs) compreendem células que produzem ativamente TGF- β , uma outra molécula com ação fibrótica, que também é conhecida por limitar o recrutamento de células precursoras miogênicas, o que poderia dificultar a reparação do músculo danificado favorecendo a formação de cicatriz⁷⁴. Estudos observaram níveis aumentados de mRNAs de citocinas osteoclastogênicas IL6, IL11, inibina-Ba, e TGF β 2 nestes pacientes e apontaram a IL6 como um mediador importante da perda da massa óssea em DMD, sugerindo que a terapia direcionada anti-IL6 possa ter um impacto positivo sobre o fenótipo ósseo^{57,11,75}.

2.2 METABOLISMO MINERAL ÓSSEO EM PACIENTES COM DMD

O metabolismo ósseo ainda não foi profundamente investigado nos pacientes com DMD e poucos dados sobre a densidade mineral e remodelação ósseas estão disponíveis. Ainda é controverso se a própria DMD afeta diretamente a massa óssea, mas é certo que a perda óssea e o aumento do risco de fraturas são alguns dos efeitos colaterais indesejados do tratamento com GC em longo prazo, tornando-se as principais preocupações em todas as doenças crônicas que necessitam de tal terapia⁵². Do mesmo modo, a escoliose é uma complicação frequente (68 - 90%) da DMD. Um estudo com 123 meninos com DMD mostrou associação significativa entre a deambulação prolongada e risco de desenvolvimento de escoliose reduzido. O uso de GC parece estar associado com aparecimento mais tardio de escoliose⁷⁶.

A DMO e o metabolismo mineral ósseo foram investigados em crianças afetadas pela DMD, com ou sem tratamento com esteroides. Observou-se redução da DMO, aumento do metabolismo ósseo e baixos níveis séricos de 25(OH) $_2$ D, particularmente em crianças que tomavam GC⁷⁷. A partir destas considerações, outro estudo foi realizado e evidenciou-se redução do conteúdo mineral ósseo (CMO) e da DMO em todos os pacientes. Nesse mesmo estudo, após dois anos de terapia com calciferol e dieta rica em cálcio, observou-se aumento significativo da CMO e da DMO em mais de 65% dos pacientes, e normalização dos parâmetros do metabolismo ósseo e dos marcadores de remodelação óssea em 78,8% dos pacientes⁵². No quadro 1 podem ser encontrados toda a literatura que avaliou a DMO em pacientes com DMD.

Quadro 1 – Resumo dos achados na literatura sobre DMO em pacientes com DMD

Autor - ano	Tratamento GC	Nº pacientes	Achados DMO	Fraturas
Palmieri et al 1996 ⁷⁸	Não relatado	19	DMO reduzida (escore Z -1,0) Houve correlação negativa entre idade e escore Z da DMO: baixo desenvolvimento da massa óssea.	Não relatado.
Larson et al 2000 ⁷⁹	Não	40/36 com DXA.	Não cadeirantes: média do escore Z -0,8; Cadeirantes: média do escore Z 1,7 com piora progressiva até -3,9.	18 (44%)
Aparicio et al 2002 ⁸⁰	Não	10 não cadeirantes.	De acordo com escore Z colo do fêmur: 8 com osteoporose, 2 com redução da DMO. Na coluna 5/10 com redução da DMO.	Não relatado.
Louis et al 2003 ⁸¹	Não relatado	12 DMD e 3 Becker	DMO aumentou 3% em 5 ainda não cadeirantes.	Não relatado.
Bianchi et al 2003 ⁷⁷	22 - Dose crônica de 0,75 mg/kg/dia 38,5±6,8 meses	32	DMO (escore Z) é menor que o normal para a idade em todos os pacientes, mesmo no grupo tratado com esteroides.	6 pacientes (18%) tinham história de fraturas antes o estudo. Depois do estudo não houve fraturas.
Douvillez et al 2005 ⁸²	Não relatado.	22(idade 11,4±4,0 anos).	O CMO era menor e diminuiu antes da perda da deambulação e estava correlacionado com a fraqueza muscular.	A prevalência de fraturas foi alta .
Hawker et al 2005 ⁶⁰	Deflazacort dose inicial 0,9 mg/kg/dia até 6 a 7 anos.	42:11/16 com Alendronato (pré-puberai).	23/43 (antes do tratamento com alendronato) tinham DMO reduzida (escore Z < -1,0) na coluna e corpo total. Após 2 anos o escore Z não havia modificado para 16 pacientes. Média da idade óssea: 9,2 anos (5,5 – 14,5).	2 fraturas antes do tratamento com alendronato. Nenhuma fratura após o tratamento foi relatada.
Söderpalm et al 2007 ⁵⁶	16-prednisolon 0,22 a 0,35 mg/kg/dia 4 pacientes pararam o tratamento porque ganharam muito peso, mas usaram dose de 281 mg/kg	24 DMD (2,3–19,7 anos) 11 controles sadios pareados pela idade.	Reduzida DMO em todos os sítios avaliados no grupo de pacientes com DMD. A diferença entre o grupo DMD e os controles aumentaram com a idade. DMO da coluna vertebral nos pacientes com DMD era -2,5±1,9 e fora da coluna era -0,1±1,1. Marcadores de formação e reabsorção óssea mostraram reduzido remodelamento ósseo nos pacientes.	6 de 24 (25%) pacientes tiveram fraturas e todas ocorreram antes da inclusão no estudo.

Bianchi et al 2011 ⁵²	Prednisona: 1,25 mg/kg cada 2 dias.	33	Escore Z do CMO e da DMO diminuiram progressivamente na coluna lombar, com o tratamento; mas tiveram aumento estatisticamente significativo. Após 2 anos de tratamento o CMO da coluna lombar aumentou em relação ao pré- tratamento ($p < 0,01$) em 22 pacientes. 8 não tiveram aumento significativo e 3 continuaram piorando.	Durante o período de observação houve 4 fraturas em 4 pacientes enquanto durante o período de tratamento (2 anos) houve 2 fraturas em 2 pacientes.
Crabtree et al 2010 ⁸⁴	Prednisolona regime intermitente 10 dias com e 10 dias sem. Dose: 0,75 mg/kg/dia.	25	A área óssea craniana para altura e o CMO subcraniano para a área estavam significativamente reduzidos. Após 30 meses de terapia com esteroides houve aumento significativa da área óssea craniana para altura mas significante redução do CMO subcraniano para a área. Na coluna lombar não houve mudanças significativas.	Antes do tratamento com esteroides 6 crianças com história de fraturas. Um paciente perdeu a deambulação durante o segundo ano de tratamento e 2 meninos tiveram fraturas (dedo e fêmur).
Rufo et al 2011 ⁵⁷	Não	16 DMD e 11 Controles sadios pareados.	Em 6 pacientes (37%) o escore-Z da BMD era menor que -1,0; em 3 era entre -1,1 e -2,0; e nos outros 3 era abaixo de -2,0. A DMO foi ajustada para o volume da vértebra e calculada a DMO volumétrica. O escore-Z foi calculado baseado em controles pareados e sadios italianos.	Não relatado.
Mayo et al 2012 ⁴⁷	Deflazacorte com terapia em longo prazo (0,9 mg / kg / dia)	39	Antes da terapia com deflazacorte o escore-Z da CL corrigido para a idade e o corrigido para a altura foram reduzidos. Após a terapia com deflazacorte não houveram alterações significativas no escore-Z ajustado para a altura e houve uma mudança significativa ($p < 0,05$) no escore- Z corrigido para a idade.	9 fraturas de ossos longos ocorreram em 8 não cadeirantes. 7 fraturas vertebrais ocorreram em 6 cadeirantes após 5 anos de deflazacorte. O deflazacorte não aumentou o risco de fraturas em ossos longos.
Söderpalm et al 2012 ⁸⁵	13 paciente Com prednisona	30 (18 com DMD e 6 Becker); 6 excluídos	Os valores da CMO e DMO foram significativamente menores no grupo com DMD >10 anos em comparação com os pacientes com Becker com a mesma idade. No grupo com DMD >10 anos houve redução significativa da DMO CT e CL.	7 dos 18 pacientes com DMD (um deles com relato de fratura vertebral) e 4 dos 6 com Becker

King et al 2014 ⁸⁶	12 pacientes com história de uso. Esquema e tipo de corticoide não foram relatados.	22	Pacientes com DMD têm menores escores-Z DMO para a idade do que indivíduos saudáveis para todas as regiões, exceto para a cabeça. Pacientes que usaram GC apresentaram menor DMO para idade, menor DMO para estatura para a idade, e menor CMO areal do que aqueles que não usaram.	Não relatado.
Vuillerot et al 2014 ⁸⁷	21 tratados (20 c/ prednisona 0,75mg/kg/dia e 1 c/ 1mg/kg de 48/48h); e 8 não tratados.	29	Observaram aumento significativo da massa magra em pacientes com DMD tratados com GC (p <0,0001). Os não tratados apresentaram deterioração na composição corporal confirmada por um aumento significativo na percentagem de gordura corporal.	Não relatado.
Houston et al 2014 ⁸⁸	29 (todos tratados com GC, alguns c/ deflazacort e outros c/prednisona)	39	O escore-Z foi significativamente menor no quadril do que na CL (p<0,0001). Não houve diferença nos escores-Z no quadril total entre os pacientes que receberam e não receberam GC, no entanto, os pacientes tratados com GC tiveram escore-Z da DMO CL menor do que os não tratados (p <0,001). Com o uso do alendronato os escores-Z DMO CL tenderam ao aumento	Não relatado.
Tian et al 2014 ⁸⁹	Uso relatado, porém não especificado em quantos dos pacientes nem esquema ou tipo de corticoide utilizados.	408	A prevalência da osteoporose foi semelhante: 4,4%, 20,9% e 58,3% em idades de 5, 10 e 18 anos, respectivamente. Foram observados baixos escores-Z de DMO e CMO, que aumentaram com a idade e variaram com o local de medição.	A prevalência de fraturas totais foi de 16,5%, 37,4% e 83,3% em idades 5, 10 e 18 anos, e de fraturas vertebrais foi de 4,4%, 19,1% e 58,3% nas mesmas idades.

Modificada de Morgenroth et al¹⁰

2.2.1 SAÚDE DO OSSO

O esqueleto é um órgão dinâmico, metabolicamente ativo que está em constante fluxo. Os ossos servem para duas funções principais: função metabólica, como reservatório de cálcio e fósforo necessários para a homeostase do soro; e função estrutural, de alojar e proteger os órgãos vitais, e servir como um suporte para fixação muscular, permitindo o movimento⁹⁰. A força do osso é determinada pela sua massa, tamanho, geometria e qualidade. Fraturas por fragilidade ocorrem quando a força do osso é muito reduzida⁵⁶.

A maior parte da massa óssea é atingida durante a terceira década de vida.

Impossibilidade de atingir o pico máximo de massa óssea aumenta o risco de fratura por toda a vida⁵¹. Dentre os fatores que podem influenciar a força óssea, a mobilidade é provavelmente o mais importante. Quanto maior a quantidade de carga ou tensão sobre o esqueleto, maior a influência sobre a massa óssea e sua geometria. A atividade no início da vida pode fazer os ossos mais fortes. Por outro lado, até mesmo curtos períodos de ausência de peso podem levar à perda óssea. A puberdade é um período crítico para a produção de osso saudável. Os esteróides sexuais estão relacionados ao aumento da quantidade mineral óssea bem como ao tamanho e forma dos ossos em crescimento. Atrasos na puberdade podem resultar em pico de massa óssea reduzida^{25,51,91}.

Propriedades que contribuem para a resistência óssea incluem a taxa de renovação óssea, DMO, geometria, micro-arquitetura e o grau de mineralização. Coletivamente, essas propriedades são muitas vezes referidas como a qualidade do osso, o que dá ao osso a capacidade para resistir a fraturas após vigor trivial ou trauma¹⁰. E a saúde do osso é importante no cuidado dos pacientes com DMD ao longo de suas vidas²⁵.

2.2.2 REMODELAÇÃO ÓSSEA

O osso é um tecido dinâmico e a integridade do esqueleto é mantida por meio dos processos de modelamento e remodelamento ósseos. A forma e a estrutura dos ossos são continuamente modificadas e renovadas por esses dois processos, sendo que ambos envolvem formação e reabsorção ósseas⁹². O modelamento ósseo é um processo que ocorre principalmente durante a fase de crescimento e envolve ações não equilibradas de formação e reabsorção ósseas. O processo de modelamento geralmente é regulado por forças mecânicas, serve para manter a massa e a forma do osso e contribui para o pico de massa óssea atingido no início da vida adulta⁹³.

Já o remodelamento ósseo é um processo coordenado de reabsorção e formação ósseas que ocorre nas “unidades metabólicas ósseas”. Envolve a remoção de osso mineralizado pelos osteoclastos seguida pela formação de matriz óssea pelos osteoblastos que em seguida se torna matriz mineralizada⁹⁴. O remodelamento ósseo ocorre mais frequentemente em sítios esqueléticos ricos em osso trabecular como as vértebras, fêmur proximal, calcâneo e radio ultradistal⁹³. A remodelação é um processo essencial para a manutenção do crescimento do esqueleto e é essencial para a

prevenção e recuperação de fraturas ósseas. Ele fornece elasticidade ao tecido ósseo e produz uma fonte estável de cálcio extracelular¹⁰.

O processo de remodelamento ósseo ocorre em locais específicos em ciclos de aproximadamente 120 dias e inicia-se com a ativação de osteoblastos de superfície. Os sinais para a iniciação incluem mudanças na concentração sérica de uma série de fatores sistêmicos, como o hormônio da paratireoide (PTH), tiroxina, hormônio do crescimento e estrogênio. As citocinas e fatores de crescimento (IL-1, IL-6 e IL-11, IGF-1, TGF- β) desencadeiam a atividade de síntese dos osteoblastos⁹⁴. Uma vez que o osteoblasto é ativado, ocorre a síntese de citocinas que estimula o recrutamento e diferenciação dos osteoclastos na superfície da remodelação. Estas células de reabsorção óssea especializadas secretam proteases que dissolvem a matriz mineral e quebram o colágeno. O ciclo de remodelação está concluído quando a massa óssea é restaurada. Um desequilíbrio nas taxas de atividade dos osteoblastos e osteoclastos leva a mudanças na estrutura óssea e massa óssea⁵⁷. A osteopontina (OPN) é citada como um fator importante neste processo¹⁵.

Um aumento do risco de fraturas é a evidência mais forte para a qualidade óssea degradada. Outras consequências da baixa qualidade da massa óssea citadas na DMD incluem a osteopenia, osteoporose, dor óssea, escoliose e a redução da qualidade de vida^{25,54}.

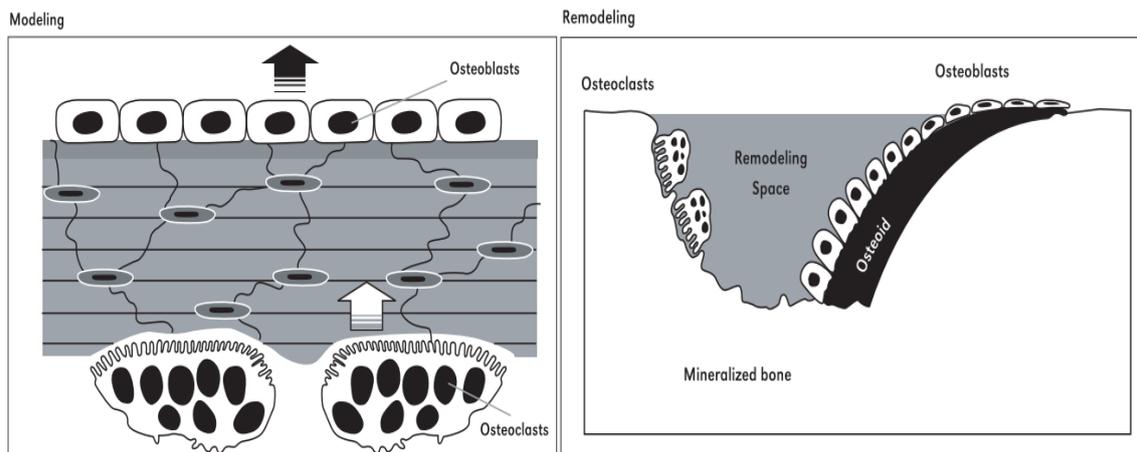


Figura 1- Remodelamento Ósseo - Adaptado por US Department of Health and Human Services

Na modelagem, a ação dos osteoblastos e osteoclastos não está ligada e podem ocorrer mudanças rápidas na quantidade, forma e posição do osso. Na remodelação, a ação dos osteoblastos é acoplada à ação anterior dos osteoclastos. As alterações líquidas na quantidade e na forma do osso são mínimas, a menos que haja um desequilíbrio na remodelação.

2.2.3 QUALIDADE DA MASSA ÓSSEA

Existem dois principais tipos de osso: osso cortical que compõe 80% de toda massa óssea e o trabecular cuja proporção é 20%, com especial concentração deste último na coluna vertebral e os ossos longos distais. A redução da DMO no osso cortical se manifesta primeiramente na superfície endosteal, alargando a cavidade da medula óssea e, em seguida, produzindo maiores lacunas no córtex. No osso trabecular, o efeito de descarga causada por fraqueza muscular leva a um afinamento das trabéculas, perturbando a estabilidade micro-arquitetural, desconectando as escoras trabeculares⁹¹.

Uma variedade de doenças da infância e intervenções farmacêuticas podem resultar na perda de massa óssea ou no acúmulo de massa óssea abaixo do ideal^{84,95}. Condições que reduzem a mobilidade, incluindo a distrofia muscular, estão associadas a redução da DMO e ao risco aumentado de fraturas de ossos longos^{1,5}. Nessas condições, a avaliação da saúde óssea é indicada, principalmente naqueles pacientes usuários de corticoterapia.

A interpretação de resultados de DMO é muito mais complexa em pacientes pediátricos. Dificuldades intrínsecas de interpretação dos dados densitométricos incluem um esqueleto em crescimento em que o tamanho, forma e a DMO estão mudando rapidamente. Além disso, a comparação com controles sadios pareados por sexo e da mesma faixa etária pode ser inadequada na presença de doenças crônicas que afetam o crescimento do esqueleto e a maturação, podendo fornecer resultados imprecisos em termos de perda de massa óssea real⁹⁵⁻⁹⁷.

De acordo com os atuais critérios densitométricos para avaliação de massa óssea, a “baixa massa óssea” é definida como um Escore-Z da DMO menor ou igual a -2 Desvios Padrão. O Escore-T não deve ser utilizado, assim como os termos “osteopenia e osteoporose”. O diagnóstico de osteoporose não pode ser realizado fundamentando-se unicamente no critério densitométrico e requer o antecedente de uma fratura de osso longo de membro inferior, compressão vertebral ou duas ou mais fraturas de extremidades superiores, associado à DMO baixa^{95,98,99}.

Há um grande número de métodos não-invasivos disponíveis para avaliar a qualidade da massa óssea, entretanto, a densitometria óssea com raio X de dupla energia de absorção (DXA) para DMO, e os marcadores biológicos para a remodelação óssea são os mais utilizados na prática clínica¹¹. A radiografia simples não é um bom

método para avaliar a qualidade da massa óssea porque para uma evidência radiológica de redução da DMO deve haver redução de 30-40% dessa DMO para que a mesma possa ser diagnosticada. Como essas alterações ocorrem apenas com osteoporose avançada, a triagem radiológica de rotina para a osteoporose não é útil e geralmente tem sido realizada por meio da DXA^{26,91}.

A DXA utiliza baixos feixes de radiação de diferentes energias e a atenuação de dois feixes é detectada para dar uma medida de absorção. A medição da DMO é dependente da área projetada, que é realizada de forma cônica. Assim, ela fornece uma leitura bidimensional para a massa óssea (g/cm^2). Como consequência, os resultados aparentes são determinados pelo tamanho do osso e ossos pequenos podem produzir resultados falsamente baixos e vice-versa para os ossos grandes. Contraturas articulares podem também interferir com os resultados. A interpretação da DXA em crianças com ossos pequenos e deformados é, portanto, particularmente problemática e estes fatores devem ser levados em conta na interpretação dos resultados^{91,95}. Conforme supracitado, a DXA calcula apenas uma "área" da DMO (considerada a razão entre a área do CMO e a projeção dos ossos digitalizados). Isto é uma limitação do método que por razões matemáticas, superestima o verdadeiro valor da DMO, aumentando o volume de osso. Dessa maneira, correções apropriadas são necessárias para avaliar o valor real da DMO em indivíduos com um tamanho de corpo pequeno para a idade. Para superar esta limitação, foram propostos diferentes métodos de correção e nas crianças com crescimento reduzido os valores DXA devem ser sempre devidamente corrigidos, a fim de evitar estimativas incorretas^{53,95}.

A coluna lombar entre L1 e L4, e as medidas corporais totais são os sítios mais utilizados em crianças. No entanto, Bianchi e colaboradores relataram o uso da DXA com a digitalização do fêmur distal lateral, que é bastante promissor para crianças com deficiências motoras, tais como paralisia cerebral e também para as crianças com DMD^{26,53}.

Um aspecto importante da DXA é que ela pode ser usada para prever o risco de fraturas antes que elas ocorram. Há evidências em crianças de forte relação entre baixa DMO e risco aumentado de fraturas. Este aspecto pode ser muito relevante na DMD, em que a taxa de fratura parece ser aumentada^{50,53}. Um estudo demonstrou uma perda óssea de 6-12% no primeiro ano de tratamento com GC e o aumento rápido do risco de fratura nos primeiros três meses de tratamento. Fraturas podem ocorrer em até 30-50% dos indivíduos adultos que recebem a terapia crônica com GC^{63,96}. A DMO

da coluna vertebral é particularmente útil neste contexto, uma vez que o osso vertebral parece ser particularmente vulnerável aos efeitos dos esteroides^{84,95}.

Conhecer a(s) causa(s) da redução da massa óssea nos pacientes com DMD pode ajudar a orientar as terapias eficazes para reduzir o risco de fratura. O *workshop* Birmingham propôs um algoritmo de tratamento delineando uma abordagem gradual para a intervenção, com medidas de suporte para todos os pacientes, tais como a manutenção dos níveis de vitamina D, a garantia de ingestão adequada de cálcio, e a otimização do peso com atividade física^{50,51}. O arsenal terapêutico para o tratamento da redução da DMO em crianças é baseado nos mesmos agentes utilizados nos adultos. Os suplementos de cálcio e vitamina D e os seus metabólitos ativos têm sido amplamente usados, além do uso dos bisfosfonados. Entretanto, os bisfosfonados não são usados de rotina e existem poucos estudos sobre sua eficácia. Estudos com hormônio do crescimento e hormônio da paratireoide também são citados, mas ainda carecem de evidências^{26,77,96}.

Bianchi e colaboradores avaliaram a DMO e o metabolismo ósseo em crianças afetadas pela DMD, com ou sem tratamento com esteróides, e observaram redução da DMO, aumento do metabolismo ósseo e baixos níveis séricos de 25OH vitamina D, particularmente em crianças que tomam GC⁷⁷. Os mesmos autores avaliaram posteriormente a eficácia e segurança de um tratamento com colecalciferol e adequada ingestão de cálcio nas crianças com DMD tratadas com GC. Na maioria dos pacientes o colecalciferol e a ingestão adequada de cálcio foram uma abordagem eficaz de primeira linha para controlar a remodelação óssea, corrigir a deficiência de vitamina D e aumentar o CMO e a DMO. Não houve resposta para o controle da remodelação óssea que permaneceu persistentemente elevada⁵².

Em 2010, o “DMD Care Considerations Working Group” publicou as recomendações para o manejo da saúde óssea na DMD. Os autores postularam que a saúde óssea é uma parte importante do cuidado desses pacientes e recomendam a seguinte avaliação da massa óssea: testes bioquímicos no sangue – cálcio, fosfato, fosfatase alcalina, 25OH vitamina D, magnésio e PTH; na urina – cálcio, creatinina e sódio; exames de imagem – DXA, radiografia da coluna vertebral e idade óssea².

2.2.4 MARCADORES BIOQUÍMICOS DO METABOLISMO ÓSSEO

Os marcadores bioquímicos da remodelação óssea podem ser utilizados para

avaliar as taxas de formação e reabsorção do osso. Esses marcadores podem ser avaliados no sangue e na urina através da medida da atividade enzimática ou componentes da matriz óssea liberados na circulação durante o metabolismo ósseo. Os marcadores ósseos não diferenciam as alterações do remodelamento ósseo entre os componentes cortical e trabecular do osso. Eles expressam as alterações dos processos de formação e reabsorção ósseas, sem no entanto, estimarem o excesso da reabsorção sobre a formação. Os níveis circulantes destes marcadores podem ser influenciados por outros fatores além do remodelamento ósseo tais como o seu próprio *clearance* metabólico (captação hepática, ligação ao cristal ósseo e a excreção renal) e características do “kit” de análise.

Os marcadores de formação óssea no sangue são: procolágeno peptídeo tipo I, fosfatase alcalina (total e osso-específica) e osteocalcina. Os marcadores de reabsorção óssea no sangue são fosfatase ácida tartarato-resistente, carboxiterminal telopeptídeo do colágeno tipo I (C telopeptídeo) e aminoterminal telopeptídeo do colágeno tipo I (N telopeptídeo). Os marcadores de reabsorção óssea na urina são: hidroxiprolina, hidroxilisina, piridinolina (total e livre), deoxipiridinolina (total e livre) e aminoterminal telopeptídeo do colágeno tipo I (N telopeptídeo). Os principais marcadores de formação e reabsorção óssea podem ser vistos na tabela 1.

Os marcadores de formação óssea refletem a atividade osteoblástica e os marcadores de reabsorção óssea refletem a atividade osteoclástica. A interpretação da atividade desses marcadores na criança e no adolescente pode ser difícil considerando que eles refletem de forma inespecífica os processos de modelamento, remodelamento e o crescimento epifisário^{83,100}.

Quadro 2 - Principais marcadores de formação e reabsorção óssea

Marcadores de formação	Origem	Ação
<i>Sangue</i>		
Fosfatase alcalina óssea	Enzimas na membrana plasmática de osteoblastos	Degradação do inibidor da mineralização do pirofosfato alcalino
Osteocalcina	Proteínas não-colágenas de ossos produzidas pelos osteoblastos durante a formação óssea e conectados a hidroxiapatita	Influências na mineralização do osteoide. Funciona com feedback negativo durante o processo de remodelação óssea

Propeptídeo aminoterminal do colágeno tipo I (PINP)	Produto específico da proliferação de osteoblastos e fibroblastos	Clivagem da protease pró colágeno de tipo 1, durante o processo de formação do colágeno tipo 1
Marcadores de reabsorção	Origem	Ação
<i>Sangue</i>		
Ligante do ativador do receptor do Kappa-B (RANKL)	Produzido por osteoblastos, ativado por células B e T	Se liga ao RANK, que é expresso em osteoclastos e seus precursores, estimulando a sua diferenciação e ativação
Osteoprotegerina	Secretada pelos osteoblastos	Receptor RANKL, reduz a reabsorção óssea através da ligação a ao RANKL e previne a osteoclastogênese
Osteopontina	Proteína não colágena da matriz da matriz óssea orgânica	Ação inibitória sobre a mineralização óssea e estimulatória sobre a reabsorção óssea
Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF23)	Produzido principalmente pelos osteócitos	Hormônio fostatúrico e parecer ações inibitórias diretas sobre a mineralização óssea
Esclerotina	Secretada principalmente pelos osteócitos	Antagonista de sinalização Wnt, inibe a formação de osso
<i>Sangue e urina</i>		
C-telopeptídeo (CTX)	Isomerização de beta aspartil que ocorre no colágeno maduro	Clivagem do colágeno tipo 1 pela Catepsina K na reabsorção óssea
N-telopeptídeo (porção Amino-terminal do Colágeno tipo 1)	Colágeno tipo 1 do osso	Clivagem do colágeno tipo 1 pela Catepsina K na reabsorção óssea

Modificado de Bandeira et al¹⁰¹

Outros marcadores de formação e reabsorção óssea urinários e sanguíneos podem ser utilizados na avaliação da massa óssea. No sangue: fosfatase alcalina, fósforo, cálcio, PTH e vitamina D. Na urina: cálcio e citrato.

2.2.4.1 Fosfatase Alcalina

A enzima fosfatase alcalina (ALP) pertence a um grande grupo de proteínas que aderem à superfície extracelular da célula utilizando anticorpos monoclonais com preferência para o osso. Embora a função exata desta enzima seja desconhecida, no osso a ALP parece estar envolvida na quebra de pirofosfato, um potente inibidor da deposição de fosfato de cálcio ao nível extracelular¹⁰². A ALP total (T-ALP) tem sido

usada para monitorar a doença óssea e a isoenzima ALP específica óssea (B-ALP) parece ser um excelente indicador da atividade de formação óssea global. Clinicamente as medições de B-ALP são úteis para o monitoramento terapêutico de pacientes, pois estes níveis indicam a atividade metabólica do osso¹⁰³.

2.2.4.2 Cálcio e Fósforo

O cálcio, o fósforo desempenham papel crítico no desenvolvimento do esqueleto e na saúde dos ossos. A quantidade de cálcio necessária para atender as necessidades nutricionais são diferentes na infância, adolescência e idade adulta, e é consideravelmente maior na adolescência para que se possa atingir o pico ótimo de massa óssea⁹⁰. Durante os períodos de crescimento mais lento, a relação entre a excreção urinária de cálcio e ingestão de cálcio é mais pronunciada do que durante o período de crescimento rápido (adolescência) quando a necessidade de cálcio é elevada.

A excreção renal de cálcio é regulada pelo PTH, estrógenos, e é também influenciada pela proteína da dieta, em particular, pelo sódio. A alta ingestão de sal aumenta a perda de cálcio na urina⁴⁷. Também desempenham papel crítico na formação do osso saudável o calcitriol, hormônio derivado da 1,25OH Vitamina D e a calcitonina. A 1,25OH Vitamina D estimula a absorção de cálcio nos rins e de cálcio e fósforo no intestino. A calcitonina inibe a destruição dos ossos e protege contra a hipercalcemia¹⁰⁴.

Das influências sobre a absorção de cálcio, a mais importante é a vitamina D, que é necessária para o transporte ativo de cálcio através da mucosa intestinal¹¹. Num estado suficiente de vitamina D, a absorção intestinal de cálcio é de até 30%, embora possa atingir 60% a 80% durante períodos de crescimento ativo. Em um estado deficiente em vitamina D, a absorção intestinal de cálcio é de apenas 10% a 15% e não há um decréscimo na reabsorção máxima total de fosfato¹⁰⁵. Em condições de deficiência de vitamina D os níveis baixos de cálcio ionizado estimulam a secreção do PTH, que aumenta a reabsorção do cálcio nos túbulos renais e aumenta a atividade da 1- α hidroxilase, causando aumento da síntese do 1,25- di-hidroxivitamina D¹⁰⁶. Aumento dos níveis de PTH também causam perda de fósforo na urina. Até há pouco tempo, apenas três principais reguladores do metabolismo do fosfato havia sido identificados: (1) ingestão de fosfato e sua absorção, (2) o calcitriol, que aumenta a

absorção de fosfato no intestino e no osso, e (3) o PTH, que diretamente promove a absorção de fosfato do osso diminui sua reabsorção no túbulo proximal, e indiretamente por estimular a produção de calcitriol. No entanto, estudos têm demonstrado a importância fisiológica do osso e das fosfatoninas, tal como o fator de crescimento fibroblástico 23 (FGF23) na regulação do fosfato¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

Redução dos níveis de fósforo (e também de cálcio) e redução dos produtos formados pelo fosfato e cálcio estão relacionados diretamente à redução da mineralização óssea¹⁰⁵. Além disso, os níveis baixos de fósforo causam uma falha da apoptose dos condrócitos, levando à desorganização da placa de crescimento. A falha ou atraso da calcificação da matriz osteóide leva a osteomalacia nos ossos maduros¹⁰⁴.

A hipocalcemia deve ser tratada com suplementação de cálcio. A dose de ingestão diária de cálcio (mg/dia) recomendada é 400-600 mg em crianças pequenas (um a cinco anos), 800-1.200 mg para crianças mais velhas (oito a dez anos) e 1200-1500 mg para adolescentes e adultos jovens (onze a vinte e quatro anos). A melhor fonte de cálcio é uma dieta saudável e equilibrada e os produtos lácteos fornecem 75% do cálcio da dieta⁵¹. Em adição aos suplementos de cálcio, o calcitriol pode ser às vezes, necessário em doses de 20 a 100 ng/kg por dia, em 2 a 3 doses divididas até que os níveis de cálcio normalizem¹⁰⁵.

2.2.4.3 Vitamina D

A vitamina D é única entre as vitaminas, pois funciona como um hormônio e pode ser sintetizada na pele a partir da exposição à luz solar¹⁰⁶. O nível sérico de 25OH vitamina D (25(OH)D) é o melhor indicador do conteúdo corporal dessa vitamina ao refletir a quantidade obtida a partir da ingestão alimentar (Vitamina D₂: ergocalciferol) e da exposição à luz solar (Vitamina D₃: colecalciferol - fotossintetizada sob exposição da radiação ultravioleta B). Ambas as formas de vitamina D são convertidas no fígado e outros tecidos em 25(OH)vitamina D a partir dos depósitos adiposos no fígado. A 25(OH)D é a seguir, transformada em seu metabólito ativo, a 1,25(OH)₂D₃, pela enzima 25-hidroxivitamina D 1- α -hidroxilase no rim, principalmente. Já seu catabolismo é realizado pela 25-hidroxivitamina D 24- hidroxilase. A principal função da forma ativa, a 1,25(OH)₂D₃ é a manutenção dos níveis séricos normais de cálcio através do aumento da absorção renal de cálcio e intestinal de cálcio e fósforo⁹⁵.

Apesar de controverso, parece existir um consenso de que os valores

plasmáticos de 25(OH)D inferiores a 30-32 ng/ml indicam um déficit relativo de vitamina D (110). A vitamina D é essencial para facilitar a absorção de cálcio (105) e a regulação do eixo cálcio-25-(OH)D-PTH está bem estabelecida, estando ilustrada pela relação inversa entre os níveis de 25(OH)D e PTH no soro (110). A deficiência grave de vitamina D causa raquitismo ou osteomalacia em que o osso novo é pouco mineralizado, torna-se amolecido e sofre deformidades. Deficiência menos grave de vitamina D muitas vezes resulta em aumento da PTH no soro, resultando em reabsorção óssea, osteoporose e aumento do risco de fraturas⁹⁶.

A prevalência de hipovitaminose D em pacientes com fratura de quadril aguda foi relatado amplamente nos últimos anos, e o estado nutricional de vitamina D em tais relatórios geralmente é avaliado com base em níveis séricos de 25(OH)D (111). Duas meta-análises publicadas nos últimos 5 anos avaliaram o efeito de vitamina D e suplementação de cálcio na saúde óssea e o risco de fratura. As análises concluíram que só a vitamina D não foi eficaz na redução da taxa de fraturas (OR 1,01; IC 95%, 0,92- 1,12), no entanto, o consumo de vitamina D de pelo menos 800 UI/dia combinado com ingestão de cálcio entre 1000 e 1200 mg/d foi eficaz para a prevenção de fraturas⁹⁰. Outro estudo também concluiu que a suplementação de vitamina D associada a suplementação de cálcio tem efeitos benéficos sobre a DMO, sobre fraturas e quedas sem evidência de danos¹¹².

Semelhante a outras condições de mobilidade reduzida, a redução da massa óssea é frequentemente observada em meninos com DMD. Os ossos tornam-se finos e sofrem desmineralização. Com a perda da deambulação, a DMO diminui drasticamente, aumentando o risco de fraturas⁵¹. Apesar dos benefícios do tratamento com GC, há uma preocupação com os efeitos dessas drogas em longo prazo sobre a qualidade da massa óssea⁷⁷. Além disso, os GC reduzem a ação da vitamina D no intestino e aumentam a excreção de cálcio na urina, além de reduzir a liberação de gonadotropina pela pituitária, conduzindo a baixos níveis de estrogênio e androgênio que são necessários para a saúde dos ossos. A reabsorção óssea está aumentada enquanto que a formação do osso é reduzida⁵¹. O uso de corticosteróides em DMD pode comprometer a saúde dos ossos, mas nos relatórios iniciais ponderam que seu uso não parece aumentar significativamente o risco de fraturas em ossos longos⁵⁴.

Muitos meninos com DMD apresentam níveis de vitamina D insuficientes ou deficientes. Estudo prospectivo realizado com 33 crianças com DMD em uso de uma dose fixa de prednisona (1,25 mg/kg - 1 a cada 2 dias) mostrou diminuição do CMO e

da DMO em todos os pacientes. Após a suplementação com vitamina D e cálcio por dois anos, observou-se aumento significativo do CMO e DMO em mais de 65% dos pacientes⁵². Os autores também observaram que os parâmetros do metabolismo ósseo e os marcadores da remodelação óssea normalizaram na maioria dos pacientes (78,8%). Eles concluíram que a combinação da suplementação da vitamina D e ingestão adequada de cálcio na dieta é um tratamento eficaz para a maioria dos pacientes com DMD. Esses resultados são consistentes com a visão de que a doença óssea em pacientes com DMD apresenta-se com aspectos de osteomalacia e osteoporose⁴⁷. O componente da osteomalacia é sugerido pela melhoria observada no CMO e na DMO bem como pela formação óssea, indicadas pelas mudanças no volume ósseo em resposta a suplementação de vitamina D e cálcio. Além disso, a incapacidade de restaurar completamente a DMO em todos os pacientes e a presença ou ausência de alteração nos marcadores ósseos para atividade osteoclastogênica sugerem aspectos da osteoporose, que não foram totalmente corrigidos pela suplementação de vitamina D e de cálcio^{11,57}.

2.2.4.4 Paratormônio

O PTH é liberado a partir de células principais das glândulas paratireóides quando a concentração de cálcio no plasma diminui, atuando como o regulador chave da homeostase do cálcio e fosfato e na reabsorção óssea. A resposta do osso depende de interações entre osteoblastos e osteoclastos, uma vez que só os osteoblastos expressam o receptor da paratiróide, e variam dependendo da secreção de PTH¹¹². Nesse sentido, o PTH pode aumentar claramente a massa óssea quando administrado de forma intermitente, e esse efeito tem sido atribuído a uma ação direta e potente anti-apoptótica do hormônio em osteoblastos. A sinalização do receptor de PTH em osteócitos também foi demonstrada, pelo aumento da massa óssea e da velocidade de remodelação óssea, através do estímulo do LRP5 (*receptor-related protein 5*)¹¹³.

Estudo prospectivo com 28 pacientes com história de múltiplas fraturas osteoporóticas por compressão vertebral tratados com PTH mostrou aumento da DMO e não se observou nenhuma fratura vertebral recente durante o tratamento⁹⁰. O PTH foi aprovado pelo *Food and Drugs Administrations* (FDA) como modalidade de tratamento para homens e mulheres pós-menopáusicas com osteoporose, após ter sido atestada sua potência em diminuir o risco de fraturas em humanos¹¹⁴.

2.2.4.5 Marcadores Urinários

A concentração de cálcio numa amostra urinária de 24 horas ou em uma amostra da primeira urina da manhã corrigidos para a creatinina tem sido utilizada para avaliar a perda esquelética. Embora os níveis possam ser substancialmente afetados por fatores que incluem dieta, função renal e os excessos de hormônios, valores baixos de cálcio na urina ($< 0,15$ mg/mg creatinina) são improváveis em doentes com elevada remodelação óssea^{102,115}.

A determinação do ácido cítrico na urina também é utilizada na investigação do metabolismo do fósforo e cálcio, das tubulopatias e dos ácidos do ciclo de Krebs. O citrato é um inibidor da formação de cálculos urinários. Ele tem a competência de se complexar com o cálcio, limitando sua supersaturação, e conseqüentemente, prevenindo a nucleação do oxalato e do fosfato de cálcio. Ele previne também a aglomeração de cristais e seu crescimento, e pode prevenir a adesão do oxalato de cálcio nas células do epitélio renal e reduzir a expressão da osteopontina urinária. O citrato tem então importância marcante na avaliação da calculose urinária recidivante e a modulação de sua excreção urinária é influenciada por fatores como a ingestão aumentada de proteína animal, a sobrecarga ácida com correspondente redução do pH urinário, favorecendo o desenvolvimento de cálculos de cálcio e ácido úrico¹¹⁵⁻¹¹⁷.

2.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A DMD é a forma mais comum e severa de distrofia muscular na infância. Ela é uma doença progressiva, ligada ao cromossomo X, causada por mutações no gene da distrofina, que levam à ausência de expressão dessa proteína no tecido muscular, culminando em fraqueza muscular progressiva. Sem a distrofina, a estrutura da glicoproteína do sarcolema é menos estável, levando à instabilidade da membrana. Em conseqüência, ocorre lesão muscular com iniciação de uma cascata inflamatória que contribui ainda mais para o dano muscular, necrose e fibrose. Isto conduz a um estado de inflamação crônica caracterizada pela infiltração de neutrófilos e macrófagos, e a presença das suas muitas citocinas e quimiocinas associadas, levando a morte celular^{5,6,8}.

Apesar do rápido avanço atual no conhecimento sobre genética, essa doença ainda não possui um tratamento de cura definitivo^{1,2}. Os GC são o pilar do tratamento

para a DMD, e são oferecidos para os meninos que deambulam e que já não estão ganhando habilidades motoras, ou cujas habilidades motoras estão em declínio^{2,31,32}. Seu mecanismo de ação ainda não está claro e várias hipóteses têm sido propostas³⁴, baseadas numa ação potente anti-inflamatória que reduziria a resposta inflamatória no músculo deficiente de distrofina, o que por sua vez retardaria a perda da força muscular prolongando a deambulação^{31,33}. Embora os GC tenham ação benéfica na músculo das crianças com DMD, eles também agem suprimindo a formação óssea devido ao aumento da apoptose osteoblástica, e aumentam a reabsorção óssea devido ao aumento da osteoclastogênese^{55,118}. Esta ação combinada dos GC no remodelamento ósseo pode evidentemente, causar osteoporose que aumenta o risco de fraturas em adultos^{56,119}. Foi demonstrado que também as crianças tratadas com GC orais têm massa óssea reduzida^{120,121}, entretanto, ainda não está bem definida a relação entre a redução da massa óssea de crianças tratadas com GC e osteoporose e risco aumentado de fraturas nesses pacientes.

Além do uso crônico de GC, há ainda outras possíveis causas para a deterioração da saúde óssea observada nestes pacientes com DMD. Dentre elas podem ser citadas: (1) efeitos das citocinas e quimiocinas liberadas como resultado da resposta inflamatória no músculo deficiente de distrofina; (2) ativação de osteoclastos pelo metabolismo alterado no músculo (por exemplo, ativação do fator nuclear de vias κ Beta); (3) a perda da força muscular; (4) o desuso da musculatura e as posições viciosas mantidas pelos pacientes; (5) as alteração da homeostase do cálcio; (6) alterações da vitamina D; (7) alterações relacionadas ao estado nutricional; (8) e o atraso puberal (estão associados a obre saúde óssea^{1,19,122}. Finalmente, foram relatadas associações da IL-6 com a perda óssea em pacientes com DMD, além de ações da IL-11, do fator de necrose tumoral, OPN e o FGF-23^{12,31,50,53,75,90,92,109,123}.

A manutenção de um estado nutricional apropriado é fundamental para o desenvolvimento do esqueleto e da saúde óssea. A ingestão de quantidade inadequada de cálcio, alterações da homeostase do eixo PTH-cálcio e baixos níveis de exposição ao sol levando à deficiência de vitamina D são fatores que podem contribuir de forma significativa para a má saúde óssea.

A saúde do osso é parte importante do cuidado de pacientes com DMD e o aumento do risco de fraturas é a evidência mais forte para a qualidade óssea degradada, nestes pacientes^{26,54}. Contribuem para a qualidade óssea os seguintes fatores: as taxas do remodelamento ósseo, a DMO, a geometria do osso, a micro-arquitetura óssea e o

grau de mineralização. Aliados, esses fatores dão aos ossos a capacidade de resistir a fraturas após trauma¹²⁴.

O remodelamento ósseo é um processo contínuo de formação e reabsorção óssea e ocorre frequentemente em locais onde há osso trabecular (vértebras, fêmur proximal, calcâneo, rádio ultradistal). Este remodelamento é essencial para a manutenção do crescimento do esqueleto e para a saúde óssea. Pode ser avaliado e monitorizado pelos marcadores bioquímicos do remodelamento ósseo e pela avaliação da massa óssea. Foi demonstrado que pacientes com DMD, com e sem uso de GC, têm importante redução da DMO, aumento do remodelamento ósseo e baixos níveis de 25(OH)D no grupo de pacientes em tratamento com GC. A mobilidade reduzida e a terapia com GC poderiam então aumentar o risco de fraturas nos meninos com DMD e esses pacientes seriam mais propensos a fraturas do que a população geral^{34,48,56,60,77,79,80,82,84,85,120}.

A DXA é a técnica mais utilizada para avaliar a saúde óssea. O uso da DXA em crianças está recomendado, entretanto, são necessárias correções. O local mais apropriado para a avaliação é a coluna vertebral entre L1 e L4. O termo osteopenia, assim como osteoporose, não devem ser utilizados, a não ser que haja uma história significativa de fratura. Baixa massa óssea ou redução da densidade mineral óssea são os termos adequados para um escore Z igual ou menor que $-2 DP$ ^{56,125-127}. Um aspecto importante da DXA a ser considerado é que ela pode predizer o risco de fraturas antes que elas ocorram, o que pode ser relevante para pacientes com DMD^{50,53}.

Os marcadores bioquímicos de formação e reabsorção óssea são uma ferramenta clínica nova e potencialmente importante para a avaliação e controle do metabolismo ósseo. Estes marcadores são capazes de detectar mudanças sutis e precoces no remodelamento ósseo, predizendo também precocemente o risco de fratura^{56,75,77,83,102}.

Concluindo, a redução da DMO nos pacientes com DMD é multifatorial e uma abordagem preventiva é imprescindível para garantir o crescimento saudável do esqueleto. A doença óssea desses pacientes é muito importante e pode contribuir para a perda da deambulação, perda da qualidade de vida e ainda, da longevidade. Cada menino com DMD deve ser abordado e acompanhado individualmente. A frequência deste acompanhamento é imprescindível para evitar consequências não desejadas.

Finalmente, novos estudos são necessários para a completa compreensão de todos os aspectos da saúde da massa óssea em pacientes com DMD.

2.4 Referências Bibliográficas

1. Biggar WD. Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Rev.* 2006;27(3):83–8.
2. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurology.* 2010;9(1):77–93.
3. Manzur a Y, Kinali M, Muntoni F. Update on the management of Duchenne muscular dystrophy. *Arch Dis Child.* 2008;93(11):986–90.
4. Kinali M, Manzur A, Muntoni F. Recent developments in the management of Duchenne muscular dystrophy. *Paediatr Child Health.* 2007;18:1.
5. Reed U. Doenças neuromusculares. *J Pediatr.* 2002;78:89–103.
6. Hyser CL, Mendell JR. Recent advances in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neurol Clin.* 1988;6(3):429–53.
7. Ciafaloni E, Fox DJ, Pandya S, Westfield CP, Puzhankara S, Romitti P a, et al. Delayed diagnosis in duchenne muscular dystrophy: data from the Muscular Dystrophy Surveillance, Tracking, and Research Network (MD STARnet). *J Pediatr.* 2009;155(3):380–5.
8. Lovering R, Porter N, Bloch R. The muscular dystrophies: from genes to therapies. *Phys Ther.* 2005;85:1372–88.
9. Ichim TE, Alexandrescu DT, Solano F, Lara F, Campion RDN, Paris E, et al. Mesenchymal stem cells as anti-inflammatories: implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cell Immunol.* 2010;260(2):75–82.
10. De Paepe B, De Bleecker JL. Cytokines and chemokines as regulators of skeletal muscle inflammation: presenting the case of Duchenne muscular dystrophy. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:1-10.
11. Morgenroth VH, Hache LP, Clemens PR. Insights into bone health in Duchenne muscular dystrophy. *Bonekey Rep.* 2012;1:9. A
12. Commins SP, Borish L, Steinke JW. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(Suppl 2):S53–72.
13. Nakagaki WR, Camilli JA. Bone tissue and muscle dystrophin deficiency in mdx mice. *Joint Bone Spine.* 2012;79(2):129–33.
14. Hofbauer L, Lacey D., Dunstan C., Spelsberg T., Riggs B., Khosla S. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α , but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone.* 1999 Sep;25(3):255–9.

15. Vetrone SA, Montecino-Rodriguez E, Kudryashova E, Kramerova I, Hoffman EP, Liu SD, et al. Osteopontin promotes fibrosis in dystrophic mouse muscle by modulating immune cell subsets and intramuscular TGF-beta. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1583–94.
16. Santos NM. Perfil clínico e funcional dos pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne assistidos na Associação Brasileira de Distrofia Muscular (ABDIM). *The American orthoptic journal.* 2006;56:15–22.
17. Fachardo G, Carvalho S de, Melo D de. Tratamento hidroterápico na Distrofia Muscular de Duchenne: Relato de um caso. *Rev Neurocienc.* 2004;12(4):217–21.
18. Yiu EM, Kornberg AJ. Duchenne muscular dystrophy. *Neurology India.* 2008;56(3):236–47.
19. Bushby K, Bourke J, Bullock R, Eagle M, Gibson M, Quinby J. The multidisciplinary management of Duchenne muscular dystrophy. *Curr Paediatr.* 2005;15(4):292–300.
20. Mullender M, Blom N, De Kleuver M, Fock J, Hitters W, Horemans A, et al. A Dutch guideline for the treatment of scoliosis in neuromuscular disorders. *Scoliosis.* 2008;3:14.
21. Costanza L, Moggio M. Muscular dystrophies: histology, immunohistochemistry, molecular genetics and management. *Curr Pharm Des.* 2010;16(8):978–87.
22. McMillan HJ, Campbell C, Mah JK. Duchenne muscular dystrophy: Canadian paediatric neuromuscular physicians survey. *Can J Neurol Sci.* 2010;37(2):195–205.
23. Novotny SA, Warren GL, Lin AS, Guldborg RE, Baltgalvis K a, Lowe D a. Bone is functionally impaired in dystrophic mice but less so than skeletal muscle. *Neuromuscul Disord.* 2011;21(3):183–93.
24. Lebel D, Corston J, McAdam L. Glucocorticoid treatment for the prevention of scoliosis in children with Duchenne muscular dystrophy: long-term follow-up. *J Bone Joint Surg Am.* 2013;95:1057-61.
25. Rosa Güell M, Avendano M, Fraser J, Goldstein R. Alteraciones pulmonares y no pulmonares en la distrofia muscular de Duchenne. *Arch Bronconeumol.* 2007;43(10):557–61.
26. Bushby K, Finkel R, Birnkrant D. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. *Lancet Neurology.* 2010;9(2):177–89.
27. Wagner KR, Lechtzin N, Judge DP. Current treatment of adult Duchenne muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1772(2):229–37.

28. Flanigan KM, Niederhausern A Von, Dunn DM, Alder J, Mendell JR, Weiss RB. Rapid Direct Sequence Analysis of the Dystrophin Gene. *Am J Hum Genet.* 2003;72(4):931–9. A
29. Simon V, Resende M. Duchenne muscular dystrophy: Quality of life among 95 patients evaluated using the Life Satisfaction Index for Adolescents. *Arq neuropsiquiatric.* 2011;69(1):19–22.
30. Biggar WD, Gingras M, Fehlings DL, Harris V a, Steele C a. Deflazacort treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr.* 2001;138(1):45–50.
31. Angelini C. The role of corticosteroids in muscular dystrophy: a critical appraisal. *Muscle Nerve.* 2007;36(4):424–35.
32. Angelini C, Peterle E. Old and new therapeutic developments in steroid treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol.* 2012;31(1):9–15.
33. Moxley RT, Ashwal S, Pandya S, Connolly a, Florence J, Mathews K, et al. Practice parameter: corticosteroid treatment of Duchenne dystrophy: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology.* 2005;64(1):13–20.
34. Biggar WD, Harris VA, Eliasoph L, Alman B. Long-term benefits of deflazacort treatment for boys with Duchenne muscular dystrophy in their second decade. *Neuromuscul Disord.* 2006;16(4):249–55.
35. PIERRE S, Chakkalakal J. Glucocorticoid treatment alleviates dystrophic myofiber pathology by activation of the calcineurin/NF-AT pathway. *FASEB J.* 2004;23(Dmd):1–23.
36. Campbell C, Jacob P. Deflazacort for the treatment of Duchenne Dystrophy: a systematic review. *BMC Neurol.* 2003;10:1–10.
37. Kotelnikova E, Shkrob MA, Pyatnitskiy MA, Ferlini A, Daraselia N. Novel approach to meta-analysis of microarray datasets reveals muscle remodeling-related drug targets and biomarkers in Duchenne muscular dystrophy. *PLoS Comput Biol.* 2012;8(2);e1002365:1-10.
38. Fraser AG, Vinereanu D, Rogers MT. Subclinical cardiac involvement in myotonic dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 2004;14(10):695–6.
39. Strober JB. Therapeutics in duchenne muscular dystrophy. *NeuroRx.* 2006;3(2):225–34.
40. Manzur AY, Muntoni F. Diagnosis and new treatments in muscular dystrophies. *Postgrad Med J.* 2009;85(1009):622–30.
41. Lynn S, Aartsma-Rus A, Bushby K, Furlong P, Goemans N, De Luca A, et al. Measuring clinical effectiveness of medicinal products for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 2014;44:1–10.

42. Liu D, Ahmet A, Ward L, Krishnamoorthy P, Mandelcorn ED, Leigh R, et al. A practical guide to the monitoring and management of the complications of systemic corticosteroid therapy. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2013;9(1):30.
43. Escolar DM, Hache LP, Clemens PR, Cnaan a, McDonald CM, Viswanathan V, et al. Randomized, blinded trial of weekend vs daily prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*. 2011;77(5):444–52.
44. Connolly AM, Schierbecker J, Renna R, Florence J. High dose weekly oral prednisone improves strength in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 2002;12(10):917–25.
45. Kinali M, Mercuri E, Main M, Muntoni F, Dubowitz V. An effective, low-dosage, intermittent schedule of prednisolone in the long-term treatment of early cases of Duchenne dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 2002;12 Suppl 1:S169–74.
46. Houde S, Filiatrault M, Fournier A, Dubé J, D'Arcy S, Bérubé D, et al. Deflazacort use in Duchenne muscular dystrophy: an 8-year follow-up. *Pediatr Neuro*. 2008;38(3):200–6.
47. Mayo AL, Craven BC, McAdam LC, Biggar WD. Bone health in boys with Duchenne Muscular Dystrophy on long-term daily deflazacort therapy. *Neuromuscul Disord*. 2012;22(12):1040–5.
48. Biggar WD, Politano L, Harris V a, Passamano L, Vajsar J, Alman B, et al. Deflazacort in Duchenne muscular dystrophy: a comparison of two different protocols. *Neuromuscul Disord*. 2004;14(8-9):476–82.
49. Markham LW, Kinnett K, Wong BL, Woodrow Benson D, Cripe LH. Corticosteroid treatment retards development of ventricular dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 2008;18(5):365–70.
50. Bachrach L. Taking steps towards reducing osteoporosis in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 2005;15:86–7.
51. Biggar W, Bachrach L. Bone health in Duchenne muscular dystrophy: a workshop report from the meeting in Cincinnati, Ohio, July 8, 2004. *Neuromuscul Disord*. 2005;15:80–5.
52. Bianchi ML, Morandi L, Andreucci E, Vai S, Frasukiewicz J, Cottafava R. Low bone density and bone metabolism alterations in Duchenne muscular dystrophy: response to calcium and vitamin D treatment. *Osteoporos Int*. 2011;22(2):529–39.
53. Bianchi ML, Biggar D, Bushby K, Rogol AD, Rutter MM, Tseng B. Endocrine aspects of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 2011;21(4):298–303.
54. Bothwell J, Gordon K. Vertebral fractures in boys with Duchenne muscular

- dystrophy. *Clin Pediatr*. 2003;42(4):353-6.
55. Van Staa TP, Leufkens HGM, Cooper C. The epidemiology of corticosteroid-induced osteoporosis: a meta-analysis. *Osteoporos Int*. 2002;13(10):777-87.
 56. Söderpalm A, Magnusson P. Low bone mineral density and decreased bone turnover in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 2007;17:919-28.
 57. Rufo A, Del Fattore A, Capulli M, Carvello F, De Pasquale L, Ferrari S, et al. Mechanisms inducing low bone density in Duchenne muscular dystrophy in mice and humans. *J Bone Miner Res*. 2011;26(8):1891-903.
 58. Patrício J, Oliveira P, Faria M. Osteoporose induzida por corticóides. *Arq Med*. 2006;5/6(20):173-8.
 59. Carmel AS, Bockman RS. Vitamin D and bisphosphonate response. *Osteoporos Int*. 2014;25(8):2155.
 60. Hawker GA, Ridout R, Harris VA, Chase CC, Fielding LJ, Biggar WD. Alendronate in the treatment of low bone mass in steroid-treated boys with Duchennes muscular dystrophy. *Arch Phys Med Rehabil*. 2005;86(2):284-8.
 61. Gordon KE, Dooley JM, Sheppard KM, MacSween J, Esser MJ. Impact of bisphosphonates on survival for patients with Duchenne muscular dystrophy. *Pediatrics*. 2011;127(2):e353-8.
 62. Russell RGG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone*. 2011;49(1):2-19.
 63. García-Bustínduy M, Gantes M a. Corticoides y osteoporosis. *Actas Dermosifiliogr*. 2007;98(8):526-30.
 64. Fleisch H. Development of bisphosphonates. *Breast Cancer Res*. 2002;4(1):30-4.
 65. Kirschner J, Schessl J, Schara U, Reitter B, Stettner GM, Hobbiebrunken E, et al. Treatment of Duchenne muscular dystrophy with ciclosporin A: a randomised, double-blind, placebo-controlled multicentre trial. *Lancet Neurology*. 2010;9(11):1053-9.
 66. Cossu G, Sampaolesi M. New therapies for Duchenne muscular dystrophy: challenges, prospects and clinical trials. *Trends Mol Med*. 2007;13(12):520-6.
 67. Griggs RC. Duchenne muscular dystrophy: an important negative trial. *Lancet Neurology*. 2010;9(11):1038-9.
 68. Kley RA, Tarnopolsky MA, Vorgerd M. P3.54 Creatine for treating muscle disorders: meta-analysis of randomised controlled trials. *Neuromuscul Disord*. 2010; 20(9-10):657-8.

69. Restrepo S. New treatment alternatives for Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neurology*. 2004;10–1.
70. Muir LA, Chamberlain JS. Emerging strategies for cell and gene therapy of the muscular dystrophies. *Expert Rev Mol Med*. 2009;11:e18.
71. Deconinck AE, Rafael JA, Skinner JA, Brown SC, Potter AC, Metzinger L, et al. Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell*. 1997;90(4):717–27.
72. Wilton SD, Fletcher S, Flanigan KM. Dystrophin as a therapeutic biomarker: are we ignoring data from the past? *Neuromuscul Disord*. 2014;24(6):463–6.
73. Pegoraro E, Hoffman EP, Piva L, Gavassini BF, Cagnin S, Ermani M, et al. SPP1 genotype is a determinant of disease severity in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*. 2011;18;76(3):219–26.
74. Brunelli S, Rovere-Querini P. The immune system and the repair of skeletal muscle. *Pharmacol Res*. 2008;58(2):117–21.
75. Steeve KT, Marc P, Sandrine T, Dominique H, Yannick F. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15(1):49–60.
76. Kinali M, Main M, Eliahoo J, Messina S, Knight RK, Lehovsky J, et al. Predictive factors for the development of scoliosis in Duchenne muscular dystrophy. *Eur J Paediatr Neurol*. 2007;11(3):160–6.
77. Bianchi ML, Mazzanti a, Galbiati E, Saraifoger S, Dubini a, Cornelio F, et al. Bone mineral density and bone metabolism in Duchenne muscular dystrophy. *Osteoporos Int*. 2003;14(9):761–7.
78. Report S. Assessmente of Whole Body Composition With X-Ray Absorptiometry in Duchenne Muscular Dystrophy : Correlation of Lean Body Mass. *Muscle Nerve*. 1996;19:777–9.
79. Larson CM, Henderson RC. Bone mineral density and fractures in boys with Duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr Orthop*. 2000;20(1):71–4.
80. Aparicio LF, Jurkovic M, DeLullo J. Decreased bone density in ambulatory patients with duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr Orthop*. 2002;22(2):179–81.
81. Louis A, Lebacq J, Poortmans JR, Belpaire-Dethiou MC, Devogelaer JP, Van Hecke P, et al. Beneficial effects of creatine supplementation in dystrophic patients. *Muscle and Nerve*. 2003;27(5):604–10.
82. Douvillez B, Braillon P, Hodgkinson I, Berard C. Douleur, ostéopénie et composition corporelle chez 22 patients atteints de dystrophie musculaire progressive de Duchenne: Étude descriptive. *Ann Readapt Med Phys*.

- 2005;48(8):616–22.
83. Söderpalm AC, Magnusson P, Ahlander AC, Karlsson J, Kroksmark a K, Tulinius M, et al. Bone markers and bone mineral density in Duchenne muscular dystrophy. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2008;8(1):24.
 84. Crabtree NJ, Roper H, McMurchie H, Shaw NJ. Regional changes in bone area and bone mineral content in boys with duchenne muscular dystrophy receiving corticosteroid therapy. *J Pediatr.* 2010;156(3):450–5.
 85. Söderpalm AC, Magnusson P, Ahlander AC, Karlsson J, Kroksmark AK, Tulinius M, et al. Bone mass development in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophies: A 4-year clinical follow-up. *Acta Paediatr Int J Paediatr.* 2012;101(4):424–32.
 86. King WM, Kissel JT, Visy D, Goel PK, Matkovic V. Skeletal health in Duchenne dystrophy: Bone-size and subcranial dual-energy X-ray absorptiometry analyses. *Muscle and Nerve.* 2014;49(4):512–9.
 87. Vuillerot C, Braillon P, Fontaine-Carbonnel S, Rippert P, André E, Iwaz J, et al. Influence of a two-year steroid treatment on body composition as measured by dual X-ray absorptiometry in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 2014;24(6):467–73.
 88. Houston C, Mathews K, Shibli-Rahhal A. Bone density and alendronate effects in Duchenne muscular dystrophy patients. *Muscle Nerve.* 2014;49(4):506–11.
 89. Tian C, Wong B, Hornung L, Khoury J, Miller L, Bange J, et al. G.P.171. *Neuromuscul Disord.* 2014;24(9-10):857.
 90. Joyce NC, Hache LP, Clemens PR. Bone health and associated metabolic complications in neuromuscular diseases. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 2012;23(4):773–99.
 91. Quinlivan R, Roper H, Davie M, Shaw NJ, McDonagh J, Bushby K. Report of a Muscular Dystrophy Campaign funded workshop Birmingham, UK, January 16th 2004. Osteoporosis in Duchenne muscular dystrophy; its prevalence, treatment and prevention. *Neuromuscul Disord.* 2005;15(1):72–9.
 92. Cheung WW, Zhan JY, Paik KH, Mak RH. The impact of inflammation on bone mass in children. *Pediatr Nephrol.* 2011;26:1937–46.
 93. Sheng MHC, Lau KHW, Baylink DJ. Role of Osteocyte-derived Insulin-Like Growth Factor I in Developmental Growth, Modeling, Remodeling, and Regeneration of the Bone. *J bone Metab.* 2014;21:41–54.
 94. Teitelbaum S. Bone resorption by osteoclasts. *Science.* 2000;289:1504–9.
 95. Crabtree NJ, Arabi A, Bachrach LK, Fewtrell M, El-Hajj Fuleihan G, Kecskemethy HH, et al. Dual-energy X-ray absorptiometry interpretation and reporting in children and adolescents: the revised 2013 ISCD Pediatric Official

- Positions. *J Clin Densitom.* 2014;17(2):225–42.
96. Bianchi M. How to manage osteoporosis in children. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2005;19(6):991–1005.
 97. Quinlivan R, Shaw N, Bushby K. 170th ENMC International Workshop: bone protection for corticosteroid treated Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 2010;20(11):761–9.
 98. Brandão CMA, Camargos BM, Zerbini CA, Plapler PG, Mendonça LMDC, Albergaria B-H, et al. Posições oficiais 2008 da Sociedade Brasileira de Densitometria Clínica (SBDens). *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009;53(1):107–12.
 99. Updates C. Clinical Updates. *J Gen Intern Med.* 2013;19(s1):14–5.
 100. Jürimäe J. Interpretation and application of bone turnover markers in children and adolescents. *Curr Opin Pediatr.* 2010;22(4):494–500.
 101. Bandeira F, Costa AG, Soares Filho MA, Pimentel L, Lima L, Bilezikian JP. Bone markers and osteoporosis therapy. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2014;58(5):504–13.
 102. Christenson RH. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clin Biochem.* 1997;30(8):573–93.
 103. Van Straalen JP, Sanders E, Prummel MF, Sanders GT. Bone-alkaline phosphatase as indicator of bone formation. *Clin Chim Acta.* 1991;201(1-2):27–33.
 104. US Department of Health and Human Services. Bone health and osteoporosis: a report of the Surgeon General. *US Heal Hum Serv.* 2004;1-437.
 105. Misra M, Pacaud D, Petryk A, Collett-Solberg PF, Kappy M. Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendations. *Pediatrics.* 2008;122(2):398–417.
 106. Zhang R, Naughton DP. Vitamin D in health and disease: current perspectives. *Nutr J.* 2010;9(1):65.
 107. Berndt TJ, Schiavi S, Kumar R. “Phosphatonins” and the regulation of phosphorus homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;289(6):F1170–82.
 108. Filho M, Damiani C. Hypophosphatemic Rickets and Osteomalacia. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006;50:802–13.
 109. Wesseling-Perry K. FGF-23 in bone biology. *Pediatr Nephrol.* 2010;25(4):603–8.
 110. Alves M, Bastos M, Leitão F. Vitamina D—importância da avaliação laboratorial. *Rev Port Endocrinol Diabetes Metab.* 2013;8(1):32–9.

111. Sakuma M, Endo N, Oinuma T. Serum 25-OHD insufficiency as a risk factor for hip fracture. *J Bone Miner Metab.* 2007;25:147–50.
112. Cranney A, Horsley T, O'Donnell S, Weiler H, Puil L, Ooi D, et al. Effectiveness and safety of vitamin D in relation to bone health. *Evid Rep Technol Assess.* 2007;(158):1–235.
113. O'Brien C a., Plotkin LI, Galli C, Goellner JJ, Gortazar AR, Allen MR, et al. Control of bone mass and remodeling by PTH receptor signaling in osteocytes. *PLoS One.* 2008;3(8).
114. Pacifici R. The immune system and bone. *Arch Biochem Biophys.* 2010 1;503(1):41–53.
115. Penido MGMG, Diniz JSS, Guimarães MMM, Cardoso RB, Souto MFDO, Penido MG. Excreção urinária de cálcio, ácido úrico e citrato em crianças e adolescentes saudáveis. *J Pediatr.* 2002;78(2):153–60.
116. Adelaide M, Schor N. Valores de referência de parâmetros urinários envolvidos na litogênese. *J Bras Nefrol.* 1996;18(2):124–9.
117. Zuckerman JM, Assimios DG. Hypocitratúria: pathophysiology and medical management. *Rev Urol.* 2009;11(3):134–44.
118. Canalis E, Bilezikian JP, Angeli A, Giustina A. Perspectives on glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone.* 2004;34(4):593–8.
119. Van Staa TP, Leufkens HG, Abenhaim L, Zhang B, Cooper C. Oral corticosteroids and fracture risk: relationship to daily and cumulative doses. *Rheumatology.* 2000;39(12):1383–9.
120. Van Staa TP, Cooper C, Leufkens HGM, Bishop N. Children and the risk of fractures caused by oral corticosteroids. *J Bone Miner Res.* 2003;18(5):913–8.
121. Mazziotti G, Angeli A, Bilezikian JP, Canalis E, Giustina A. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. *Trends Endocrinol Metab.* 2006;17(4):144–9.
122. Leonard MB, Elmi A, Mostoufi-Moab S, Shults J, Burnham JM, Thayu M, et al. Effects of sex, race, and puberty on cortical bone and the functional muscle bone unit in children, adolescents, and young adults. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(4):1681–9.
123. Penido MGMG, Alon US. Phosphate homeostasis and its role in bone health. *Pediatr Nephrol.* 2012;27(11):2039–48.
124. Fratzl P, Gupta HS. Mechanisms of Bone Deformation and Fracture. *Handb Biomater Biol Asp Struct Form.* 2008;1(2010):397–414.
125. Kelly TL, Wilson KE, Heymsfield SB. Dual energy X-ray absorptiometry body composition reference values from NHANES. *PLoS One.* 2009;4(9):2–9.

126. Morden NE, Schpero WL, Zaha R, Sequist TD, Colla CH. Overuse of short-interval bone densitometry: assessing rates of low-value care. *Osteoporos Int.* 2014;25(9):2307–11.
127. Williams J, Wilson C, Biassoni L, Suri R, Fewtrell M. Dual energy x-ray absorptiometry and quantitative ultrasound are not interchangeable in diagnosing abnormal bones. 2012;822–4.

3- OBJETIVOS:

O principal objetivo desse trabalho foi avaliar os marcadores tradicionais do metabolismo mineral ósseo em crianças e adolescentes portadoras da Distrofia Muscular de Duchenne (DMD).

Objetivos específicos:

- a. Avaliar a densidade mineral óssea (DMO) dos pacientes pediátricos com DMD por meio da densitometria óssea;
- b. Avaliar os marcadores sanguíneos de remodelação óssea: cálcio, fósforo, 25OH vitamina D, paratormônio (PTH), fosfatase alcalina, dos pacientes pediátricos com DMD;
- c. Avaliar os marcadores urinários de remodelação óssea: cálcio, fósforo e citrato dos pacientes pediátricos com DMD;
- d. Comparar a DMO dos pacientes pediátricos com DMD com aquela dos controles pareados por idade;
- e. Comparar os marcadores sanguíneos e urinários de remodelação óssea dos pacientes pediátricos com DMD com controles pareados por idade;
- f. Verificar se existe correlação entre os marcadores de remodelação óssea sanguíneos e urinários com a densitometria óssea dos pacientes pediátricos com DMD.

4- PACIENTES E MÉTODOS:

4.1. DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de estudo observacional, de corte transversal, com amostra não probabilística desenvolvido no Ambulatório de Neurologia Pediátrica da Unidade de Neurologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. A amostra que incluiu inicialmente 39 pacientes com diagnóstico de Distrofia Muscular de Duchenne e 13 indivíduos saudáveis, pareados por idade, como grupo controle.

4.2. PACIENTES

4.2.1 Critérios de Inclusão

Foram inicialmente recrutadas 39 crianças e adolescentes com diagnóstico estabelecido de Distrofia Muscular de Duchenne que estavam em acompanhamento regular no Ambulatório de Neurologia Pediátrica da Unidade de Neurologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFMG durante o período de janeiro de 2013 a Dezembro de 2014. O diagnóstico de DMD foi realizado de acordo com os critérios estabelecidos pela literatura internacional, que consideram portadores de DMD os pacientes que apresentam confirmação da ausência do gene da distrofina através de DNA ou biópsia muscular (1,2). Foram incluídos pacientes com idade menor ou igual a 20 anos e que estivessem ou não em uso de medicação no momento da entrevista. Desses 39 pacientes, 10 se recusaram a participar do estudo, portanto, 29 pacientes com DMD que compreenderam e concordaram em participar do estudo assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foram avaliados.

4.2.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos os pacientes que apresentavam doenças ou utilizavam medicamentos outros que poderiam interferir na excreção urinária de cálcio ou no metabolismo ósseo, tais como: alterações ósteo-metabólicas antes do diagnóstico da DMD (hiperparatireoidismo, hipercalcemia etc). Foram excluídos também aqueles agudamente enfermos ou em uso de fármacos que poderiam induzir alterações ósteo-metabólicas (beta-bloqueadores, tiazídicos, hormônio de crescimento etc)

4.2.3 Controles

O grupo controle foi composto por 13 crianças e adolescentes hígidos do sexo masculino, com idade menor ou igual a 20 anos, pareados pela faixa etária com o grupo com DMD, que foram recrutados no Ambulatório de Pediatria do Hospital das Clínicas da UFMG, anexo Bias Fortes, e que foram rastreados para doenças agudas e crônicas. A ausência de doença aguda ou crônica atual foi determinada por meio de anamnese, exame físico e exames laboratoriais. Os critérios de exclusão foram: história progressiva de condição que pudesse ser prejudicial para a saúde óssea (prematuridade extrema ou doença grave, por exemplo), apresentar baixo peso, baixa estatura, sobrepeso ou obesidade, de acordo com as curvas de referência da Organização Mundial da Saúde (OMS) e fazer uso de medicamentos com ação no metabolismo mineral ósseo.

4.2.4 Grupos e Subgrupos

Além do grupo de pacientes (DMD) e do grupo controle (C), o grupo de pacientes (DMD) foi subdividido em 4 subgrupos:

- DMD1: subgrupo de pacientes cadeirantes
- DMD2: Subgrupo de pacientes não cadeirantes
- DMD3: subgrupo de pacientes em uso de corticoide
- DMD4: subgrupo de pacientes sem uso de corticoide

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Protocolo do Estudo

A coleta de dados foi realizada pela pesquisadora em 2 etapas: avaliação clínica, exames complementares e consulta a prontuários quando necessário.

Consistiu em:

- Avaliação clínica e anamnese dirigida realizadas pela pesquisadora utilizando questionários estruturados com investigação dos seguintes dados (Anexo 1):
 - Idade, data do diagnóstico e método do diagnóstico;
 - Cadeirante ou não cadeirante e há quanto tempo;
 - História de fraturas, de cirurgias ortopédicas e de escoliose;

- Medicamentos em uso (corticoide, vitamina D) e por quanto tempo;
 - Uso de bipap;
 - Presença ou não de alterações metabólicas antes do diagnóstico;
 - Presença ou não de doença aguda.
- Coleta de sangue para dosagem de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina total, ureia, creatinina, 25OH vitamina D e paratormônio (PTH).
 - Coleta de amostra de urina de 24 horas para dosagem de cálcio, citrato, fosfato e creatinina.
 - Realização de Densitometria Óssea pela técnica da absorciometria por dois fótons de raios X (DXA).

4.3.1.1 Avaliação clínica e antropométrica

Dados como data do diagnóstico, método do diagnóstico, idade de início do corticoide, dose, tempo de tratamento e adesão ao tratamento foram obtidos dos prontuários dos pacientes. Duas ou mais fraturas no mesmo osso, causadas pelo mesmo trauma, foram contabilizadas como uma fratura.

Os dados antropométricos foram obtidos com as crianças descalças e usando roupas leves. O peso (P) foi aferido em balança digital eletrônica, marca Welmy®, modelo W 200 LS, com capacidade máxima para 200 quilogramas (Kg), e registrado em Kg, com variação em gramas. Para pacientes que não deambulavam, foi obtido através da diferença entre o P do paciente carregado por um familiar e o P do familiar^{2,3}.

A estatura (E) dos pacientes que deambulavam foi aferida em antropômetro vertical, acoplado à balança, e registrado em metros (m), com variação em centímetros (cm), com os pacientes descalços, em pé, calcanhares juntos, costas retas e braços estendidos ao lado do corpo³. Para indivíduos que haviam perdido a marcha, estimou-se a medida por meio da envergadura dos braços, conforme recomendado por Bushby et al (2010) e Stewart et al (2005)^{2,4}. Para a estimativa da E, os meninos mantiveram os braços estendidos, formando um ângulo de 90° com o corpo. Mediu-se a distância entre os dedos médios das mãos, utilizando-se uma fita métrica flexível^{5,6}.

Os dados de P e E foram transferidos para Programa da Organização Mundial de

Saúde (OMS) Anthro® (versão 3.2.2) e WHO Anthro Plus, versão 1.0.4., que realizou o cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC), dividindo-se o P, em Kg, pela E, em m, elevada ao quadrado, com subsequente definição dos escores-Z dos índices antropométricos: índice de massa corporal por idade (IMC/I) e estatura por idade (E/I). Utilizou-se como referência antropométrica as curvas de crescimento da OMS para crianças acima de 5 anos de idade^{3,7}.

4.3.1.2 Coleta e Processamento das amostras

A coleta de sangue foi realizada no Laboratório Central do Hospital das Clínicas-UFMG, em veia periférica, entre 9 e 11 horas da manhã, após jejum de oito a 12 horas. As análises séricas do cálcio total, fósforo e ureia foram realizadas pelo método colorimétrico; da creatinina e fosfatase alcalina total pelo método cinético enzimático, todos no aparelho *Vitros 5600*, da *Johnson & Johnson* (Rochester, NY, EUA). A dosagem do PTH foi realizada pelo método de eletroquímioiluminescência e as dosagens de 25OH vitamina D foram feitas pelo método de quimioiluminescência, ambos no equipamento da *Liaison da DiaSorin*®, (Saluggia, Itália), em laboratório terceirizado (NASA em São Paulo). Os valores de referência disponibilizados pelos laboratórios estão listados no quadro abaixo.

Quadro 1 - Valores de referência dos parâmetros laboratoriais séricos avaliados de acordo com a faixa etária estudada

Parâmetros	Valores de Referência
Cálcio total	8,4 a 10,2 mg/dl
Fósforo	3,3 a 5,4 mg/dl
Ureia	19 a 43 mg/dl
Creatinina	0,66 a 1,25mg/dl
Fosfatase alcalina total	38 a 126 U/l
25OH vitamina D	Deficiência: abaixo de 10 ng/ml, Insuficiência: 10 a 30 ng/ml; Suficiência: 30 a 100 ng/ml, Toxicidade: maior que 100 ng/ml
PTH	16 a 65 pg/ml

O valor limiar e até a nomenclatura utilizada para descrever o déficit de 25OH vitamina D é controverso, sendo usadas várias denominações por diferentes autores. No entanto, existe uma concordância de opiniões que estabelece como baixo um valor

de 25OH vitamina D inferior a 30-32 ng/ml^{8,9}. Existem duas razões para que o limite inferior dos valores normais de 25OH vitamina D seja 30 ng/ml, embora, isto possa ser questionável. Primeiro, está demonstrado que é abaixo deste valor que os níveis de PTH se elevam; segundo, a absorção ativa de cálcio é ideal quando o nível de 25OH vitamina D é 30 ng/ml. Os níveis séricos ideais de 25OH vitamina D são aqueles para os quais a absorção de cálcio está otimizada, os níveis de PTH reduzidos e são obtidos os maiores benefícios para o osso e para a função muscular^{8,10-12}.

As análises urinárias de cálcio, fósforo, creatinina e citrato foram realizadas em urina 24h, com o paciente sendo orientado sobre os cuidados da coleta. A coleta propriamente dita foi feita do seguinte modo: esvaziou-se a bexiga pela manhã, coletou-se o volume de todas as urinas posteriores à primeira micção, incluindo o período noturno, e a primeira micção do dia seguinte. A urina foi mantida refrigerada até a entrega para a análise no laboratório. A dosagem de cálcio e fósforo urinários foi realizada através do método colorimétrico; a dosagem de creatinina urinária foi feita através do método cinético enzimático, todos no laboratório do HC-UFG; e a dosagem de citrato urinário foi realizada pelo método da espectrofotometria em laboratório terceirizado (NASA). Os valores de referência disponibilizados pelos laboratórios estão listados no quadro abaixo (Quadro 2).

Quadro 2 - Valores de referência dos parâmetros laboratoriais urinários avaliados de acordo com a faixa etária estudada

Parâmetros	Valores de Referência
Cálcio Urina 24 horas	4 mg/Kg
Fósforo Urina 24 horas	400 – 1300 mg
Creatinina Urina 24 horas	2 a 3 anos = 6 a 22 mg/Kg > 3 anos = 12 a 30 mg/Kg
Citrato Urina 24 horas	320 a 1240 mg

4.3.1.3 Avaliação da massa óssea

O método de avaliação da integridade óssea foi a densitometria óssea, que foi realizada fora do HC-UFG, no Sistema Único de Saúde (SUS), sempre no mesmo lugar. A técnica utilizada foi a absorciometria por dois fótons de raios X (DXA), utilizando-se o aparelho de emissão de fótons com fonte de Raio X Lunar DPX – IQ 2516. Empregou-se fonte de raio X de 76 KeV, filtro de atenuação e analisador de pulso no detector, que decompõe os fotos em dois componentes de alta e baixa energia.

O princípio da técnica de medida da densidade mineral óssea (DMO) é a mensuração da quantidade mineral óssea de determinada região através da diferença de absorção de Raios X de duas diferentes energias sobre o corpo. Utilizando os diferentes níveis de absorção é possível avaliar a profundidade e composição de tecidos e gerar medições de massa gorda e magra. As medições podem ser feitas de todo o corpo como bem de regiões como a coluna lombar, quadril e rádio distal. A escolha do local pode ser importante devido às diferenças nas proporções de osso trabecular e cortical. Algumas condições como perda de massa óssea induzida por corticoide afetam predominantemente o osso trabecular e, portanto, será visível primeiramente na coluna lombar^{13,14}.

Para a avaliação da coluna lombar o paciente foi examinado em posição de decúbito dorsal com elevação parcial dos membros inferiores, objetivando a retificação da coluna e uma ótima separação das vértebras lombares¹⁵. As medidas densitométricas foram obtidas e interpretadas de acordo com as recomendações da International Society for Clinical Densitometry¹⁴. A coluna lombar (CL) entre as vértebras L1 e L4 foi avaliada e foram obtidos os parâmetros de sua área óssea (DMOa CL; em cm²) e o conteúdo mineral ósseo (CMO CL; em g) e calculou-se a densidade mineral óssea volumétrica estimada (DMOv CL; em g/m³), utilizando-se a fórmula: $DMOv\ CL = CMO\ CL \div \text{Área (DMOa) CL}$. Esse modelo matemático foi proposto por Carter e colaboradores^{13,14}, assumindo-se que a vértebra tenha um formato cuboide e o objetivo do cálculo é obter uma medida de densidade que sofra menos influência do tamanho corporal e que é mais apropriada para a avaliação da criança e do adolescente em crescimento. Os valores da DMOa CL foram expressos em escore-Z para idade, utilizando-se as curvas de referência pediátricas da National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2008, disponibilizadas pelo software do aparelho¹⁶.

O termo “status mineral ósseo”, já empregado por outros autores, foi utilizado para descrever a saúde óssea avaliada pela DXA (17). O indivíduo foi considerado como tendo baixo status mineral ósseo quando o escore-Z da DMO era menor ou igual a -2 desvios padrão, de acordo com dados referenciados na literatura¹⁸.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As informações obtidas na avaliação clínica e os resultados de exames foram

registrados em planilhas específicas de banco de dados (plataforma Windows Excel, 2000, Microsoft Corp, Redmont, USA) para então serem analisados.

As variáveis quantitativas foram descritas como média e desvio padrão (DP) quando tinham distribuição normal e mediana e intervalo interquartil (IQR=Q3-Q1) quando não tinham distribuição normal. A normalidade das variáveis foi verificada pelo Teste de Shapiro Wilk.

As comparações entre duas variáveis quantitativas foram realizadas pelos testes T de Student (quando tinham distribuição normal) e teste de Mann Whitney (quando distribuição não normal). O teste T univariado foi utilizado para comparar médias dos escores-Z com populações de referência. Para comparar o desvio-padrão (variabilidade) entre dois grupos foi utilizado o teste de Levine.

As variáveis qualitativas foram expressas em frequências absolutas e porcentagem. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste Qui-Quadrado de Pearson Assintótico (20% dos valores esperados estavam entre 1 e 5 e 80% maiores ou iguais a 5) e pelo teste Qui-quadrado Exato de Fisher.

Para análise de associação entre variáveis quantitativas do estudo, utilizou-se o teste de correlação de Pearson quando as variáveis tinham distribuição normal e o teste de correlação de Spearman (teste não-paramétrico) quando não tinham distribuição normal. Este teste é interpretado da seguinte maneira:

$R > 0$: indica relação direta, ou seja, um aumento em X é acompanhado por um aumento em Y.

$R < 0$: indica relação indireta, ou seja, um aumento em X é acompanhado por um decréscimo em Y.

Um alto valor de R (negativo ou positivo) – próximo de 1 ou -1 – representa forte relação linear, enquanto que um valor próximo de zero mostra que esta relação é fraca.

Todos os resultados foram considerados significativos a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Os escores-Z de altura e IMC para idade foram obtidos a partir das curvas de referência da OMS (7) utilizando os programas WHO Anthro® (versão 3.2.2) e WHO Anthro Plus® (versão 1.0.4). O escore-Z é um indicador antropométrico recomendado pela OMS para monitorizar a nutrição e seu valor representa o número de desvios padrão (DP) da média cuja faixa de normalidade para peso e estatura varia de +1 a -2⁷.

Os testes foram utilizados para análise dos parâmetros clínicos e antropométricos, sanguíneos, urinários e da densitometria óssea entre os grupos: grupo DMD (Pacientes com DMD) e C (Controles). As mesmas avaliações foram realizadas entre os Subgrupos DMD1 (Pacientes com DMD cadeirantes) e DMD2 (Pacientes com DMD não cadeirantes), e entre os Subgrupos DMD3 (pacientes com DMD com história de uso de corticoide) e DMD4 (pacientes com DMD sem história de uso de corticoide).

4.5. ASPECTOS ÉTICOS

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFMG aprovou o estudo mediante parecer de número 451.012 (ANEXO 1). Todos os participantes e seus responsáveis foram esclarecidos sobre a natureza do estudo por meio da leitura e análise do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os pacientes portadores de DMD e as crianças e adolescentes saudáveis foram incluídos no estudo somente mediante concordância e assinatura do TCLE por parte do responsável e do próprio paciente, conforme a idade (ANEXO 2).

O protocolo de pesquisa não interferiu com qualquer recomendação ou prescrição médica. Ressalta-se ainda, que o seguimento clínico-laboratorial e a abordagem terapêutica dos pacientes foram assegurados, mesmo no caso de recusa em participar do estudo. Além disso, após os resultados da avaliação clínico-laboratorial, todos os participantes foram orientados e tratados de acordo com a necessidade.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurology*. 2010;9(1):77–93.
2. Bushby K, Finkel R, Birnkrant D. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. *Lancet Neurology*. 2010;9(2):177–89.
3. Brasil. Orientações para coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde. Ministério da Saúde. 2011.
4. Stewart L, Houghton J, Hughes AR, Pearson D, Reilly JJ. Dietetic management of pediatric overweight: Development and description of a practical and

- evidence-based behavioral approach. *J Am Diet Assoc.* 2005;105(11):1810–5.
5. Welch TR. Growth in Duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr.* 2013;163(6):1537–9.
 6. Sarrazin E, Hagen M Von Der, Schara U, Von Au K, Kaindl AM. Growth and psychomotor development of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Eur J Paediatr Neurology.* 2014;18(1):38–44.
 7. Mercedes, DO. The new WHO child growth standards. *Paediatr Croat Suppl.* 2008;52(S1):13–7.
 8. Alves M, Bastos M, Leitão F. Vitamina D—importância da avaliação laboratorial. *Rev Port Endocrinol Diabetes Metabol.* 2013;8(1):32–9.
 9. Hollis BW. Assessment of vitamin D status and definition of a normal circulating range of 25-hydroxyvitamin D. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2008;15(6):489–94.
 10. Cranney A, Horsley T, O'Donnell S, Weiler H, Puil L, Ooi D, et al. Effectiveness and safety of vitamin D in relation to bone health. *Evid Rep Technol Assess.* 2007;(158):1–235.
 11. Holick MF, Bischoff-Ferrari H, Gordon C, Hanley D. Guidelines Evaluation , Treatment , and Prevention of Vitamin D Deficiency : *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(7):1911–30.
 12. Misra M, Pacaud D, Petryk A, Collett-Solberg PF, Kappy M. Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendations. *Pediatrics.* 2008;122(2):398–417.
 13. Fewtrell MS. Bone densitometry in children assessed by dual x ray absorptiometry: uses and pitfalls. *Arch Dis Child.* 2003;88(9):795–8.
 14. Crabtree NJ, Arabi A, Bachrach LK, Fewtrell M, El-Hajj Fuleihan G, Kecskemethy HH, et al. Dual-energy X-ray absorptiometry interpretation and reporting in children and adolescents: the revised 2013 ISCD Pediatric Official Positions. *J Clin Densitom.* 2014;17(2):225–42.
 15. Del Rio L, Carrascosa a, Pons F, Gusinyé M, Yeste D, Domenech FM. Bone mineral density of the lumbar spine in white Mediterranean Spanish children and adolescents: changes related to age, sex, and puberty. *Pediatr Res.* 1994;35(3):362–6.
 16. Kelly TL, Wilson KE, Heymsfield SB. Dual energy X-ray absorptiometry body composition reference values from NHANES. *PLoS One.* 2009;4(9):2–9.
 17. Bonnick SL, Johnston CC, Kleerekoper M, Lindsay R, Miller P, Sherwood L, et al. Importance of precision in bone density measurements. *J Clin Densitom.* 2001;4(2):105–10.

18. Williams J, Wilson C, Biassoni L, Suri R, Fewtrell M. Dual energy x-ray absorptiometry and quantitative ultrasound are not interchangeable in diagnosing abnormal bones. 2012;822-4.

5- ARTIGO 2:

ARTIGO ORIGINAL: Avaliação dos Marcadores do Metabolismo Mineral Ósseo em Pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne

RESUMO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença muscular progressiva, ligada ao cromossomo X, causada por mutações no gene da distrofina, culminando em fraqueza muscular progressiva. As manifestações clínicas começam na infância e a fraqueza muscular torna-se evidente por volta dos 5 anos de idade. Apesar do rápido avanço, essa doença ainda não possui cura. Os glicocorticoides (GC) são o pilar do tratamento, e, embora tenham ação benéfica, agem suprimindo a formação óssea. Assim, a saúde do osso é parte importante do cuidado desses pacientes. **Objetivos:** Avaliar os marcadores do metabolismo mineral ósseo em crianças e adolescentes com DMD, por meio de marcadores bioquímicos de formação e reabsorção óssea e avaliar a massa óssea pela densitometria óssea. **Metodologia:** Foram avaliadas 29 crianças e adolescentes com DMD em acompanhamento na Unidade de Neurologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFMG e 13 crianças e adolescentes hígdas, que constituíram o grupo controle. A análise laboratorial incluiu dosagem de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina, uréia, creatinina, 25OH vitamina D e paratormônio (PTH) no sangue, e coleta de amostra de urina de 24 horas para dosagem de cálcio, citrato, fosfato e creatinina. Para a análise estatística pacientes e controles foram pareados por idade e os pacientes foram divididos em subgrupos: cadeirantes e não cadeirantes e usuários e não usuários de corticoides. **Resultados:** Entre os cadeirantes e não cadeirantes foi observada diferença na idade, peso, estatura e presença de escoliose. A presença da escoliose foi observada em 48,3% e a história de fratura de ossos longos em 27,6% dos pacientes. Foram observados valores menores de 25OH vitamina D, creatinina e fosfatase alcalina séricas e da excreção de creatinina e citrato urinários, quando comparou-se pacientes e controles. Observou-se níveis séricos maiores de fósforo e da reabsorção tubular de fosfato (TP de fosfato) que aquele dos controles. Entre cadeirantes e não cadeirantes houve diferença para a creatinúria em mg/Kg/dia e TP de fosfato, e para o PTH. Entre os usuários e não usuários de corticoides apenas o PTH foi significativo. Os pacientes do estudo apresentaram um escore-Z da DMOa da coluna lombar (CL) reduzido em relação aos controles e não foi observada diferença entre os subgrupos. Foi observada correlação negativa entre a DMOa da CL e a citratúria mg/g creatinina em usuários de corticoide, entre a CMO da CL e fósforo sérico no grupo DMD e entre a CMO da CL e a citratúria mg/g creatinina no grupo que usou corticoide. **Conclusões:** Os pacientes com DMD apresentaram diferenças clínicas e laboratoriais e uma redução global da DMO em comparação com controles. Houve diferenças entre os cadeirantes e não cadeirantes com DMD e não houve diferença significativa entre o grupo com história de uso de GC e aquele sem história. Houve correlações negativas entre os sítios ósseos e a excreção urinária de citrato em mg/m² SC e mg/g de creatinina. Nossos resultados sugerem que as alterações metabólicas encontradas podem estar relacionadas à ausência da distrofina e que mais estudos são necessários.

Palavras-chave: Distrofia Muscular de Duchenne. Hormônio Paratireoidiano. Vitamina D. Cálcio. Fósforo. Citrato. Densidade Mineral Óssea. Glicocorticoides.

ABSTRACT

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a progressive X-linked muscle disease caused by mutations in the dystrophin gene, culminating in progressive muscle weakness. Clinical manifestations begin in childhood and muscle weakness becomes evident around 5 years of age. Despite the rapid advance, this disease has no cure yet. Glucocorticoids (CG) are the mainstay of treatment and, although beneficial, act by suppressing bone formation. Thus, bone health is an important part of the care of these patients. Objectives: To evaluate bone mineral metabolism markers in children and adolescents with DMD by means of biochemical markers of bone formation and resorption and to evaluate bone mass by bone densitometry. Methodology: Twenty-nine children and adolescents with DMD were followed-up at the Pediatric Neurology Unit of the Hospital das Clínicas of UFMG and 13 healthy children and adolescents, which constituted the control group. Laboratory analysis included blood calcium, phosphorus, alkaline phosphatase, urea, creatinine, 25OH vitamin D and parathyroid hormone (PTH) measurements, and 24-hour urine collection for calcium, citrate, phosphate, and creatinine measurements. For statistical analysis, patients and controls were age-matched and patients were divided into subgroups: wheelchair users and non-wheelchair users and users and non-users of corticosteroids. Results: Between wheelchair and non-wheelchair users, differences in age, weight, height and presence of scoliosis were observed. The presence of scoliosis was observed in 48.3% and the history of long bone fracture in 27.6% of patients. Lower values of 25OH serum vitamin D, creatinine and alkaline phosphatase and urinary creatinine and citrate excretion were observed when patients and controls were compared. Higher serum phosphorus and phosphate tubular reabsorption (phosphate TP) levels were observed than controls. Between wheelchair and non-wheelchair users there was a difference for creatinuria in mg / kg / day and phosphate TP, and for PTH. Among users and non-users of corticosteroids only PTH was significant. The study patients had a reduced lumbar spine BMD (CL) z-score compared to controls and no difference was observed between the subgroups. Correlation analysis showed a negative correlation between CL BMDa and creatinine citraturia mg / g in corticosteroid users, between CL BMC and serum phosphorus in the DMD group and between CL BMC and creatinine citraturia mg / g. group that used corticosteroids. Conclusions: Patients with DMD had clinical and laboratory differences and an overall reduction in BMD compared with controls. There were differences between wheelchair users and non-wheelchair users with DMD and there was no significant difference between the group with a history of GC use and the one with no history. There were negative correlations between bone sites and urinary citrate excretion in mg / m² SC and mg / g creatinine. Our results suggest that the metabolic alterations found may be related to the absence of dystrophin and that further studies are needed.

Keywords: Duchenne Muscular Dystrophy. Parathyroid hormone. Vitamin D. Calcium. Phosphor. Citrate. Bone mineral density. Glycorticoids.

5.1 Introdução

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é a forma mais comum e severa de distrofia muscular na infância, causada por uma mutação no gene da distrofina no braço curto do cromossoma X (local Xp21), que resulta em fraqueza muscular progressiva e debilitante¹⁻⁴. Afeta um em cada 3.000 a 6.000 nascimentos do sexo masculino^{1,5}, e embora as anormalidades musculares estejam presentes desde o nascimento, o aparecimento de sintomas clínicos e a progressão da doença variam de acordo com a mutação presente no gene^{2,6,7}.

As manifestações clínicas nos pacientes com DMD normalmente começam na infância, geralmente nos três primeiros anos de vida. A apresentação mais comum é o atraso dos marcos do desenvolvimento, com perturbações na marcha e dificuldade em levantar do chão. A fraqueza muscular torna-se evidente por volta dos cinco anos de idade, quando as crianças apresentam sintomas iniciais, tais como dificuldade de deambular, pular e correr, além de quedas frequentes^{3,8,9}. A progressão da perda da força muscular e das contraturas leva à perda da deambulação e ao confinamento na cadeira de rodas por volta dos 10 a 12 anos, e os primeiros anos da adolescência são marcados pelo desenvolvimento de escoliose progressiva^{2,10-12}. A morte ocorre mais frequentemente entre 20 e 25 anos de idade, por complicações respiratórias e cardíacas^{3,13-15}.

O diagnóstico da DMD pode ser estabelecido, na maioria dos casos, por meio da história familiar, de achados clínicos, laboratoriais e genéticos, porém a biópsia muscular continua sendo o padrão ouro^{2,5,16}. Não há nenhum tratamento específico para a enfermidade e atualmente os glicocorticóides (GC) são o pilar desse tratamento. A corticoterapia é utilizada com o objetivo de diminuir o ritmo de perda da força e função muscular, retardar de um a três anos a época do confinamento à cadeira de rodas, melhorar a função pulmonar e retardar a progressão da cifoescoliose e da miocardiopatia¹⁷⁻²⁰.

Duas classes de corticoides têm sido amplamente utilizadas: prednisona e deflazacorte, com diferentes esquemas de utilização. Ambos são eficazes para melhorar a função motora, entretanto, alguns estudos observaram menos efeitos colaterais com o uso do deflazacorte, principalmente aqueles relacionados a menor ganho de peso²¹⁻²⁴.

Nos últimos anos, muita atenção tem sido dada às doenças metabólicas do osso,

e foi relatado que as crianças tratadas com GC via oral têm menor massa óssea. Estudos confirmaram que as ações combinadas dos GC sobre a remodelação óssea podem evidentemente causar osteoporose, aumentando o risco de fraturas por fragilidade, mesmo em pacientes jovens^{12,24-27}.

Redução da densidade mineral óssea (DMO) é observada em meninos com DMD, mesmo antes do uso de esteroides e está associada a um risco aumentado de fraturas dos membros. Estudos têm demonstrado redução da DMO nesses pacientes, embora, os autores não tenham usado controles sadios pareados por idade²⁸⁻³⁵. Söderpalm e colaboradores estudando 24 meninos com DMD e 24 controles sadios pareados por idade, demonstrou que os pacientes tinham menor DMO para o corpo total, coluna, quadril, calcânhar e antebraço que os controles, e esta diferença aumentava com a idade³¹. Estudos também mostraram que as crianças com DMD podem ter níveis anormalmente baixos de vitamina D e osteoporose, mesmo no momento do diagnóstico^{20,29,30,34,36}. Ao contrário de pacientes com outras formas de Osteoporose Induzida pelo uso de Glicocorticoides (GIOP), as crianças com DMD também têm anormalidades adicionais estruturais e funcionais de seu músculo. Os efeitos combinados da GIOP e progressão da DMD podem contribuir para a distorção da unidade músculo-óssea e aumentar a fragilidade óssea^{25,37-39}.

O metabolismo ósseo dos pacientes com DMD tem sido foco de pesquisas recentes, entretanto, os dados sobre a DMO e o remodelamento ósseo ainda não são suficientes para seu completo entendimento. Ainda é controverso se a própria DMD afeta diretamente a massa óssea, mas é certo que a perda dessa massa óssea e aumento do risco de fraturas são alguns dos efeitos colaterais indesejados do tratamento com GC em longo prazo^{24,26,31,34}.

A massa óssea pode ser avaliada e monitorizada por meio dos marcadores bioquímicos da remodelação óssea no sangue e na urina e por exames de imagem. Os principais marcadores de formação óssea sanguíneo são: fosfatase alcalina óssea, osteocalcina e propeptídeo aminoterminal do colágeno tipo I (PINP). Os principais marcadores de reabsorção óssea sanguíneos são: osteoprotegerina, osteopontina, ligante do ativador do receptor do Kappa-B (RANKL), Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF-23) e esclerotina; e aqueles urinários e sanguíneos são: N-telopectídeo e o C-telopectídeo⁴⁰. A absorciometria por dois fótons de raios X (DXA) é a técnica mais utilizada para avaliação da massa óssea e os sítios de preferência para esta avaliação na criança são a coluna lombar entre L1 e L4 e as medidas corporais

totais^{30,41-43}.

Outros marcadores de formação e reabsorção óssea urinários e sanguíneos podem ser utilizados na avaliação da massa óssea. No sangue: fosfatase alcalina, fósforo, cálcio, paratormônio (PTH) e 25OH vitamina D. Na urina: cálcio, fósforo e citrato^{1,44-49}.

Comprometimento da massa óssea é um problema importante e presente nos pacientes com DMD, os quais evoluem com DMO deficiente e incidência aumentada de fraturas. O uso de GC para prolongar a deambulação pode ter efeitos diversos na saúde óssea desses pacientes. Neste escopo, o presente estudo teve como objetivo avaliar o metabolismo ósseo dos pacientes com DMD para melhor compreensão do seu comprometimento ósseo e para possibilitar intervenções que aumentem a formação óssea.

5.2 Pacientes e métodos

5.2.1 Desenho do estudo

Trata-se de estudo transversal desenvolvido no Ambulatório de Neurologia Pediátrica da Unidade de Neurologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais – HC-UFMG, utilizando uma amostra que incluiu inicialmente 39 pacientes com diagnóstico de Distrofia Muscular de Duchenne e 13 indivíduos saudáveis, pareados por idade, como grupo controle.

5.2.2 Pacientes

Foram inicialmente recrutadas 39 crianças e adolescentes com diagnóstico estabelecido de DMD que estavam em acompanhamento regular no Ambulatório de Neurologia Pediátrica da Unidade de Neurologia Pediátrica do HC-UFMG, durante o período de janeiro de 2013 a Dezembro de 2014. O diagnóstico de DMD foi realizado de acordo com os critérios estabelecidos pela literatura internacional, que consideram portadores de DMD os pacientes que apresentam confirmação da ausência do gene da distrofina através de DNA ou biópsia muscular^{2,15}.

Foram incluídos pacientes com idade menor ou igual a 20 anos e que estivessem em uso ou não de medicação no momento da entrevista. Foram excluídos os pacientes que apresentavam outras doenças ou utilizavam outros medicamentos

diferentes dos GC que pudessem interferir no metabolismo de cálcio ou no metabolismo ósseo, tais como: alterações ósteo-metabólicas antes do diagnóstico da DMD (hiperparatireoidismo, hipercalcemia etc). Foram excluídos também aqueles agudamente enfermos ou em uso de outros fármacos que pudessem induzir alterações ósteo-metabólicas (beta- bloqueadores, tiazidicos, hormônio de crescimento etc). O grupo de pacientes DMD foi dividido em 2 subgrupos: DMD1 e DMD2 que compreendia os subgrupos de pacientes com uso de corticoide e sem uso de corticoide, respectivamente; e DMD3 e DMD4 que compreendia os subgrupos com pacientes cadeirantes e não cadeirantes, respectivamente.

Dos 39 pacientes inicialmente recrutados, 10 se recusaram a participar do estudo, sendo portanto, 29 pacientes com DMD que compreenderam e concordaram em participar do estudo assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), foram avaliados.

5.2.3 Controles

O grupo controle foi composto por 13 crianças e adolescentes hígidos, menores de 20 anos, pareados pela faixa etária com o grupo com DMD, que foram recrutados no Ambulatório de Pediatria do Hospital das Clínicas da UFMG, anexo Bias Fortes. A ausência de doença aguda ou crônica atual foi determinada por meio de anamnese, exame físico e exames laboratoriais. Os critérios de exclusão foram: história progressiva de condição que pudesse ser prejudicial para a saúde óssea (prematuridade extrema ou doença grave, por exemplo), apresentar baixo peso, baixa estatura, sobrepeso ou obesidade, de acordo com as curvas de referência da Organização Mundial da Saúde (OMS) e fazer uso de medicamentos com ação no metabolismo mineral ósseo.

5.2.4 Protocolo do estudo

A coleta de dados foi realizada pela pesquisadora em duas etapas: avaliação clínica, exames complementares e consulta a prontuários quando necessário.

Consistiu em :

- Avaliação clínica e anamnese dirigida realizadas pela pesquisadora utilizando questionários estruturados com investigação dos seguintes dados (Anexo 1):
 - Idade, data do diagnóstico e método do diagnóstico;

- Cadeirante ou não cadeirante e há quanto tempo;
 - História de fraturas, de cirurgias ortopédicas e de escoliose;
 - Medicamentos em uso (corticoide, vitamina D) e por quanto tempo;
 - Uso de bipap;
 - Presença ou não de alterações metabólicas antes do diagnóstico;
 - Presença ou não de doença aguda.
- Coleta de sangue para dosagem de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina total, ureia, creatinina, 25OH vitamina D e paratormônio (PTH).
 - Coleta de amostra de urina de 24 horas para dosagem de cálcio, citrato, fosfato e creatinina.
 - Realização de Densitometria Óssea pela absorciometria com dois fótons de raios X (DXA).

5.2.4.1 Avaliação clínica e antropométrica

Dados como data do diagnóstico, método do diagnóstico, idade de início do corticoide, dose, tempo de tratamento e adesão ao tratamento foram obtidos dos prontuários dos pacientes. Duas ou mais fraturas no mesmo osso, causadas pelo mesmo trauma, foram contabilizadas como uma fratura.

Os dados antropométricos foram obtidos com as crianças descalças e usando roupas leves. O peso (P) foi aferido em balança digital eletrônica, marca Welmy®, modelo W 200 LS, com capacidade máxima para 200 quilogramas (Kg), e registrado em Kg, com variação em gramas. Para pacientes que não deambulavam, foi obtido através da diferença entre o P do paciente carregado por um familiar e o P do familiar^{15,50}.

A estatura (E) dos pacientes que deambulavam foi aferida em antropômetro vertical, acoplado à balança, e registrado em metros (m), com variação em centímetros (cm), com os pacientes descalços, em pé, calcanhares juntos, costas retas e braços estendidos ao lado do corpo⁵⁰. Para indivíduos que haviam perdido a marcha, estimou-se a medida por meio da envergadura dos braços, conforme recomendado por Bushby et al (2010) e Stewart et al (2005)^{15,51}. Para a estimativa da E, os meninos mantiveram os braços estendidos, formando um ângulo de 90° com o corpo. Mediu-se a distância

entre os dedos médios das mãos, utilizando-se uma fita métrica flexível^{52,53}.

Os dados de P e E foram transferidos para Programa da Organização Mundial de Saúde (OMS) Anthro® (versão 3.2.2) e WHO Anthro Plus, versão 1.0.4., que realizou o cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC), dividindo-se o P, em Kg, pela E, em m, elevada ao quadrado, com subsequente definição dos escores-Z dos índices antropométricos: índice de massa corporal por idade (IMC/I) e estatura por idade (E/I). Utilizou-se como referência antropométrica as curvas de crescimento da OMS para crianças acima de 5 anos de idade^{50,54}.

5.2.4.2 Coleta e processamento das amostras

A coleta de sangue foi realizada no laboratório central do HC-UFGM, em veia periférica, entre 9 e 11 horas da manhã, após jejum de oito a 12 horas.

As análises séricas do cálcio total (VR: 8,4 a 10,2 mg/dl), fósforo (VR: 3,3 a 5,4 mg/dl) e ureia (VR: 19 a 43 mg/dl) foram realizadas pelo método colorimétrico; aquelas da creatinina (VR: 0,66 a 1,25mg/dl) e fosfatase alcalina total (VR: 38 a 126 U/l) pelo método cinético enzimático, todos no aparelho *Vitros 5600, da Johnson & Johnson* (Rochester, NY, EUA). A dosagem do PTH (VR: 15 a 65 pg/ml) foi realizada pelo método de eletroquimioiluminescência e as dosagens de 25OH vitamina D (VR: Deficiência: < 10 ng/ml, Insuficiência: 10-30 ng/ml, Suficiência: 30-100 ng/ml; Toxicidade: >100 ng/ml) foram feitas pelo método de quimioiluminescência, ambas no equipamento da Liaison da DiaSorin®, (Saluggia, Itália) em laboratório terceirizado (NASA em São Paulo).

As análises urinárias de cálcio, fósforo, creatinina e citrato foram realizadas em urina 24 horas, com o paciente sendo orientado sobre os cuidados da coleta. A dosagem de cálcio (VR: 4 mg/kg/24h) e fósforo (VR: 400 a 1.300mg/24h) urinários foi realizada pelo método colorimétrico; a dosagem de creatinina urinária (VR: > 3 anos = 12 a 30 mg/kg/24h) foi feita pelo método cinético-enzimático, todos no laboratório do HC- UFGM; e a dosagem de citrato urinário (VR: 320 a 1240 mg) foi realizada pelo método de espectrofotometria em laboratório terceirizado (NASA em São Paulo).

5.2.4.3 Avaliação da massa óssea

O método de avaliação da integridade óssea foi a densitometria óssea, que foi

realizada fora do HC-UFMG no Sistema Único de Saúde, sempre no mesmo lugar. A técnica utilizada foi a absorciometria por dois fótons de raios X (DXA), utilizando-se o aparelho de emissão de fótons com fonte de Raio X Lunar DPX – IQ 2516. Empregou-se fonte de raio X de 76 KeV, filtro de atenuação e analisador de pulso no detector, que decompõe os fotos em dois componentes de alta e baixa energia.

O princípio da técnica de medida da DMO é a mensuração da quantidade mineral óssea de determinada região através da diferença de absorção de raios X de duas diferentes energias sobre o corpo. Utilizando os diferentes níveis de absorção é possível avaliar a profundidade e composição de tecidos e gerar medições de massa gorda e magra. As medições podem ser feitas de todo o corpo como bem como regiões como da coluna lombar, quadril e rádio distal. A escolha do local pode ser importante por causa das diferenças nas proporções de osso trabecular e cortical. Algumas condições como perda de massa óssea induzida por corticoide afetam predominantemente o osso trabecular e, portanto, deve primeiramente ser detectada na coluna lombar^{43,55}.

Para a avaliação da coluna lombar o paciente foi examinado em posição de decúbito dorsal com elevação parcial dos membros inferiores, objetivando a retificação da coluna e uma ótima separação das vértebras lombares⁵⁶.

As medidas densitométricas foram obtidas e interpretadas de acordo com as recomendações da International Society for Clinical Densitometry (ISCD)⁴³. A coluna lombar (CL) entre as vértebras L1 e L4 foi avaliada empregando-se técnicas de posicionamento padronizadas. Da CL foram obtidos os parâmetros de sua área óssea (DMOa CL; em cm²) e o conteúdo mineral ósseo (CMO CL; em g) e calculou-se a DMO volumétrica estimada (DMOv CL; em g/m³), utilizando-se a fórmula: $DMOv\ CL = CMO\ CL \div \text{Área}\ (DMOa)\ CL$. Esse modelo matemático foi proposto por Carter et al, assumindo-se que a vértebra tenha um formato cuboide. O objetivo do cálculo é obter uma medida de densidade que sofra menos influência do tamanho corporal e que seja mais apropriada para a avaliação da criança e do adolescente em crescimento^{42,43,55,57}.

Os valores obtidos para a DMOa CL foram expressos em escores-Z para idade, utilizando-se as curvas de referência pediátricas da National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2008, disponibilizadas pelo software do aparelho⁴². O termo “status mineral ósseo” (densidade mineral óssea), já empregado por outros autores, foi utilizado para descrever a saúde óssea avaliada pela DXA⁵⁸. O indivíduo

foi considerado como tendo baixo status mineral ósseo quando a medida era menor ou igual a -2 desvios padrão, de acordo com dados referenciados na literatura^{43,43}.

5.2.5 Análise estatística

As informações obtidas na avaliação clínica e os resultados dos exames bioquímicos foram registrados em planilhas específicas de banco de dados (plataforma Windows Excel, 2000, Microsoft Corp, Redmont, USA), para então serem analisados. As variáveis quantitativas foram descritas como média e desvio padrão (DP) quando tinham distribuição normal e mediana e intervalo interquartil (IQR=Q3-Q1) quando não tinham distribuição normal. A normalidade das variáveis foi verificada pelo Teste de Shapiro Wilk.

As comparações entre duas variáveis quantitativas foram realizadas pelos testes T de Student (distribuição normal) e teste de Mann Whitney (distribuição não normal). O teste T univariado foi utilizado para comparar médias dos escores-Z com populações de referência.

Os testes foram utilizados para análise dos parâmetros clínicos e antropométricos, sanguíneos, urinários e da densitometria óssea entre os grupos DMD (pacientes com DMD) e grupo C (controles); entre os Subgrupos DMD1 (pacientes com DMD cadeirantes) e DMD2 (pacientes com DMD não cadeirantes), e entre os Subgrupos DMD3 (pacientes com DMD com história de uso de corticoide) e DMD4 (pacientes com DMD sem história de uso de corticoide).

As variáveis qualitativas foram expressas em frequências absolutas e porcentagem. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste Qui-Quadrado de Pearson Assintótico (20% dos valores esperados estavam entre um e cinco, e 80% maiores ou iguais a 5) e pelo teste Qui-quadrado Exato de Fisher.

Para análise de associação entre variáveis quantitativas do estudo, utilizou-se o teste de correlação de Pearson quando as variáveis tinham distribuição normal e o teste de correlação de Spearman (teste não-paramétrico) quando não tinham distribuição normal. Este teste é interpretado da seguinte maneira:

$R > 0$: indica relação direta, ou seja, um aumento em X é acompanhado por um aumento em Y.

$R < 0$: indica relação indireta, ou seja, um aumento em X é acompanhado por um decréscimo em Y.

Um alto valor de R (negativo ou positivo) – próximo de 1 ou -1 – representa forte relação linear, enquanto que um valor próximo de zero mostra que esta relação é fraca.

Todos os resultados foram considerados significativos a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Os escores-Z de altura e IMC para idade foram obtidos a partir das curvas de referência da OMS (54) utilizando os programas WHO Anthro® (versão 3.2.2) e WHO Anthro Plus® (versão 1.0.4).

5.2.6 Aspectos Éticos

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFMG aprovou o estudo mediante parecer de número 451.012 (ANEXO 1). Todos os participantes e seus responsáveis foram esclarecidos sobre a natureza do estudo por meio da leitura e análise do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os pacientes portadores de DMD e as crianças e adolescentes saudáveis foram incluídos no estudo somente mediante concordância e assinatura do TCLE por parte do responsável e do próprio paciente, conforme a idade (ANEXO 2).

O protocolo de pesquisa não interferiu com qualquer recomendação ou prescrição médica. O seguimento clínico-laboratorial e a abordagem terapêutica dos pacientes foram assegurados, mesmo no caso de recusa em participar do estudo. Além disso, após os resultados da avaliação clínico-laboratorial, todos os participantes foram orientados e tratados de acordo com a necessidade.

5.3 Resultados

5.3.1 Avaliação Clínica e Antropométrica

A média de idade dos pacientes foi $12,41 \pm 2,89$ (7 a 18 anos). A mediana do peso foi 43,6 Kg (29,5 a 49,5), e a média da estatura foi $145,91 \pm 13,95$ cm (120 a 170). A média do escore-Z do IMC foi $-0,30 \pm 2,05$. Não houve diferenças entre pacientes e controles em relação à idade, peso, estatura, IMC, e escore-Z do IMC (Tabela 1).

Tabela 1 - Parâmetros antropométricos entre o grupo de pacientes (DMD) e o grupo controle (C)

<i>Variáveis</i>	<i>DMD</i> <i>n=29</i>	<i>C</i> <i>n=13</i>	<i>p</i>
Idade*	12,4±2,9	10,6±4,0	0,107 (1)
Peso**	43,6 (29,5-49,5)	28,5 (20,3-45,3)	0,117 (2)
Altura*	145,9±13,9	138,6±23,3	0,307 (1)
IMC**	18,9 (15,1-21,2)	15,7 (15,1-18,7)	0,105 (2)
Escore-Z IMC*	-0,30±2,05	-0,30±1,02	0,997 (1)

DMD: Distrofia Muscular de Duchenne; IMC: Índice de Massa Corporal. *Valores expressos em média e desvio-padrão; (1) Teste T; **Valores expressos em mediana e intervalo inter-quartil Q1 e Q3; (2) Teste de Mann Whitney.

Observou-se que a maioria dos pacientes era cadeirante (62,07%) e exposta ao uso de corticoide (62,07%), dos quais a maioria (85%) com história de uso pausado (Tabela 2).

Tabela 2 - Características clínicas do grupo DMD

<i>Variáveis</i>	<i>DMD</i> <i>n=29</i>
Idade do diagnóstico (anos)*	6,4±1,8
Tipo de diagnóstico**	
DNA	22 (75,9)
Biópsia	7 (24,1)
Cadeirante**	
Sim	18 (62,07)
Não	11 (37,93)
História de fratura**	
Sim	8 (27,6)
Não	21 (72,4)
História de escoliose**	
Sim	14 (48,3)
Não	15 (51,7)
Uso de corticóide**	
Sim	20 (69,0)
Não	9 (31,0)
Tipo de corticóide em uso**	
Deflazacorte (Pausado)	3 (15)
Prednisona	17 (85)
Tempo de uso de corticoide (meses)*	44,5 (24,0-81,0)
Uso de vitamina D**	
Sim	12 (41,4)
Não	17 (58,6)
Tempo de uso de vitamina D (meses)*	10,2±7,9

Cirurgia ortopédica para correção de escoliose em 10,3% dos pacientes. *Valores expressos em média e desvio-padrão; **Valores expressos em número e porcentagem.

A comparação entre os subgrupos DMD e DMD2 mostrou diferenças

significativas em relação à idade, peso, estatura, e história de escoliose (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação dos parâmetros antropométricos e das características clínicas entre os subgrupos DMD1 e DMD2

<i>Variáveis</i>	<i>DMD1 n=18</i>	<i>DMD2 n=11</i>	<i>p</i>
Idade (anos)*	13,0 (12,0;15,3)	10,0 (9,0;11,0)	0,002 (1)
Peso (Kg)**	46,6±13,2	32,6±9,1	0,005 (2)
Altura (cm)**	152,8±12,3	134,6±7,8	<0,0001 (2)
IMC**	19,8±5,3	17,8±3,8	0,286 (2)
Escore-Z IMC**	-0,45±2,22	-0,05±1,79	0,619 (2)
Idade do diagnóstico (anos)*	6,0 (6,0;7,0)	6,0 (4,5;7,0)	0,406 (1)
Tipo de diagnóstico***			
DNA	13 (72,2)	9 (81,8)	0,667 (3)
Biópsia	5 (27,8)	2 (18,2)	
História de fratura*** Sim			0,110(3)
Não	7(38,9)	1(9,1)	
	11(61,1)	10,90,9)	
História de escoliose#			0,011 (4)
Sim	12 (66,7)	2(18,2)	
Não	6 (33,3)	9 (81,8)	
Uso de medicações*** Sim			1,000 (3)
Não	16 (88,9)	9 (81,2)	
	2 (11,1)	2 (18,2)	
Uso de corticóide#			0,273 (4)
Sim	11 (61,1)	9 (81,8)	
Não	7 (38,9)	2 (18,2)	
Tipo de corticóide em uso***			0,422 (3)
Deflazacorte	1 (5,6)	2 (18,2)	
Prednisona	10 (55,6)	7 (63,6)	
Não usa	7 (38,9)	2 (18,2)	
Tempo de uso de corticoide (meses)*	48,0 (36,0-84,0)	24,0(21,0-70,5)	0,321 (1)
Uso de vitamina D*** Sim			0,273 (3)
Não	9 (50,0)	3 (27,3)	
	9(50,0)	8 (72,7)	
Tempo de uso de vitamina D (meses)	6,0 (3,0-12,0)	12,0 (12,0-18,0)	0,123 (1)

DMD: Distrofia Muscular de Duchenne. *Valores expressos em mediana e intervalo inter-quartil Q1 e Q3; (1) Teste de Mann Whitney; **Valores expressos em média e desvio-padrão; (2) Teste T; ***Valores expressos em número e porcentagem; (3) Teste Qui-Quadrado Exato; # Valores expressos em número e porcentagem; (4) Teste Qui-Quadrado de Pearson Assintótico.

Comparou-se os subgrupos DMD3 e DMD4 e não houve diferença significativa em relação à nenhuma das variáveis avaliadas (Tabela 4).

Tabela 4 - Comparação dos parâmetros antropométricos e das características clínicas entre os subgrupos DMD3 e DMD4

<i>Variáveis</i>	<i>DMD3 n=20</i>	<i>DMD4 n=9</i>	<i>p</i>
Idade (anos)*	11,9±2,3	13,6±3,8	0,256 (1)
Peso (Kg)*	40,1±19,8	44,0±10,5	0,477 (1)
Altura (cm)*	141,7±12,5	155,4±12,6	0,011 (1)
IMC*	19,5±5,4	18,0±3,1	0,457 (1)
Escore-Z IMC*	0,01±2,05	-0,98±1,97	0,235 (1)
Idade do diagnóstico (anos)*	6,4 ±1,7	6,4±2,1	0,952 (1)
Tipo de diagnóstico**			
DNA	16 (80,0)	6 (66,7)	0,642 (2)
Biópsia	4 (20,0)	3 (33,3)	
História de fratura** Sim	7 (35,0)	1 (11,1)	0,371 (2)
Não	13 (65,0)	8 (88,9)	
História de escoliose** Sim	9 (45,0)	5 (55,6)	0,700 (2)
Não	11 (55,0)	4 (44,4)	
Uso de vitamina D**			0,234 (2)
Sim	10 (50,0)	2 (22,2)	
Não	10 (50,0)	7 (77,8)	
Tempo de uso de vitamina D (meses)*	9,5±7,0	13,5±14,8	&

DMD: Distrofia Muscular de Duchenne. *Valores expressos em média e desvio-padrão; (1) Teste T; **Valores expressos em número e porcentagem; (2) Teste Qui-Quadrado Exato. & Não foi possível realizar o teste pois o grupo sem história de uso de corticoide que fez uso de vitamina D continha somente dois pacientes (n=2).

5.3.2 Avaliação Bioquímica

A comparação dos parâmetros bioquímicos séricos e urinários entre o grupo DMD e o grupo C, mostrou diferenças significativas em relação ao fósforo sérico, creatinina, fosfatase alcalina, calciúria, reabsorção tubular de fósforo (TP), citratúria em mg/1,73m², e creatinúria (Tabela 5).

Tabela 5 - Comparação dos parâmetros bioquímicos séricos e da urina 24h entre os grupos DMD e C

<i>Variáveis</i>	<i>DMD n=29</i>	<i>C n=13</i>	<i>p</i>
Cálcio sérico (mg/dl)*	9,7±0,3	9,4±0,5	0,054 (1)
Fósforo sérico (mg/dl)*	5,1±0,6	4,2±0,5	<0,0001 (1)
Creatinina (mg/dl)**	0,19 (0,17-0,27)	0,50 (0,40-0,75)	<0,0001 (2)
Ureia (mg/dl)*	19,0±6,1	22,1±5,6	0,126 (1)
Fosfatase alcalina (U/l)*	108,2±31,9	243,8±70,5	<0,0001 (1)
PTH (pg/ml)**	29,0 (21,3;39,6)	25,0 (21,5;30,5)	0,308 (2)
Calciúria (mg/Kg/dia)**	1,2 (0,5-2,1)	2,6 (2,1-3,2)	0,003 (2)

Fosfatúria (mg/24h)*	452,8±162,0	349,8±178,0	0,080 (1)
TP de fósforo (mg/%)*	4,7±0,6	3,9±0,6	<0,0001 (1)
Citratúria mg/1,73m ² **	437,3 (275,1-624,4)	834,1 (687,4-979,8)	0,002 (2)
Citratúria mg/g Creatinina**	107,8 (64,9-197,9)	95,5 (72,5-139,5)	0,675 (2)
Creatinúria (mg/Kg/dia)*	7,8±3,9	18,2±5,6	<0,0001 (1)
Relação cálcio/creatinina urinária**	0,21 (0,08-0,34)	0,15 (0,11-0,19)	0,416 (2)

DMD: Distrofia Muscular de Duchenne. *Valores expressos em média e desvio-padrão; (1) Teste T;

**Valores expressos em mediana e intervalo inter-quartil Q1 e Q3; (2) Teste de Mann Whitney.

Em relação aos valores de 25OH vitamina D observou-se que a grande maioria dos pacientes (93,1%) tinha níveis abaixo dos valores de referência (Tabela 6).

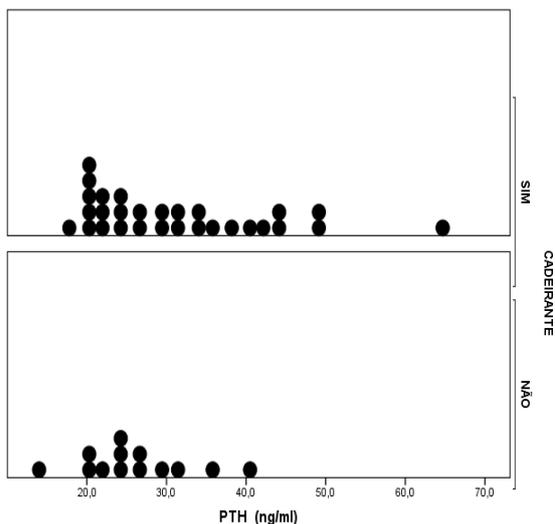
Tabela 6 - Valores encontrados na análise de 25-OH vitamina D do grupo DMD

<i>Variáveis</i>	<i>DMD</i>
25-OH vitamina D (ng/ml)*	17,5±6,9
Níveis de 25-OH vitamina D**	
Deficiente (<10 ng/ml)	6 (20,7%)
Insuficiente (10-30 ng/ml)	21 (72,4%)
Suficiente (30-100 ng/ml)	2 (6,9%)
Toxicidade (>100 ng/ml)	0 (0,0%)

DMD: Distrofia Muscular de Duchenne. *Valores expressos em média e desvio-padrão; **Valores expressos em número e porcentagem.

A comparação entre os subgrupos DMD1 e DMD2 mostrou diferenças significativas em relação ao PTH, creatinúria e TP de fósforo (Figura 1). Não houve diferença nos demais parâmetros (Tabela 7).

(A)



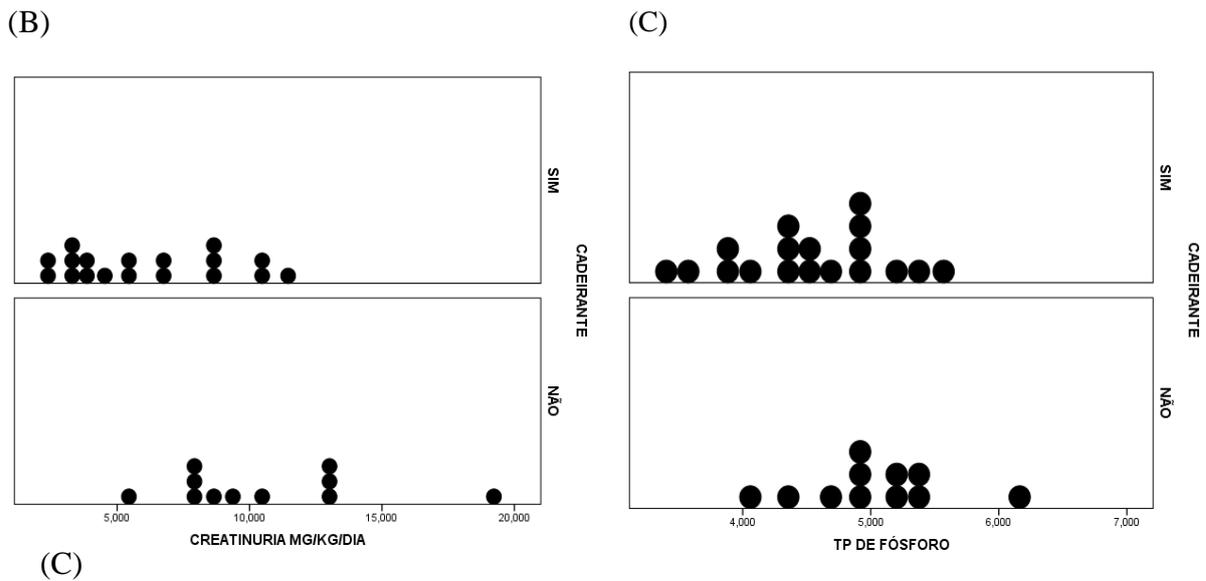


Gráfico 1 - Comparação entre os parâmetros bioquímicos séricos e urinários [PTH (A), creatinúria mg/Kg/dia (B) e TP de fósforo (C)] dos grupos DMD e C

Tabela 7 - Comparação dos parâmetros laboratoriais séricos e da urina 24h entre os subgrupos DMD1 e DMD2

<i>Variáveis</i>	<i>DMD1 n=18</i>	<i>DMD2 n=11</i>	<i>p</i>
Cálcio sérico (mg/dl)*	9,7±0,4	9,7±0,3	0,552 (1)
Fósforo sérico (mg/dl)*	4,9±0,6	5,4±0,5	0,051 (1)
Creatinina (mg/dl)**	0,19 (0,15-0,27)	0,21 (0,19-0,28)	0,430 (2)
Ureia (mg/dl)*	18,8±4,9	19,3±8,0	0,855 (1)
Fosfatase Alcalina (U/l)*	100,9±30,5	120,2±31,8	0,116 (1)
PTH (pg/ml)*	35,2±12,6	24,9±5,0	0,005 (1)
25OH vitamina D (ng/ml)*	18,9±6,8	15,3±6,7	0,173 (1)
Calciúria (mg/Kg/dia)**	1,1 (0,4-2,0)	1,6 (0,7-2,3)	0,533 (2)
Fosfatúria (mg/24h)*	424,7±145,4	498,6±183,8	0,240 (1)
TP de fósforo (mg/%)*	4,5±0,6	5,0±0,6	0,049 (1)
Citratúria mg/1,73m ² *	463,2±289,1	642,9±510,4	0,251 (1)
Citratúria mg/g creatinina**	142,9 (67,8-200,6)	91,6 (47,6-201,6)	0,382 (2)
Creatinúria (mg/Kg/dia)*	6,1±3,0	10,5±3,9	0,002 (1)
Relação cálcio/creatinina**	0,22 (0,09-0,44)	0,16 (0,06-0,29)	0,303 (2)

DMD: Distrofia Muscular de Duchenne. *Valores expressos em média e desvio-padrão; (1) Teste T;

**Valores expressos em mediana e intervalo inter-quartil Q1 e Q3; (2) Teste de Mann Whitney.

Nas comparações dos parâmetros bioquímicos sanguíneos e urinários entre os subgrupos DMD3 e DMD4 observou-se diferença significativa apenas para o PTH, estando este maior no grupo de pacientes não usuários de corticoide (Tabela 8).

Tabela 8 - Comparação dos parâmetros bioquímicos séricos e da urina 24h entre os subgrupos com DMD3 e DMD4

<i>Variáveis</i>	<i>DMD3 n=20</i>	<i>DMD4 n=9</i>	<i>p</i>
Cálcio sérico (mg/dl)**	9,7 (9,4-10,0)	9,7 (9,6-9,9)	0,943 (2)
Fósforo sérico (mg/dl)*	5,0±0,6	5,1±0,7	0,691 (1)
Creatinina (mg/dl)*	0,21±0,08	0,25±0,13	0,344 (1)
Ureia (mg/dl)*	19,4±5,7	18,0±7,1	0,576 (1)
Fosfatase Alcalina (U/l)*	106,4±27,4	112,2±41,8	0,658 (1)
PTH (pg/ml)**	24,2 (20,6-64,4)	34,5 (29,6-49,2)	0,010 (2)
25OH vitamina D (ng/ml)*	17,8±7,4	17,0±5,7	0,791 (1)
Calciúria (mg/Kg/dia)**	1,6 (0,6-2,2)	1,0(0,3-1,9)	0,446 (2)
Fosfatúria (mg/24h)*	462,6±161,7	430,9±170,1	0,634 (1)
TP de fósforo (mg/%)*	4,7±0,6	4,7±0,7	0,853 (1)
Citratúria mg/1,73m ² **	418,5 (263,1-530,2)	520,2 (309,7-835,6)	0,382 (2)
Citratúria mg/g creatinina**	103,9 (52,1-182,5)	136,9 (67,7-352,1)	0,328 (2)
Creatinúria (mg/Kg/dia)**	8,3 (5,3-10,3)	4,5 (3,6-9,9)	0,239 (2)
Relação cálcio/creatinina*	0,22±0,15	0,29±0,28	0,379 (1)

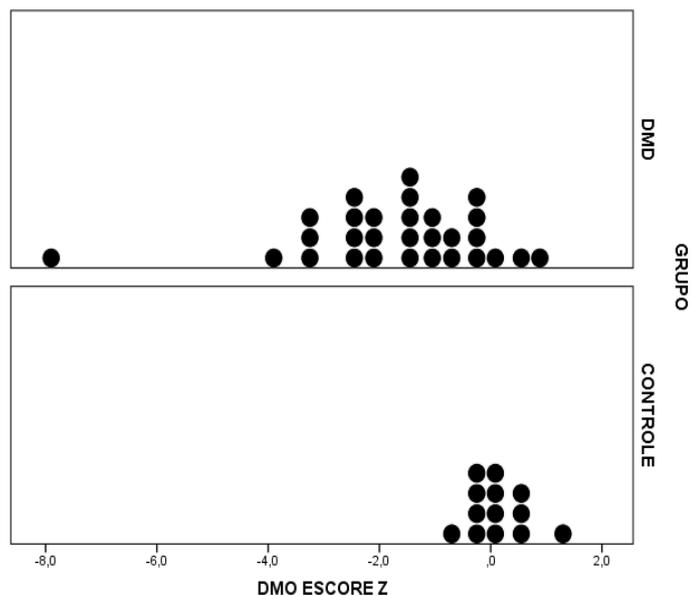
DMD: Distrofia Muscular de Duchenne. *Valores expressos em média e desvio-padrão; (1)Teste T;

**Valores expressos em mediana e intervalo inter-quartil Q1 e Q3; (2) Teste de Mann Whitney.

5.3.3 Avaliação Densitométrica

Em relação aos achados da densitometria óssea os pacientes tiveram valores menores e estatisticamente significantes do escore-Z da DMOa da coluna lombar (CL) quando comparados aos controles (Figura 2).

Gráfico 2 - Comparação dos valores do escore-Z da DMOa da coluna lombar medidos pela DXA entre os grupos



DMD e C.

Tabela 9 - Comparação dos parâmetros densitométricos entre os grupos DMD e C

<i>Variáveis</i>	<i>DMD n=29</i>	<i>C n=13</i>	<i>p</i>
DMOa CL (g/cm ²)*	0,66 (0,55-0,80)	0,73 (0,62-0,99)	0,131 (1)
DMOv CL (g/cm ³)*	28,9 (13,9-40,1)	23,0 (20,9-35,7)	0,775 (1)
CMO CL (g)*	23,0 (16,9-34,2)	16,6 (13,0-36,8)	0,500 (1)
Escore-Z DMOa CL*	-1,6 (-2,5;-0,5)	0,1 (-0,3;0,4)	< 0,0001 (1)
Padrão de DMD: Esperado para idade Abaixo para idade	13 (44,8) 16 (55,2)	13 (100,0) 0 (0,0)	0,001 (2)

DMD: Distrofia Muscular de Duchenne; DXA: Técnica da Densitometria Óssea; DMOa CL: densidade mineral óssea areal da coluna lombar L1-L4; DMOv CL: densidade mineral óssea volumétrica estimada da coluna lombar L1-L4; CMO CL: conteúdo mineral ósseo da coluna lombar L1-L4. Escore-Z DMOa CL: Escore-Z da densidade mineral óssea da coluna lombar L1-L4; *Valores expressos em mediana e intervalo inter-quartil Q1 e Q3; (1) Teste de Mann Whitney; **Valores expressos em número e porcentagem; (2) Teste Qui-Quadrado Exato.

As comparações da densitometria óssea entre os subgrupos DMD1 e DMD2 e entre os subgrupos DMD3 e DMD4 não mostraram diferenças.

5.3.4 Correlações

A correlação entre os parâmetros bioquímicos sanguíneos e urinários com a DMOa da CL do grupo DMD e seus subgrupos mostrou correlação negativa significativa para a citratúria mg/g creatinina em usuários de corticoide (rp= -0,477; p=0,045). Observou-se também correlação negativa e significativa do fósforo sérico com o CMO da CL no grupo DMD (rp= -0,441; p=0,035) e da citratúria mg/g creatinina com o CMO da CL no grupo que usou corticoide (rp= -0,519; p=0,048). Houve uma tendência para correlação negativa entre a citratúria em mg/1,73 m² SC e o CMO da CL também no grupo de usuários de corticoide (rs = -0,450; p=0,092), tendência para correlação negativa entre a citratúria em mg/1,73 m² SC e a DMOv (rs= -0,351; p=0,073) da coluna lombar em todo o grupo de paciente, tendência para correlação negativa entre a citratúria mg/g com o escore-Z da DMOa CL (rp= -0,442; p=0,066), e uma tendência para correlação negativa entre a excreção urinária de citrato em mg/g de creatinina e a DMOv (rs= -0,339; p=0,084).

Houve tendência para correlação positiva entre a fosfatúria em mg/24h o escore- Z da DMOa CL (rp= 0,421; p=0,064). Não houve correlações para os demais parâmetros bioquímicos. As correlações foram feitas com os testes de Pearson ou de Spearman, conforme a indicação.

Nas análises de correlação entre os valores séricos de 25OH vitamina D e os

parâmetros densitométricos do grupo DMD não foi observada nenhuma correlação. Do mesmo modo, não se observou correlação entre a DMOv da CL e os parâmetros sanguíneos e urinários dos grupos DMD, DMD1 e DMD3.

Nas análises de correlação entre os valores séricos de 25OH vitamina D e os valores de PTH também não foi observada correlação ($r_s=0,127$; $p=0,512$).

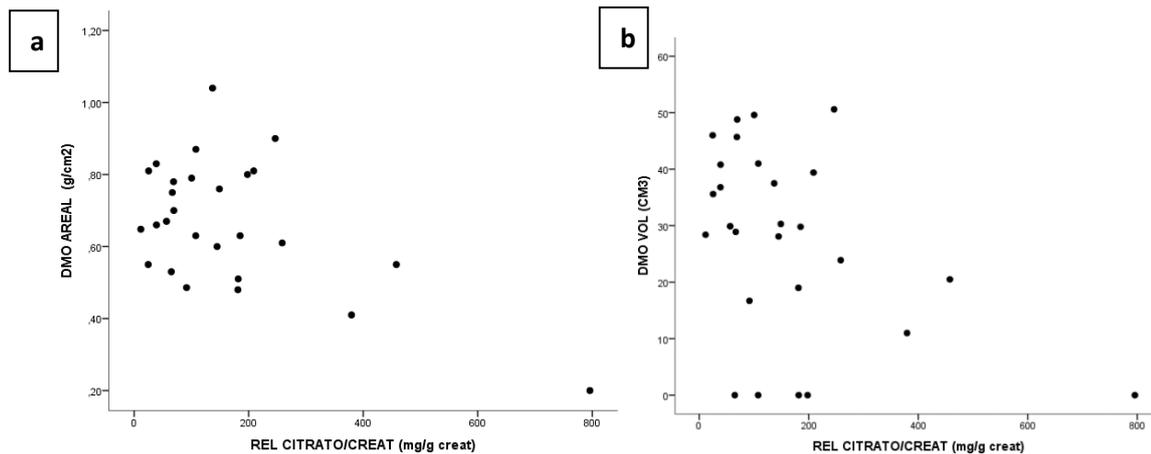


Gráfico 3 - (a) Correlação entre os valores de DMOa CL medidos pela DXA e a citratúria mg/g creatinina. (b) Correlação entre os valores absolutos de DMOv CL medidos pela DXA e a citratúria mg/g creatinina.

5.4 Discussão

A saúde óssea é muito importante para pacientes com DMD e sua qualidade está associada a fraturas e escoliose. O uso de corticoide é consenso para aqueles pacientes que ainda deambulam e pode piorar a massa óssea. Assim, abordagens clínicas que otimizem a massa óssea são desejadas e para isto é necessário conhecer o metabolismo ósseo desses pacientes. Este estudo avaliou o metabolismo mineral ósseo de 29 crianças e adolescentes com DMD usando marcadores bioquímicos de formação e reabsorção óssea e medida da massa óssea com a densitometria pela DXA.

A média de idade dos pacientes foi $12,41 \pm 2,89$ anos e a média de idade do diagnóstico da doença foi $6,4 \pm 1,8$ anos, mais alta que a média observada na literatura (Tabela 1). Estudos realizados por Bothwell e colaboradores em 2003 e por Manzur e colaboradores em 2008 observaram uma média de idade de diagnóstico de 4 anos e meio. Ciafaloni e colaboradores (2009) mostraram uma média de idade de diagnóstico de 5 anos, próxima ao encontrado pelos últimos autores^{3,10,36}. Os valores mais altos

encontrados neste estudo podem estar relacionados à dificuldade inicial de diagnóstico e à dificuldade de encaminhamento para os centros de referência, considerando que o quadro clínico geralmente torna-se evidente entre três e cinco anos de idade.

O diagnóstico de 75,9% dos pacientes foi realizado por meio de estudo genético (Tabela 2), confirmando dados da literatura que orientam a biópsia muscular somente nos casos onde o teste genético é negativo, ou o fenótipo clínico é atípico^{1,2,7}.

Grande parte dos pacientes era cadeirante (62,07%). Entre os subgrupos cadeirantes e não cadeirantes foi observada diferença significativa para a idade ($p=0,002$), peso ($p=0,005$), estatura ($p<0,0001$) e presença de escoliose ($p=0,0011$), sendo aqueles cadeirantes mais velhos, mais pesados, mais altos e com mais escoliose (Tabela 3). A evolução da doença para o confinamento na cadeira de rodas favorece a redução da atividade física, com maior ganho de peso e maior possibilidade de deformidades torácicas como a escoliose, mais observadas na fase avançada da doença^{3,12,59}. Bothwell e colaboradores e Simon e colaboradores demonstraram que 45,6% e 41,0% de seus pacientes eram cadeirantes, respectivamente^{36,60}. Estes dados confirmam ainda outros relatos da literatura que citam que a progressão da perda da força muscular e das contraturas leva ao confinamento na cadeira de rodas por volta dos 10 a 12 anos e que os primeiros anos da adolescência são marcados pelo desenvolvimento de escoliose progressiva^{1,10,12}. No presente estudo a presença da escoliose foi observada em 48,3% dos pacientes sendo mais frequente entre os cadeirantes e os usuários de GC (Tabelas 2, 3, 4). A cirurgia ortopédica foi realizada em 10,3% deles. A presença de escoliose em pacientes com DMD também foi observada por Kinali e colaboradores (77% dos pacientes). Maior prevalência foi observada por King e colaboradores e por Lebel e colaboradores naqueles pacientes não tratados com corticoterapia (92% vs 20% e 91% vs 31%, respectivamente)^{11,61,62}.

A história de fratura de ossos longos foi observada em apenas 8 pacientes (27,6%) do estudo, sem nenhum relato de fratura vertebral. Larson & Henderson (2000) mostraram fratura em 44% de seus pacientes, com 66% delas envolvendo as extremidades inferiores, sem relato de fraturas vertebrais²⁸. Embora com maior proporção do número de fraturas, os autores não encontraram fraturas vertebrais, em concordância com os achados do presente estudo. Do mesmo modo, Douvillez e colaboradores (2005) observaram a presença de fraturas em 59% de seus pacientes, também sem relato de fratura vertebral, com 87,5 % causadas por queda, e com idade média da ocorrência da primeira fratura aos 7 anos de idade⁶³. Em 2007, King e

colaboradores descreveram aumento do risco de fraturas vertebrais e de ossos longos em pacientes com DMD, principalmente aqueles em uso de GC (32% - 21/67 pacientes), com indicação cirúrgica em 29% dos não tratados e em 15% dos tratados com GC⁶². Estudos realizados por Biggar e colaboradores e Houde e colaboradores observaram prevalência de fraturas semelhante entre pacientes tratados e não tratados com GC (25%/25% e 24/25%, respectivamente), com fraturas vertebrais apenas nos pacientes tratados^{64,65}. O presente estudo encontrou maior percentual de fraturas entre os pacientes cadeirantes e aqueles que usavam GC, embora nenhuma delas fosse fratura vertebral (Tabelas 3 e 4). Antes da introdução da terapia com GC os relatos de fraturas vertebrais eram raros. Esta terapia parece aumentar o risco deste tipo de fraturas e elas podem ocorrer com traumas mínimos, refletindo a fragilidade óssea nos pacientes com DMD. Hawker e colaboradores avaliaram 42 crianças com DMD em uso de GC e observaram redução do escore-Z da DMO da coluna lombar e do corpo total em 54,8% dos pacientes, com presença de fratura em 30,4% deles. Após 2 anos de tratamento com alendronato, vitamina D e cálcio oral, não houve mudança na média do escore-Z da DMO dos sítios ósseos avaliados desses pacientes³². Inúmeros estudos também associam a redução da DMO com risco aumentado de fraturas, em sua maioria de ossos longos, com um maior risco de fraturas vertebrais nos pacientes com DMD e com história de uso de GC^{17,29,34,37,66}.

Metanálise com mais de 80 estudos realizada por van Staa em 2002 demonstrou a associação do uso da prednisolona ($\geq 5\text{mg}/\text{dia}$ de prednisolona ou de equivalente) com reduções significativas na DMO e aumento no risco de fraturas dentro de três a seis meses após o início do tratamento. O aumento do risco de fratura foi independente da idade do paciente, sexo e doença de base²⁷. Bothwell e colaboradores (2003) demonstraram um período de latência de 40 meses entre o início do uso do corticoide e o início do quadro de fraturas vertebrais, com uma incidência de 75% de fraturas vertebrais após 100 meses de uso da terapia³⁶. Tian e colaboradores demonstraram ainda em um estudo retrospectivo realizado com 408 pacientes com DMD tratados com GC um aumento progressivo da prevalência de fraturas com a idade, com valores de prevalência de 16,5%, 37,4% e 83,3% em idades de 5, 10 e 18 anos, respectivamente, mostrando a importância da monitorização da saúde óssea nestes pacientes⁶⁷.

Os GC são considerados o pilar do tratamento da DMD e seu uso está indicado para os meninos de cinco anos de idade e mais velhos, que já não estão ganhando

habilidades motoras, ou cujas habilidades motoras estão em declínio^{15,17,18}. No presente estudo o uso de corticoterapia foi observado em 69% dos pacientes e dentre os corticoides utilizados, 85% dos pacientes faziam uso de prednisona, em esquema intermitente de 10 dias de uso e 10 dias de folga, o qual está citado na literatura e está relacionado com menor intensidade de efeitos colaterais^{19,22,68,69}. Até o momento os GC têm sido a medicação mais eficaz no tratamento da DMD e uma revisão sistemática realizada pela Cochrane observou vários efeitos benéficos ósteo- locomotores, cardíacos e respiratórios com seu uso, com um aumento da força e função musculares ocorrendo em curto prazo (seis meses a dois anos) sendo a prednisona na dose de 0,75mg/Kg/dia considerado o esquema mais eficaz⁷⁰. King e colaboradores também observaram que os meninos com DMD em corticoterapia em longo prazo tinham redução significativa do risco de escoliose e extensão da deambulação por mais de três anos⁶². Biggar e colaboradores (2004) compararam dois protocolos de tratamento com deflazacorte e demonstraram maior efeito benéfico no tratamento contínuo em relação ao tratamento de 20 dias com pausa de 10 dias⁷¹, com maior incidência de catarata assintomática no grupo de uso contínuo. Metanálise realizada por Campbell & Jacob avaliando 15 estudos, mostrou melhora da força e função musculares nos pacientes em uso de deflazacorte em comparação com o placebo, porém, sem clara evidência de vantagem sobre os pacientes que usaram a prednisona²³. Em 2011, Escolar e colaboradores observaram a equivalência da eficácia e segurança do uso da prednisona nos pacientes com DMD com doses administradas diárias e administradas apenas nos finais de semana e descreveram a melhora da função muscular com o uso da prednisona⁶⁸.

No estudo não foram observadas diferenças significativas entre o grupo tratado com GC (DMD3) e o grupo não tratado (DMD4) (Tabela 4). Entretanto, vários efeitos colaterais do uso dos GC são citados na literatura, como por exemplo o ganho de peso, a baixa estatura e as fraturas de ossos longos e vértebras, entre outros, sinalizando a necessidade da monitorização dos riscos potenciais de seu uso^{17,19,22,72}.

A análise do estado nutricional da vitamina D e do cálcio é complexa e há poucos dados sistemáticos de qualidade disponíveis. Outro importante fator é a interpretação dos níveis séricos de vitamina D e os ensaios utilizados para sua dosagem. No entanto, é evidente que muitos dos meninos com DMD têm níveis de vitamina D insuficientes ou deficientes^{28,30,66}. Em 2003, Bianchi e colaboradores observaram marcada redução na DMO da coluna lombar, hipocalciúria, baixos níveis de 25OH vitamina D e

aumento dos marcadores de remodelação óssea, especialmente no grupo tratado com GC (30). Em 2011, os mesmos autores estudaram prospectivamente 33 pacientes com DMD que estavam sob regime de tratamento com dose fixa de prednisona (1,25 mg/kg cada 2 dias). Após dois anos de tratamento com vitamina D₃ (0,8 mcg/Kg por dia) e a adequação da ingestão de cálcio de acordo com o recomendado pelos organismos internacionais, os autores demonstraram o benefício da suplementação da vitamina D e do cálcio nos pacientes com DMD, com um aumento da DMO e da CMO em 65% deles^{29,30}. Outros autores também observaram baixos níveis de 25OH vitamina D e altos níveis de Interleucina 6 (IL6) nos pacientes com DMD, e apontaram a IL6 como um importante marcador do metabolismo ósseo³⁴. Söderpalm & Magnusson (2007) realizaram um estudo transversal com 24 meninos com DMD e também observaram menores níveis de 25OH vitamina D e menor DMO no grupo DMD, sugerindo que intervenções para o aumento da formação óssea deveriam ser consideradas³¹.

Em um Workshop em 2005, Biggar e Bachrach demonstraram que a vitamina D e o cálcio contribuem para a saúde óssea, recomendando a avaliação anual da vitamina D em meninos com DMD e indicando a suplementação abaixo dos níveis de 20ng/ml (39,66). Buckner e colaboradores em uma metanálise realizada em 2015 orientam que a triagem para a deficiência de vitamina D e a avaliação da massa óssea deve ser feita rotineiramente a cada um ou dois anos em todos os pacientes com DMD, particularmente aqueles tratados com GC⁶⁷.

No presente estudo, a grande maioria dos pacientes (93,1%) tinha níveis séricos de 25OH vitamina D abaixo dos valores de referência recomendados (Tabela 6). A reposição oral dessa vitamina foi feita em 41,4% desses pacientes e obteve-se uma média de tempo de uso de 10,2 meses. A reposição de vitamina D foi feita principalmente para os pacientes cadeirantes (75%) e naqueles em uso de corticoterapia (Tabelas 3 e 4), nos quais a qualidade do osso era pior. As quantidades insuficientes ou deficientes do estoque de 25OH vitamina D em pacientes com DMD pode ser explicada pela baixa absorção desta vitamina durante uso de corticoides e pela reduzida exposição solar resultante da diminuição de atividade física ao ar livre⁶⁷. Infelizmente, não foi possível a dosagem sérica de 25OH vitamina D nos controles, o que impossibilitou comparações entre esses dois grupos.

A distrofina é uma proteína crítica para a estabilização da membrana celular e para a prevenção de danos dessa membrana resultantes da contração. A falta de distrofina que ocorre no paciente com DMD, torna a estrutura da glicoproteína do

sarcolema menos estável e favorece a instabilidade da membrana celular. Em consequência, ocorre lesão muscular com início de uma cascata inflamatória que contribui ainda mais para o dano muscular, necrose, fibrose e morte celular^{5,69,73}. Com a instabilidade da membrana ocorre maior influxo de cálcio intracelular, e provavelmente como consequência, menor excreção de cálcio urinário nestes pacientes. A elevação resultante dos níveis de cálcio intracelular provocam o aumento dos radicais de oxigênio pela mitocôndria, contribuindo para a perpetuação do ciclo de estresse oxidativo, dano sarcolemal e morte celular. Além disso, com a lesão muscular característica ocorre também menor formação de creatinina, levando a uma menor excreção de creatinina urinária^{69,73,74}

No estudo em questão, encontrou-se valores estatisticamente significativos menores da creatinina e da fosfatase alcalina séricas e da excreção de creatinina urinária quando comparou-se pacientes e controles (Tabela 5). Entre cadeirantes e não cadeirantes não houve diferença para a creatinina sérica, entretanto, a creatinúria em mg/Kg/dia estava significativamente menor no grupo de cadeirantes, que são os pacientes de mais idade e com maior progressão da doença (Tabela 7). Não houve diferenças quando comparou-se estes dados entre aqueles pacientes usuários de corticoide e não usuários (Tabela 8). Valores menores da creatinina urinária e da creatinina sérica são esperados na DMD porque trata-se de uma doença muscular progressiva e degenerativa. A degeneração do músculo provoca a liberação de mediadores inflamatórios culminando em lesão muscular progressiva e fibrose³⁵. A creatinina é derivada do metabolismo da creatina no músculo esquelético e é encontrada no plasma em níveis relativamente constantes. Na presença de uma doença com estas características, a geração do derivado da creatina reduz consideravelmente.

A fosfatase alcalina total é considerada um marcador de formação óssea e as duas maiores fontes dessa enzima são os osteoblastos e as células endoteliais no fígado. Ela é tecido não específica e seu valor como marcador de remodelamento ósseo é menor do que aquele da fosfatase alcalina osso específica. Infelizmente, não foi possível dosar a isoenzima óssea no estudo. Embora com menor valor como marcador do remodelamento ósseo, seus valores estavam significativamente menores nos pacientes quando comparados aos controles (Tabela 5), apontando um baixo remodelamento ósseo na DMD. O processo de remodelamento ósseo é essencial para manutenção da saúde óssea e o crescimento do esqueleto, e na criança e no adolescente a formação óssea é mais rápida do que a reabsorção³⁵. Söderpalm & Magnusson

mostraram em 2007 que a fosfatase alcalina óssea específica tinha valores menores em paciente com DMD em tratamento com corticosteroides quando comparados aos controles³¹.

A homeostase do cálcio está comprometida na DMD. O aumento transsarcolemal do influxo de cálcio, o aumento da permeabilidade aos cátions divalentes, e a entrada de cálcio na célula através de canais catiônicos não específicos podem ser apontadas como alterações dessa homeostase em pacientes e em modelos animais de DMD⁷⁵⁻⁷⁸. A manutenção de elevados níveis de cálcio depende da liberação espontânea e constante desse íon e da contração dos miofibrilos na DMD. Isto é dependente da expressão da distrofina e há evidências que ela pode reduzir o influxo de cálcio assim como reduzir a utilização do cálcio pelas mitocôndrias⁷⁹. No presente estudo observou-se uma tendência para maiores níveis séricos de cálcio no grupo DMD quando comparado aos controles, embora, esses níveis séricos estivessem dentro dos limites da normalidade (Tabela 5). Bianchi e colaboradores descreveram hipocalciúria em seus pacientes com DMD, especialmente aqueles em uso de corticoide³⁰. Observou-se também no estudo em questão menores níveis de cálcio urinário nos pacientes em relação aos controles (Tabela 5). Pode-se especular que o influxo aumentado de cálcio gera temporariamente uma hipocalcemia. A hipocalcemia estimula a glândula paratireoide a produzir e liberar seu hormônio. O PTH aumenta a expressão tubular proximal da 25OH D 1 α -hydroxylase resultando no aumento da produção da 1,25 (OH) vitamina D₃ e, conseqüentemente, no aumento da absorção intestinal de cálcio^{76,78}. Entretanto, a maioria dos pacientes com DMD têm níveis deficientes ou insuficientes de 25OH vitamina D e dessa maneira, não haverá produção da forma ativa da vitamina D (calcitriol) e aumento da absorção intestinal de cálcio, gerando balanço negativo de cálcio. A forma ativa da vitamina D é necessária para o transporte ativo de cálcio na mucosa intestinal³⁵ e diante de sua deficiência ou insuficiência, a absorção intestinal desse íon é apenas 10% a 15%⁸⁰. Mas o PTH também aumenta a reabsorção tubular renal distal de cálcio, explicando a hipocalciúria. No osso, o PTH estimula a liberação de cálcio para o fluido extracelular aumentando a reabsorção óssea osteoclástica. Este último efeito do hormônio pode reduzir a DMO e piorar a qualidade da massa óssea. Os pacientes do estudo apresentaram um escore-Z da DMOa da coluna lombar bastante reduzido em relação aos controles (Tabela 9). Os valores do PTH também eram maiores nos pacientes, embora sem significância estatística (Tabela 5). Embora dentro dos valores de normalidade, os níveis de PTH eram maiores e

estatisticamente significativos nos pacientes cadeirantes nos quais o osso é de pior qualidade (Tabela 7) e nos não usuários de corticoide (Tabela 8).

Além dos efeitos sobre o cálcio, o PTH regula também a concentração de fosfato no plasma e sua ação no manuseio do fosfato no túbulo renal é imediato⁸¹. O resultado final da presença de concentrações mais elevadas de PTH em rins com função normal é a redução do fosfato sérico. Enquanto o PTH é um potente estimulador da forma ativa da vitamina D, esta suprime o hormônio da paratireoide. Dessa maneira, o calcitriol regula diretamente a concentração de fosfato sérico aumentando sua absorção intestinal, e indiretamente quando aumenta a reabsorção tubular renal devido à sua ação supressora sobre o PTH. Os efeitos opostos de PTH e da vitamina D no rim e intestinos, respectivamente, mantém o equilíbrio dos níveis de fosfato, preservando a homeostase de íons de cálcio⁷⁸. No presente estudo, o fósforo sérico tinha níveis séricos significativamente maiores que aquele dos controles, assim como a reabsorção tubular de fosfato (TP de fosfato) (Tabela 5). Sabe-se que existe uma relação especial entre as concentrações de cálcio e fosfato no organismo que é representada pelo produto de solubilidade para o sistema cálcio/fosfato. Quando se atinge esse produto estabelece-se uma relação inversa entre as concentrações de cálcio e fosfato. Pode-se especular aqui que pacientes com DMD têm a homeostase do cálcio alterada com um balanço negativo de cálcio constante. Dessa maneira, se a concentração plasmática de cálcio cair, aquela do fosfato terá que subir para a manutenção do produto do sistema cálcio/fosfato. Isto explicaria a maior reabsorção tubular de fosfato (TP de fosfato) e o maior nível de fósforo sérico quando foi feita a comparação com os controles (Tabela 5). Outra possível explicação para os achados do estudo em relação ao fósforo (fósforo sérico e TP de fósforo) seria a importante ação desse íon na mineralização óssea. A manutenção de adequados níveis de fósforo inorgânico é essencial para a atividade dos osteoblastos e osteócitos no processo de mineralização da matriz óssea. E o fósforo é um dos principais componentes necessários na formação da hidroxiapatita durante essa mineralização^{82,83}. Pacientes com DMD têm alteração da homeostase do cálcio e reabsorção óssea compensatória, culminando com comprometimento da mineralização óssea. O aumento do fósforo sérico nos pacientes em relação aos controles, embora ainda dentro de limites normais, e o aumento do TP de fosfato poderia ser uma compensação, considerando que a diminuição dos produtos formados pelo fosfato e cálcio está diretamente relacionada à diminuição da mineralização óssea⁷⁵.

Experimentos têm identificado um sinal de transdução do FGF-23, uma

fosfatona, na glândula paratireóide, bem como o seu efeito sobre a secreção de PTH, mostrando que o FGF-23 age sobre os receptores da glândula reduzindo os níveis de PTH do soro, atuando como um hormônio contra regulador para a forma ativa da vitamina D e contribuindo para um circuito de realimentação negativo, envolvendo o osso, rins e a glândula paratireóide⁸⁴. Estudos iniciais sugerem alterações nos níveis de FGF-23 nos pacientes com DMD e relacionam o tratamento com GC à redução do número e da função dos osteoblastos, à inibição da produção de fatores de crescimento pelo osso, como o *insulin-like growth factor 1* (IGF-I) e o *transforming growth factor β* (TGF- β), que têm atividade anabólica sobre o tecido ósseo^{82,85}. Entretanto, mais estudos são necessários para maiores esclarecimentos.

O ácido cítrico é um ácido tricarboxílico de origem principalmente endógena resultando do metabolismo intermediário dos carboidratos, gorduras e proteínas das células hepáticas, musculares e ósseas. Também se origina da dieta sendo absorvido no intestino delgado e promove sobrecarga alcalina rápida com elevação dos seus níveis plasmáticos dentro de 30 minutos. Estima-se que menos de 1% do citrato alimentar, ou 1 a 3% do citrato administrado via oral, não é metabolizado e é eliminado na urina⁸⁶. A influência do citrato dietético na citratúria depende mais de variações no estado ácido-básico sistêmico do que propriamente de seu conteúdo na alimentação, entretanto, observou-se correlação entre absorção intestinal de álcali e excreção urinária de citrato em formadores de cálculos contendo cálcio⁸⁶. O citrato produzido e não utilizado pelas células é liberado na circulação resultando no citrato plasmático e a maior parte desse circula livremente no sangue. Os rins são os principais órgãos de depuração do citrato e este está envolvido não só na produção de energia no ciclo do ácido tricarboxílico, mas também na biosíntese de esteroides e de ácidos gordurosos, na manutenção do equilíbrio ácido-básico⁸⁶ e na inibição da cristalização urinária, particularmente dos cristais de oxalato de cálcio e de fosfato de cálcio, sendo bem conhecida a sua propriedade de formar complexos solúveis com os sais de cálcio.

Expressa-se a excreção urinária de citrato em crianças e adolescentes em mg/g de creatinina⁸⁷. Entretanto, esta forma de expressar a citratúria não deve ser utilizada para pacientes com DMD porque os mesmos têm uma doença muscular crônica degenerativa e progressiva, não geram quantidades normais de creatina, que é o precursor da creatinina. No presente estudo, a excreção urinária de citrato foi também expressa em mg/1,73 m² de superfície corpórea (SC), gerando resultados mais fidedignos para a excreção urinária desta molécula. Encontrou-se valores menores e

estatisticamente significativos para os pacientes quando comparados com os controles (Tabela 5). Até o momento, não existem evidências na literatura para este achado e a dosagem dos níveis de citrato urinário não faz parte das recomendações na avaliação de pacientes com DMD³⁵. Entretanto, como mencionado acima, o citrato resulta principalmente do metabolismo endógeno intermediário dos carboidratos, gorduras e proteínas das células hepáticas, musculares e ósseas. O músculo doente dos pacientes com DMD poderia ter incapacidade de gerar citrato em quantidades adequadas. Outra possibilidade seria a geração de acidose metabólica subclínica, consequente do processo inflamatório crônico no músculo, consumindo maiores quantidades de citrato.

Observou-se também correlação negativa e significativa entre o CMO ($r_p = -0,519$; $p = 0,048$) e a DMOa da coluna lombar ($r_p = -0,477$; $p = 0,045$) com a citratúria mg/g de creatinina em usuários de corticoide. Como já comentado, a excreção urinária de citrato em pacientes com DMD não deve ser expressa em mg/g creatinina, considerando que estes pacientes têm uma doença muscular crônica e degenerativa, e esta correlação pode estar equivocada. Entretanto, encontrou-se uma tendência para correlação negativa entre a excreção urinária de citrato em mg/m² SC e o CMO ($r_s = -0,450$; $p = 0,092$) e a excreção urinária de citrato em mg/m² SC e a DMOv ($r_s = -0,351$; $p = 0,073$) da coluna lombar em usuários de corticoide e em todo o grupo de paciente, respectivamente. Pacientes já usuários de corticoide têm a massa óssea mais comprometida que aqueles não usuários e são mais inflamados. Especula-se mais uma vez, se eles não teriam menor geração de citrato e se estariam consumindo mais essa molécula porque têm maior processo inflamatório. Finalmente, houve uma tendência para correlação negativa entre a DMOv ($r_s = -0,339$; $p = 0,084$) e a excreção urinária de citrato em mg/g creatinina, e entre o score-Z da DMOa ($r_p = -0,442$; $p = 0,066$) da coluna lombar também com a excreção urinária de citrato em mg/g creatinina, sugerindo que o citrato poderia estar mesmo envolvido na deterioração da massa óssea.

Vários mecanismos fisiopatológicos podem contribuir para a deterioração da saúde dos ossos de pacientes com DMD: (a) fraqueza muscular progressiva; (b) efeitos das citocinas liberadas devido a resposta inflamatória dos músculos deficientes em distrofina; (c) ativação da osteoclastogênese pelo metabolismo muscular alterado; (d) efeitos colaterais de corticosteroides que incluem: o atraso puberal devido a redução dos esteroides sexuais, mineralização óssea prejudicada, e absorção intestinal de cálcio

reduzida; (e) efeitos da imobilização óssea na homeostase do cálcio; (f) estoques insuficientes de vitamina D devido a: interferência do uso do corticoide na absorção intestinal de vitamina D, e baixa exposição solar devido a redução da atividade física ao ar livre. Diante disso, a monitorização da qualidade óssea é muito importante e recomenda-se a avaliação da massa óssea em todos os pacientes com DMD a cada um a dois anos⁶⁷. Utiliza-se a DXA conforme recomendações oficiais da International Society for Clinical Densitometry (ISCD) em 2013⁴³.

No estudo em questão utilizou-se a DXA para avaliação da massa óssea e encontrou-se valores menores e estatisticamente significantes para o escore-Z da DMOa da coluna lombar no grupo DMD quando comparado aos controles (Tabela 9; Figura 2). Entretanto, não houve diferenças entre os subgrupos cadeirantes e não cadeirantes e uso de corticoide e não uso de corticoide. Resultados algo semelhantes foram observados por Larson & Henderson em um estudo com 41 pacientes, nos quais a DMO da coluna lombar e do fêmur proximal diminuíram significativamente com a perda da deambulação (média escore-Z -1,7 e -3,9, respectivamente)²⁸.

Um número considerável de autores têm estudado a qualidade da massa óssea em pacientes com DMD^{39,66,88-90}. Embora tenham sido realizados *workshops* internacionais desde 2004 para definir condutas e tratamentos para manutenção da qualidade da massa óssea, a maioria dos estudos não utilizaram controles e não foram metodologicamente corretos. Em um grupo de 32 meninos com DMD, Bianchi e colaboradores encontraram que a dose cumulativa de corticosteroides correlacionou-se positivamente com a redução da DMO e que esta estava significativamente menor nos pacientes quando comparada aos controles, nos diversos sítios ósseos avaliados (coluna lombar e corpo total). Entretanto, não encontraram diferença no escore-Z da DMOa da coluna lombar, mesmo após ajuste para área ou volume da vértebra³⁰. Os mesmos autores em 2011 avaliaram 33 pacientes com DMD e encontraram que o escore-Z do CMO e da DMOa da coluna lombar diminuíram progressivamente com o tratamento com corticosteroides. Demonstraram ainda que estas mudanças no CMO e DMO correlacionaram positivamente com níveis alterados de 25OH vitamina D ($r=0,53$; $p<0,01$) e negativamente com os níveis urinários de N-telopeptídeo ($r=-0,58$; $p<0,01$)²⁹. Estudos realizados por Södepalm & Magnusson em 2007 e por Södepalm e colaboradores em 2008 demonstraram menor DMO no grupo de pacientes em relação aos controles em todos os sítios ósseos avaliados. As diferenças aumentaram com a idade e os marcadores bioquímicos de formação e reabsorção óssea estavam reduzidos,

assim como os níveis de vitamina D. Os estudos sugerem que os mecanismos para estes resultados seriam uma ação combinada de tratamento com GC, a massa muscular comprometida e a redução da carga mecânica sobre os ossos³¹. Em 2012, Södepalm e colaboradores continuaram os estudos sobre DMD e compararam este grupo de pacientes com aqueles com distrofia muscular de Becker. Os autores observaram valores da CMO e DMO significativamente menores no grupo com DMD maiores de 10 anos em comparação com os pacientes com Becker com a mesma idade⁹¹. Rufo e colaboradores (2011) também descreveram reduzido escore-Z da DMOa da coluna lombar e aumento da IL-6, marcador de alta reabsorção óssea, em pacientes com DMD. Os autores sugeriram que a terapia direcionada anti-IL-6 pode ter um impacto positivo sobre o fenótipo ósseo nestes pacientes³⁴.

Em 2012, Mayo e colaboradores observaram mudança significativa no escore-Z da DMOa da coluna lombar depois da terapia com deflazacorte (0,9 mg/Kg/dia), associada ao aumento da massa magra, e sugeriram que mudanças na composição corporal (massa magra, massa gorda e massa óssea) são importantes para a saúde óssea na DMD. Os autores sugeriram ainda que a força muscular reduzida associada aos baixos níveis de atividade física podem comprometer a unidade músculo-esquelética e contribuir para a redução da DMO³⁷. King e colaboradores (2014), em um estudo com 22 pacientes com DMD e 267 controles sadios demonstraram menores valores para os escores-Z da DMO no corpo total e na região craniana ajustado para a idade do que aqueles dos controles, e observaram que os pacientes que usaram GC apresentaram menor DMO para idade, menor DMO estatura para a idade, e menor CMO areal do que aqueles que não usaram esteroides⁹¹.

Tian e colaboradores estudaram também a massa óssea nos pacientes com DMD e observaram valores baixos para os escores-Z da DMO e CMO da coluna lombar e do quadril, os quais pioraram com a idade e variaram com o local de medição. Pacientes que usaram corticoide tiveram pior valor para o escore-Z da coluna lombar do que aqueles que não fizeram uso de corticoides⁹². Ainda em 2014, Houston e colaboradores avaliaram 39 crianças com DMD e mostraram valores para o escore-Z da DMOa da coluna lombar significativamente menores nos pacientes tratados com GC em relação aos não tratados ($p < 0,001$), e observaram ainda, uma tendência ao aumento desse valor do escore-Z da DMOa com o uso do alendronato⁹³. Os autores sugerem neste estudo que a triagem para a baixa DMO em pacientes com DMD deve ocorrer em idade mais precoce e que bisfosfonatos podem ser uma modalidade de tratamento aceitável, na

pendência de estudos mais amplos em longo prazo⁹³. Finalmente, Vuillerot e colaboradores (2014) observaram aumento significativo da massa magra em pacientes com DMD tratados com GC ($p < 0,0001$). Aqueles não tratados apresentaram deterioração na composição corporal confirmada por aumento significativo na percentagem de gordura corporal. Foram observadas correlações negativas significativas entre a percentagem de massa de gordura corporal e função muscular ($r = 0,79$; $p < 0,0001$)⁸⁷.

Considerando que redução da DMO, fraturas e escoliose são componentes clínicos sempre presentes na DMD a avaliação da saúde óssea é imperativa nesses pacientes.

As principais limitações desse estudo foram a pequena amostra e a dificuldade de acompanhamento e realização de exames nestes pacientes, que com o avançar da idade evoluem com deterioração motora, cardíaca e respiratória, prejudicando a saída do domicílio. A pequena amostra se justifica pela raridade da doença e a dificuldade de deslocamento e acompanhamento destes pacientes é facilmente observada comparando-se o número inicial de pacientes no estudo com o número que realizou todos os exames. Dentre os pontos fortes destacamos a inclusão de um grupo controle constituído por indivíduos saudáveis, pareados por idade, e a possibilidade da divisão dos pacientes em subgrupos de cadeirantes e não cadeirantes e pacientes com e sem história de uso de glicocorticoides, possibilitando melhor estudo comparativo. Outro ponto positivo que pode ser destacado foi a possibilidade de avaliar praticamente todos os marcadores tradicionais de remodelamento ósseo, favorecendo o conhecimento mais detalhado da saúde óssea dos pacientes.

5.5 Considerações Finais:

Nossos achados reforçam algumas informações relatadas em casuísticas internacionais sobre o metabolismo ósseo nos pacientes com DMD. A avaliação densitométrica confirmou a redução da DMO nestes pacientes, estando diretamente relacionadas à ausência da distrofina na doença e às alterações metabólicas que ocorrem em sua consequência.

Observamos que nossos pacientes com DMD apresentaram diferenças significativas clínicas e laboratoriais e uma redução global da DMO em comparação com controles saudáveis. Observamos também que existem diferenças

antropométricas, clínicas e laboratoriais entre grupos de cadeirantes e não cadeirantes com DMD, ainda pouco exploradas literatura. Não houve diferença significativa entre o grupo com história de uso de GC e aquele sem história de uso desse medicamento nas análises antropométricas, clínicas, laboratoriais e densitométricas. Houve correlações negativas e significativas entre o CMO e a DMO dos sítios ósseos avaliados pela DXA e a excreção urinária de citrato em mg/m² SC e mg/g de creatinina, fato este ainda não explorado na literatura.

Avaliação de biomarcadores ósseos no estudo da massa óssea de pacientes com DMD já é citado na literatura e pode ajudar a explicar as alterações aqui encontradas, mostrando a necessidade de mais estudos. Este será o próximo passo desse projeto que pretende avaliar o FGF-23, Interleucinas 1 e 6, TNF- α , osteoprotegerina, osteopontina e esclerotina.

A maioria dos meninos com DMD estão vivendo até na idade adulta e a manutenção da saúde óssea é extremamente importante para a sua qualidade de vida. Uma boa massa óssea pode contribuir para o adiamento da perda de deambulação e pode contribuir positivamente para melhor qualidade de vida, e eventualmente, a sobrevida.

Orientações práticas baseadas em evidências são necessárias para acompanhar a saúde óssea desses pacientes, incluindo a monitorização de 25OH vitamina D, densitometria óssea, biomarcadores de remodelamento ósseo e uso de bisfosfonatos. Estudos prospectivos multicêntricos em longo prazo com protocolos clínicos padronizados são necessários para explorar questões clínicas relacionadas e desenvolver diretrizes baseadas em evidências para a monitorização da saúde óssea e tratamento de pacientes com DMD.

5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Biggar WD. Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Rev.* 2006;27(3):83–8.
2. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.* 2010;9(1):77–93.
3. Manzur a Y, Kinali M, Muntoni F. Update on the management of Duchenne muscular dystrophy. *Arch Dis Child.* 2008 ;93(11):986–90.
4. Kinali M, Manzur A, Muntoni F. Recent developments in the management of

- Duchenne muscular dystrophy. *Paediatr Child Health* 2007; 18(1): 22-6.
5. Reed U. Doenças neuromusculares. *J Pediatr*. 2002;78:89–103.
 6. Mah JK, Korngut L, Dykeman J, Day L, Pringsheim T, Jette N. A systematic review and meta-analysis on the epidemiology of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 2014;24(6):482–91.
 7. Costanza L, Moggio M. Muscular dystrophies: histology, immunohistochemistry, molecular genetics and management. *Curr Pharm Des*. 2010;16(8):978–87.
 8. Santos N, Rezende M, Terni A. Perfil clínico e funcional dos pacientes com distrofia muscular de Duchenne assistidos na Associação Brasileira de Distrofia Muscular (ABDIM). *Neurosci Lett* 2006;1(14):015–22.
 9. Yiu EM, Kornberg AJ. Duchenne muscular dystrophy. *Neurology India*. 2008;56(3):236–47.
 10. Ciafaloni E, Fox DJ, Pandya S, Westfield CP, Puzhankara S, Romitti P a, et al. Delayed diagnosis in duchenne muscular dystrophy: data from the Muscular Dystrophy Surveillance, Tracking, and Research Network (MD STARnet). *J Pediatr*. 2009 ;155(3):380–5.
 11. Lebel D, Corston J, McAdam L. Glucocorticoid treatment for the prevention of scoliosis in children with Duchenne muscular dystrophy: long-term follow-up. *J Bone Joint Surg Am*. 2013;95:1057–61.
 12. Mullender M, Blom N, De Kleuver M, Fock J, Hitters W, Horemans A, et al. A Dutch guideline for the treatment of scoliosis in neuromuscular disorders. *Scoliosis*. 2008;3:14.
 13. Rosa Güell M, Avendano M, Fraser J, Goldstein R. Alteraciones pulmonares y no pulmonares en la distrofia muscular de Duchenne. *Arch Bronconeumol*. 2007;43(10):557–61.
 14. McMillan HJ, Campbell C, Mah JK. Duchenne muscular dystrophy: Canadian paediatric neuromuscular physicians survey. *Can J Neurol Science*. 2010;37(2):195–205.
 15. Bushby K, Finkel R, Birnkrant D. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. *Lancet Neurology*. 2010;9(2):177–89.
 16. Manzur a Y, Muntoni F. Diagnosis and new treatments in muscular dystrophies. *Postgrad Med J*. 2009;85(1009):622–30.
 17. Angelini C. The role of corticosteroids in muscular dystrophy: a critical appraisal. *Muscle Nerve*. 2007;36(4):424–35.

18. Angelini C, Peterle E. Old and new therapeutic developments in steroid treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol.* 2012;31(1):9–15.
19. Moxley RT, Ashwal S, Pandya S, Connolly a, Florence J, Mathews K, et al. Practice parameter: corticosteroid treatment of Duchenne dystrophy: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology.* 2005;64(1):13–20.
20. Strober JB. Therapeutics in duchenne muscular dystrophy. *NeuroRx.* 2006;3(2):225–34.
21. Bonifati MD, Ruzza G, Bonometto P, Berardinelli a, Gorni K, Orcesi S, et al. A multicenter, double-blind, randomized trial of deflazacort versus prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve.* 2000;23(9):1344–7.
22. Biggar WD, Gingras M, Fehlings DL, Harris V a, Steele C a. Deflazacort treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr.* 2001;138(1):45–50.
23. Campbell C, Jacob P. Deflazacort for the treatment of Duchenne Dystrophy: a systematic review. *BMC Neurol.* 2003;10:1–10.
24. Kinali M, Mercuri E, Main M, Muntoni F, Dubowitz V. An effective, low-dosage, intermittent schedule of prednisolone in the long-term treatment of early cases of Duchenne dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 2002;12(S1):169–74.
25. Patrício J, Oliveira P, Faria M. Osteoporose induzida por corticóides. *Arq Med.* 2006;5/6(20):173–8.
26. Escalada J. Osteoporosis secundaria a tratamiento con glucocorticoides. *Endocrinol y Nutr.* 2005;52(2):88–96.
27. Van Staa TP, Leufkens HGM, Cooper C. The epidemiology of corticosteroid-induced osteoporosis: a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2002 ;13(10):777–87.
28. Larson CM, Henderson RC. Bone mineral density and fractures in boys with Duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr Orthop.* 2000;20(1):71–4.
29. Bianchi ML, Morandi L, Andreucci E, Vai S, Frasunkiewicz J, Cottafava R. Low bone density and bone metabolism alterations in Duchenne muscular dystrophy: response to calcium and vitamin D treatment. *Osteoporos Int.* 2011;22(2):529– 39.
30. Bianchi ML, Mazzanti a, Galbiati E, Saraifoger S, Dubini a, Cornelio F, et al. Bone mineral density and bone metabolism in Duchenne muscular dystrophy. *Osteoporos Int* 2003;14(9):761–7.
31. Söderpalm A, Magnusson P. Low bone mineral density and decreased bone turnover in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul disord.* 2007;17:919–28.

32. Hawker G a, Ridout R, Harris V a, Chase CC, Fielding LJ, Biggar WD. Alendronate in the treatment of low bone mass in steroid-treated boys with Duchennes muscular dystrophy. *Arch Phys Med Rehabil.* 2005;86(2):284–8.
33. Crabtree NJ, Roper H, McMurchie H, Shaw NJ. Regional changes in bone area and bone mineral content in boys with duchenne muscular dystrophy receiving corticosteroid therapy. *J Pediatr.* 2010;156(3):450–5.
34. Rufo A, Del Fattore A, Capulli M, Carvello F, De Pasquale L, Ferrari S, et al. Mechanisms inducing low bone density in Duchenne muscular dystrophy in mice and humans. *J Bone Miner Res.* 2011;26(8):1891–903.
35. Morgenroth VH, Hache LP, Clemens PR. Insights into bone health in Duchenne muscular dystrophy. *Bonekey Rep.* 2012;1(9): 1-11.
36. Bothwell J, Gordon K. Vertebral fractures in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Clin Pediatr.* 2003;353–6.
37. Mayo a L, Craven BC, McAdam LC, Biggar WD. Bone health in boys with Duchenne Muscular Dystrophy on long-term daily deflazacort therapy. *Neuromuscul Disord.* 2012;22(12):1040–5.
38. García-Bustínduy M, Gantes M a. Corticoides y osteoporosis. *Actas Dermosifiliogr.* 2007;98(8):526–30.
39. Bachrach L. Taking steps towards reducing osteoporosis in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 2005;15:86–7.
40. Bandeira F, Costa AG, Soares Filho MA, Pimentel L, Lima L, Bilezikian JP. Bone markers and osteoporosis therapy. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2014;58(5):504–13.
41. Williams J, Wilson C, Biassoni L, Suri R, Fewtrell M. Dual energy x-ray absorptiometry and quantitative ultrasound are not interchangeable in diagnosing abnormal bones. 2012;822–4.
42. Kelly TL, Wilson KE, Heymsfield SB. Dual energy X-ray absorptiometry body composition reference values from NHANES. *PLoS One.* 2009;4(9):2–9.
43. Crabtree NJ, Arabi A, Bachrach LK, Fewtrell M, El-Hajj Fuleihan G, Kecskemethy HH, et al. Dual-energy X-ray absorptiometry interpretation and reporting in children and adolescents: the revised 2013 ISCD Pediatric Official Positions. *J Clin Densitom;* 2014;17(2):225–42.
44. Cremers S, Garnero P, Seibel MJ. Chapter 87 - Biochemical Markers of Bone Metabolism. *Princ Bone Biol.* 2008;(C):1857–81.
45. Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocr Ver.* 2008;29(4):403–40.

46. Joyce NC, Hache LP, Clemens PR. Bone health and associated metabolic complications in neuromuscular diseases. *Phys Med Rehabil Clin N Am.*2012;23(4):773–99.
47. Christenson RH. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clin Biochem.* 1997;30(8):573–93.
48. Söderpalm a C, Magnusson P, Ahlander a C, Karlsson J, Kroksmark a K, Tulinius M, et al. Bone markers and bone mineral density in Duchenne muscular dystrophy. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2008;8(1):24.
49. Penido MGG, Diniz JSS, Guimarães MMM, Cardoso RB, Souto MFDO, Penido MG. Excreção urinária de cálcio, ácido úrico e citrato em crianças e adolescentes saudáveis. *J Pediatr (Rio J).* 2002;78(2):153–60.
50. Brasil. Orientações para coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde. Ministério da Saúde. 2011.
51. Stewart L, Houghton J, Hughes AR, Pearson D, Reilly JJ. Dietetic management of pediatric overweight: Development and description of a practical and evidence-based behavioral approach. *J Am Diet Assoc.* 2005;105(11):1810–5.
52. Welch TR. Growth in Duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr.* 2013;163(6):1537–9.
53. Sarrazin E, Hagen M Von Der, Schara U, Von Au K, Kaindl AM. Growth and psychomotor development of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Eur J Paediatr Neurol.*2014;18(1):38–44.
54. M DO. The new WHO child growth standards. *Paediatr Croat Suppl.* 2008;52(S.1):13–7.
55. Fewtrell MS. Bone densitometry in children assessed by dual x ray absorptiometry: uses and pitfalls. *Arch Dis Child.* 2003;88(9):795–8.
56. Del Rio L, Carrascosa a, Pons F, Gusinyé M, Yeste D, Domenech FM. Bone mineral density of the lumbar spine in white Mediterranean Spanish children and adolescents: changes related to age, sex, and puberty. *Pediatr Res.* 1994;35(3):362–6.
57. Kalender W a., Felsenberg D, Genant HK, Fischer M, Dequeker J, Reeve J. The European Spine Phantom - A tool for standardization and quality control in spinal bone mineral measurements by DXA and QCT. *Eur J Radiol.* 1995;20(2):83–92.
58. Bonnicksen SL, Johnston CC, Kleerekoper M, Lindsay R, Miller P, Sherwood L, et al. Importance of precision in bone density measurements. *J Clin Densitom.* 2001;4(2):105–10.

59. Bushby K, Bourke J, Bullock R, Eagle M, Gibson M, Quinby J. The multidisciplinary management of Duchenne muscular dystrophy. *Curr Paediatr*. 2005;15(4):292–300.
60. Simon V, Resende M. Duchenne muscular dystrophy: Quality of life among 95 patients evaluated using the Life Satisfaction Index for Adolescents. *Arq neuropsiquiatric*. 2011;69(1):19–22.
61. Kinali M, Main M, Eliahoo J, Messina S, Knight RK, Lehovskey J, et al. Predictive factors for the development of scoliosis in Duchenne muscular dystrophy. *Eur J Paediatr Neurol*. 2007;11(3):160–6.
62. King WM, Ruttencutter R, Nagaraja HN, Matkovic V, Landoll J, Hoyle C, et al. Orthopedic outcomes of long-term daily corticosteroid treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*. 2007;68(19):1607–13.
63. Douvillez B, Braillon P, Hodgkinson I, Berard C. Douleur, ostéopénie et composition corporelle chez 22 patients atteints de dystrophie musculaire progressive de Duchenne: Étude descriptive. *Ann Readapt Med Phys*. 2005;48(8):616–22.
64. Houde S, Filiatrault M, Fournier A, Dubé J, D'Arcy S, Bérubé D, et al. Deflazacort use in Duchenne muscular dystrophy: an 8-year follow-up. *Pediatr Neurol*. 2008;38(3):200–6.
65. Biggar WD, Harris V a, Eliasoph L, Alman B. Long-term benefits of deflazacort treatment for boys with Duchenne muscular dystrophy in their second decade. *Neuromuscul Disord*. 2006;16(4):249–55.
66. Biggar W, Bachrach L. Bone health in Duchenne muscular dystrophy: a workshop report from the meeting in Cincinnati, Ohio, July 8, 2004. *Neuromuscul Disord*. 2005;15:80–5.
67. Buckner JL, Bowden S a., Mahan JD. Optimizing Bone Health in Duchenne Muscular Dystrophy. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:1–9.
68. Escolar DM, Hache LP, Clemens PR, Cnaan a, McDonald CM, Viswanathan V, et al. Randomized, blinded trial of weekend vs daily prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*. 2011;77(5):444–52.
69. Lovering R, Porter N, Bloch R. The muscular dystrophies: from genes to therapies. *Phys Ther*. 2005 ;85:1372–88.
70. Ay M, Kuntzer T, Pike M, Av S. Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy (Review). *Cochrane Collab*. 2009;(1).
71. Biggar WD, Politano L, Harris V a, Passamano L, Vajsar J, Alman B, et al. Deflazacort in Duchenne muscular dystrophy: a comparison of two different protocols. *Neuromuscul Disord*. 2004;14(8-9):476–82.

72. Liu D, Ahmet A, Ward L, Krishnamoorthy P, Mandelcorn ED, Leigh R, et al. A practical guide to the monitoring and management of the complications of systemic corticosteroid therapy. *Allergy Asthma Clin Immunol. Allergy, Asthma & Clinical Immunology*; 2013;9(1):30.
73. Hyser CL, Mendell JR. Recent advances in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neurol Clin.* 1988;6(3):429–53.
74. Ichim TE, Alexandrescu DT, Solano F, Lara F, Campion RDN, Paris E, et al. Mesenchymal stem cells as anti-inflammatories: implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cell Immunol.* 2010;260(2):75–82.
75. Paul R. Turner, Peking Fong, Wilfred Denetclaw and RAS. Increased calcium Influx in dystrophic muscle. *J Cell Biol.* 1991;115(6):1701–12.
76. Imbert N, Vandebrouck C, Constantin B, Duport G, Guillou C, Cognard C, et al. Hypoosmotic shocks induce elevation of resting calcium level in duchenne muscular dystrophy myotubes contracting in vitro. *Neuromuscul Disord.* 1996;6(5):351–60.
77. Hopf FW, Reddy P, Hong J, Steinhardt R a. A capacitative calcium current in cultured skeletal muscle cells is mediated by the calcium-specific leak channel and inhibited by dihydropyridine compounds. *J Biol Chem.* 1996;271(37):22358–67.
78. Tutdibi O, Brinkmeier H, Rüdell R, Föhr KJ. Increased calcium entry into dystrophin-deficient muscle fibres of MDX and ADR-MDX mice is reduced by ion channel blockers. *J Physiol.* 1999;515 (Pt 3):859–68.
79. Vandebrouck A, Ducret T, Basset O, Seville S, Raymond G, Ruegg U, et al. Regulation of store-operated calcium entries and mitochondrial uptake by minidystrophin expression in cultured myotubes. *FASEB J.* 2005;20(1):1–19.
80. Misra M, Pacaud D, Petryk A, Collett-Solberg PF, Kappy M. Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendations. *Pediatrics.* 2008;122(2):398–417.
81. Bacic D, Lehir M, Biber J, Kaissling B, Murer H, Wagner C a. The renal Na⁺/phosphate cotransporter NaPi-IIa is internalized via the receptor-mediated endocytic route in response to parathyroid hormone. *Kidney Int.* 2006;69(3):495– 503.
82. Penido MGG, Alon US. Phosphate homeostasis and its role in bone health. *Pediatr Nephrol.* 2012;27(11):2039–48.
83. Magne D, Bluteau G, Faucheux C, Palmer G, Vignes-Colombeix C, Pilet P, et al. Phosphate is a specific signal for ATDC5 chondrocyte maturation and apoptosis- associated mineralization: possible implication of apoptosis in the regulation of endochondral ossification. *J Bone Miner Res.* 2003;18(8):1430–42.

84. Kuro-O M. Overview of the FGF23-Klotho axis. *Pediatr Nephrol.* 2010;25(4):583–90.
85. Sheng MHC, Lau KHW, Baylink DJ. Role of Osteocyte-derived Insulin-Like Growth Factor I in Developmental Growth, Modeling, Remodeling, and Regeneration of the Bone. *J bone Metab.* 2014;21:41–54.
86. Del Valle EE, Spivacow FR, Negri AL. Citrato y litiasis renal. *Med.* 2013;73(4):363–8.
87. Srivastava T, Winston MJ, Auron A, Alon US. Urine calcium/citrate ratio in children with hypercalciuric stones. *Pediatr Res.* 2009;66(1):85–90.
88. Quinlivan R, Roper H, Davie M, Shaw NJ, McDonagh J, Bushby K. Report of a Muscular Dystrophy Campaign funded workshop Birmingham, UK, January 16th 2004. Osteoporosis in Duchenne muscular dystrophy; its prevalence, treatment and prevention. *Neuromuscul Disord.* 2005;15(1):72–9.
89. Muntoni F, Bushby K, Manzur AY. Muscular dystrophy campaign funded workshop on management of scoliosis in Duchenne muscular dystrophy 24 January 2005, London, UK. *Neuromuscul Disord.* 2006;16(3):210–9.
90. Quinlivan R, Shaw N, Bushby K. 170th ENMC International Workshop: bone protection for corticosteroid treated Duchenne muscular dystrophy. 27-29 November 2009, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord.* Elsevier B.V.; 2010;20(11):761–9.
91. King WM, Kissel JT, Visy D, Goel PK, Matkovic V. Skeletal health in Duchenne dystrophy: Bone-size and subcranial dual-energy X-ray absorptiometry analyses. *Muscle and Nerve.* 2014;49(4):512–9.
92. Tian C, Wong B, Hornung L, Khoury J, Miller L, Bange J, et al. G.P.171. *Neuromuscul Disord.* 2014;24(9-10):857.
93. Houston C, Mathews K, Shibli-Rahhal A. Bone density and alendronate effects in Duchenne muscular dystrophy patients. *Muscle Nerve.* 2014;49(4):506–11.

6- ANEXOS

ANEXO 6.1: PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DO METABOLISMO MINERAL ÓSSEO EM PACIENTES COM DISTROFIA MINERAL DE DUCHENNE

Título Principal da Pesquisa:

“Avaliação dos marcadores do metabolismo mineral ósseo em pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne”

NOME: _____
 IDADE: _____ DATA DE NASCIMENTO: _____ PRONTUÁRIO: _____
 RESPONSÁVEL: _____ CIDADE: _____
 ENDEREÇO: _____
 TELEFONE PARA CONTATO: _____
 DATA DA COLETA DE DADOS: _____

ASPECTOS CLÍNICOS:

PESO: _____ ALTURA: _____ PRESSÃO ARTERIAL: _____

DATA DO DIAGNÓSTICO		
TIPO DE DIAGNÓSTICO		
TIPO DE DELEÇÃO DEFINIDA	SIM () QUAL _____	NÃO ()
CADEIRANTE	SIM () A QUANTO TEMPO _____	NÃO ()
HISTÓRIA DE FRATURA	SIM () LOCAL _____	NÃO ()
HISTÓRIA DE CIRURGIA ORTOPÉDICA	SIM ()	NÃO ()
HISTÓRIA DE ESCOLIOSE	SIM ()	NÃO ()
MEDICAMENTOS EM USO	SIM () QUAIS _____ TEMPO _____	NÃO ()
USO DE BIPAP	SIM ()	NÃO ()
USO DE CORTICÓIDE	SIM () QUAL _____ INÍCIO _____ TEMPO _____ DOSE _____	NÃO ()
USO DE VITAMINA D	SIM () NÃO ()	HÁ QUANTO TEMPO _
USO DE CORTICÓIDE	SIM () QUAL _____ INÍCIO _____ TEMPO _____ DOSE _____	NÃO ()

PRESENÇA DE ALTERAÇÕES METABÓLICAS ANTES DO DIAGNÓSTICO (HIPERPARATIREOIDISMO, HIPERCALCEMIA, ETC)	SIM () QUAIS _____	NÃO ()
CRIANÇAS AGUDAMENTE ENFERMAS	SIM ()	NÃO ()

ASPECTOS LABORATORIAIS

AMOSTRA SANGUINEA			
CÁLCIO		25- OH VITAMINA D	
FÓSFORO		PTH i	
FOSFATASE ALCALINA ÓSSEA		UREIA	
CREATININA			
AMOSTRA URINÁRIA 24H			
CÁLCIO		CITRATO	
FÓSFORO		CREATININA	
EXAMES LABORATORIAIS AMOSTRA URINÁRIA ÚNICA			
EXAMES DE IMAGEM			
DENSITOMETRIA MINERAL ÓSSEA DE COLUNA LOMBAR L1-L4 COM CORREÇÃO PARA A IDADE			
Padrão da Densitometria:			
DMO a :		Score Z DMO:	
DMO vol:		CMO:	

ANEXO 6.2 – TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (pacientes com seis anos ou menos)

Título: “Avaliação dos marcadores do metabolismo mineral ósseo em pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne”

Investigadores:

1. Juliana Gurgel Gianetti -
gurgelju@yahoo.com.br Telefone: (31)
99548040

2. Maria Goretti Moreira Guimarães Penido -
mariagorettipenido@yahoo.com.br Telefone: (31) 92991595

3. Anna Carolina Dias Munaier Lages-
carollages@hotmail.com Telefone: (31)99050451

Comitê de Ética em Pesquisa:

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Av. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2º andar – Campus Pampulha – Belo Horizonte – (0xx31) 3409-4592).

Objetivos e justificativa:

O seu/sua filho/a está sendo convidado/a a participar de um estudo para avaliar se o osso dele/a está em boas condições, se há mais algum tratamento a fazer para melhorá-lo.

A distrofia muscular de Duchenne é uma doença grave e caracteriza-se por fraqueza muscular progressiva que se torna evidente por volta dos cinco anos de idade. A perda da capacidade de andar ocorre em torno de doze anos de idade e a respiração é acometida, assim como o coração. A doença ainda não possui cura. O tratamento é feito para reduzir as incapacidades, prevenir complicações, prolongar a capacidade de andar e melhorar a qualidade de vida. Os corticoides são utilizados para atrasar a perda da força muscular e a perda da capacidade respiratória. Nessa doença os ossos sofrem um processo de enfraquecimento progressivo podendo causar fraturas. Este estudo tem como finalidade estudar como estão os ossos dos pacientes e verificar se há algum outro tratamento que poderia ser feito para melhorar a qualidade destes ossos.

Procedimentos:

Para este estudo o seu/sua filho/a será submetido a um exame de sangue, um exame de urina que será colhida durante 24 horas em casa, e um exame dos ossos que se chama densitometria óssea para ver se a qualidade do osso de seu/sua filho/a é boa e se não riscos de fraturas.

O sangue será colhido no mesmo momento que seu/sua filho/a faz exames periódicos para consultas com a Neurologia Pediátrica. A urina será colhida em casa. A densitometria óssea será feita pelo SUS. A densitometria é feita com um aparelho semelhante ao de radiografias e não será injetado nenhum material em seu/sua filho/a.

Questões:

Nós, pesquisadores responsáveis pelo estudo, explicaremos claramente todos os procedimentos e buscaremos esclarecer todas as suas dúvidas. Caso você apresente qualquer questão a respeito do estudo ou se algo acontecer neste intervalo, você poderá sempre entrar em contato conosco, nos telefones acima citados. Para dúvidas sobre a ética da pesquisa você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais.

Caráter Confidencial:

Todos os registros identificando seu/sua filho/a serão mantidos de modo confidencial e a identidade dele/a será conhecida apenas pelos responsáveis pelo projeto.

Ao assinar este formulário, você autoriza o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e outras autoridades regulamentadoras a consultar seus registros a fim de checar os dados coletados neste projeto com o que está escrito nos registros. A identidade seu/sua filho/a não será revelada e as leis regulando tais procedimentos serão seguidas. Este estudo seguirá as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos

– Resolução nº 196/96 e 215/97 do Conselho Nacional de Saúde.

Benefícios:

A saúde do osso é um fator importante na evolução de pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne. Muitos pacientes necessitam de grandes cirurgias ortopédicas, principalmente na coluna, na tentativa de manter o paciente com o corpo reto; usam doses de corticóides durante muito tempo e isto prejudica o osso, e ainda, evoluem com poucos movimentos devido à progressão da doença, o que também prejudica os ossos.

Este estudo pretende avaliar se o osso desses pacientes está em boas condições, e se há mais algum tratamento a fazer para melhorá-lo.

Alternativas – Direito à Recusa:

Você poderá retirar seu filho/a do estudo no momento que desejar e o tratamento médico de seu filho/a serão realizados independentemente da participação dele/a neste estudo. NÃO haverá qualquer custo ou qualquer tipo de pagamento ou compensação para seu/sua filho/a pela participação no estudo.

Riscos:

Os riscos do estudo estão relacionados ao desconforto durante a coleta de sangue e urina. Há possibilidade de sangramentos pequenos e dor no local da coleta. Entretanto, a coleta de sangue será realizada por pessoas treinadas e usando materiais esterilizados e descartáveis. Além disso, pode haver o desconforto causado durante a entrevista e durante a coleta de urina de 24 horas. O exame do osso é feito com um aparelho semelhante ao de radiografias e não será injetado nenhum material.

Consentimento:

Eu li e entendi o texto acima e da forma como foi descrita pelos pesquisadores. Eu recebi uma cópia deste termo de consentimento, tive chance de lê-lo e minhas dúvidas foram esclarecidas. Com a minha assinatura, concordo em participar do estudo descrito acima.

Assinatura do voluntário ou representante legal

Data:

Eu, por este meio, confirmo que o voluntário deu seu livre consentimento em participar do estudo.

Assinatura do pesquisador

Data:

Eu, por meio deste, confirmo que testemunhei o voluntário recebendo estas informações e dando livremente seu consentimento em participar do estudo.

Assinatura da testemunha, se necessário

Data:

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (pacientes de sete a doze anos)

Título: “Avaliação dos marcadores do metabolismo mineral ósseo em pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne”

Investigadores:

4. Juliana Gurgel Gianetti -
gurgelju@yahoo.com.br Telefone: (31)
99548040

5. Maria Goretti Moreira Guimarães Penido -
mariagorettipenido@yahoo.com.br Telefone: (31) 92991595

6. Anna Carolina Dias Munaier Lages-
carollages@hotmail.com Telefone: (31) 99050451

Comitê de Ética em Pesquisa:

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Av. Antônio Carlos, 6627 –Unidade Adm. II– 2º andar– Campus Pampulha– Belo Horizonte– (0xx31) 3409-4592).

Objetivos e justificativa:

O seu/sua filho/a está sendo convidado/a a participar de um estudo para avaliar se o osso dele/a está em boas condições, se há mais algum tratamento a fazer para melhorá-lo.

A distrofia muscular de Duchenne é uma doença grave e caracteriza-se por fraqueza muscular progressiva que se torna evidente por volta dos cinco anos de idade. A perda da capacidade de andar ocorre em torno de doze anos de idade e a respiração é acometida, assim como o coração. A doença ainda não possui cura. O tratamento é feito para reduzir as incapacidades, prevenir complicações, prolongar a capacidade de andar e melhorar a qualidade de vida. Os corticoides são utilizados para atrasar a perda da força muscular e a perda da capacidade respiratória. Nessa doença os ossos sofrem um processo de enfraquecimento progressivo podendo causar fraturas. Este estudo tem como finalidade estudar como estão os ossos dos pacientes e verificar se há algum outro tratamento que poderia ser feito para melhorar a qualidade destes ossos.

Procedimentos:

Para este estudo o seu/sua filho/a será submetido a um exame de sangue, um exame de urina que será colhida durante 24 horas em casa, e um exame dos ossos que se chama

densitometria óssea para ver se a qualidade do osso de seu/sua filho/a é boa e se não riscos de fraturas.

O sangue será colhido no mesmo momento que seu/sua filho/a faz exames periódicos para consultas com a Neurologia Pediátrica. A urina será colhida em casa. A densitometria óssea será feita pelo SUS. A densitometria é feita com um aparelho semelhante ao de radiografias e não será injetado nenhum material em seu/sua filho/a.

Questões:

Nós, pesquisadores responsáveis pelo estudo, explicaremos claramente todos os procedimentos e buscaremos esclarecer todas as suas dúvidas. Caso você apresente qualquer questão a respeito do estudo ou se algo acontecer neste intervalo, você poderá sempre entrar em contato conosco, nos telefones acima citados. Para dúvidas sobre a ética da pesquisa você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais.

Caráter Confidencial:

Todos os registros identificando seu/sua filho/a serão mantidos de modo confidencial e a identidade dele/a será conhecida apenas pelos responsáveis pelo projeto.

Ao assinar este formulário, você autoriza o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e outras autoridades regulamentadoras a consultar seus registros a fim de checar os dados coletados neste projeto com o que está escrito nos registros. A identidade seu/sua filho/a não será revelada e as leis regulando tais procedimentos serão seguidas. Este estudo seguirá as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos

– Resolução nº 196/96 e 215/97 do Conselho Nacional de Saúde.

Benefícios:

A saúde do osso é um fator importante na evolução de pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne. Muitos pacientes necessitam de grandes cirurgias ortopédicas, principalmente na coluna, na tentativa de manter o paciente com o corpo reto; usam doses de corticóides durante muito tempo e isto prejudica o osso, e ainda, evoluem com poucos movimentos devido à progressão da doença, o que também prejudica os ossos. Este estudo pretende avaliar se o osso desses pacientes está em boas condições, e se há mais algum tratamento a fazer para melhorá-lo.

Alternativas – Direito à Recusa:

Você poderá retirar seu filho/a do estudo no momento que desejar e o tratamento médico de seu filho/a serão realizados independentemente da participação dele/a neste estudo. NÃO haverá qualquer custo ou qualquer tipo de pagamento ou compensação para seu/sua filho/a pela participação no estudo.

Riscos:

Os riscos do estudo estão relacionados ao desconforto durante a coleta de sangue e urina. Há possibilidade de sangramentos pequenos e dor no local da coleta. Entretanto, a coleta de sangue será realizada por pessoas treinadas e usando materiais esterilizados e descartáveis. Além disso, pode haver o desconforto causado durante a entrevista e durante a coleta de urina de 24 horas. O exame do osso é feito com um aparelho semelhante ao de radiografias e não será injetado nenhum material.

Consentimento:

Eu li e entendi o texto acima e da forma como foi descrita pelos pesquisadores. Eu recebi uma cópia deste termo de consentimento, tive chance de lê-lo e minhas dúvidas foram esclarecidas. Com a minha assinatura, concordo em participar do estudo descrito acima.

 Assinatura do representante legal

Data:

 Assinatura da criança

Data:

Eu, por este meio, confirmo que o voluntário deu seu livre consentimento em participar do estudo.

 Assinatura do pesquisador

Data:

Eu, por meio deste, confirmo que testemunhei o voluntário recebendo estas informações e dando livremente seu consentimento em participar do estudo.

 Assinatura da testemunha, se necessário

Data:

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (responsáveis pelos pacientes de treze a dezessete anos)

Título: “Avaliação dos marcadores do metabolismo mineral ósseo em pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne”

Investigadores:

7. Juliana Gurgel Gianetti -
gurgelju@yahoo.com.br Telefone: (31)
99548040

8. Maria Goretti Moreira Guimarães Penido -
mariagorettipenido@yahoo.com.br Telefone: (31) 92991595

9. Anna Carolina Dias Munaier Lages-
carollages@hotmail.com Telefone: (31) 99050451

Comitê de Ética em Pesquisa:

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Av. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2º andar – Campus Pampulha – Belo Horizonte – (0xx31) 3409-4592).

Objetivos e justificativa:

O seu/sua filho/a está sendo convidado/a a participar de um estudo para avaliar se o osso dele/a está em boas condições, se há mais algum tratamento a fazer para melhorá-lo.

A distrofia muscular de Duchenne é uma doença grave e caracteriza-se por fraqueza muscular progressiva que se torna evidente por volta dos cinco anos de idade. A perda da capacidade de andar ocorre em torno de doze anos de idade e a respiração é acometida, assim como o coração. A doença ainda não possui cura. O tratamento é feito para reduzir as incapacidades, prevenir complicações, prolongar a capacidade de andar e melhorar a qualidade de vida. Os corticoides são utilizados para atrasar a perda da força muscular e a perda da capacidade respiratória. Nessa doença os ossos sofrem um processo de enfraquecimento progressivo podendo causar fraturas. Este estudo tem como finalidade estudar como estão os ossos dos pacientes e verificar se há algum outro tratamento que poderia ser feito para melhorar a qualidade destes ossos.

Procedimentos:

Para este estudo o seu/sua filho/a será submetido a um exame de sangue, um exame de urina que será colhida durante 24 horas em casa, e um exame dos ossos que se chama densitometria óssea para ver se a qualidade do osso de seu/sua filho/a é boa e se não riscos de fraturas.

O sangue será colhido no mesmo momento que seu/sua filho/a faz exames periódicos para consultas com a Neurologia Pediátrica. A urina será colhida em casa. A densitometria óssea será feita pelo SUS. A densitometria é feita com um aparelho semelhante ao de radiografias e não será injetado nenhum material em seu/sua filho/a.

Questões:

Nós, pesquisadores responsáveis pelo estudo, explicaremos claramente todos os procedimentos e buscaremos esclarecer todas as suas dúvidas. Caso você apresente qualquer questão a respeito do estudo ou se algo acontecer neste intervalo, você poderá sempre entrar em contato conosco, nos telefones acima citados. Para dúvidas sobre a ética da pesquisa você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais.

Caráter Confidencial:

Todos os registros identificando seu/sua filho/a serão mantidos de modo confidencial e a identidade dele/a será conhecida apenas pelos responsáveis pelo projeto.

Ao assinar este formulário, você autoriza o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e outras autoridades regulamentadoras a consultar seus registros a fim de checar os dados coletados neste projeto com o que está escrito nos registros. A identidade seu/sua filho/a não será revelada e as leis regulando tais procedimentos serão seguidas. Este estudo seguirá as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos

– Resolução nº 196/96 e 215/97 do Conselho Nacional de Saúde.

Benefícios:

A saúde do osso é um fator importante na evolução de pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne. Muitos pacientes necessitam de grandes cirurgias ortopédicas, principalmente na coluna, na tentativa de manter o paciente com o corpo reto; usam doses de corticóides durante muito tempo e isto prejudica o osso, e ainda, evoluem com poucos movimentos devido à progressão da doença, o que também prejudica os ossos.

Este estudo pretende avaliar se o osso desses pacientes está em boas condições, e se há mais algum tratamento a fazer para melhorá-lo.

Alternativas – Direito à Recusa:

Você poderá retirar seu filho/a do estudo no momento que desejar e o tratamento médico de seu filho/a serão realizados independentemente da participação dele/a neste estudo. NÃO haverá qualquer custo ou qualquer tipo de pagamento ou compensação para seu/sua filho/a pela participação no estudo.

Riscos:

Os riscos do estudo estão relacionados ao desconforto durante a coleta de sangue e urina. Há possibilidade de sangramentos pequenos e dor no local da coleta. Entretanto, a coleta de sangue será realizada por pessoas treinadas e usando materiais esterilizados e descartáveis. Além disso, pode haver o desconforto causado durante a entrevista e durante a coleta de urina de 24 horas. O exame do osso é feito com um aparelho semelhante ao de radiografias e não será injetado nenhum material.

Consentimento:

Eu li e entendi o texto acima e da forma como foi descrita pelos pesquisadores. Eu recebi uma cópia deste termo de consentimento, tive chance de lê-lo e minhas dúvidas foram esclarecidas. Com a minha assinatura, concordo em participar do estudo descrito acima.

Assinatura do representante legal

Data:

Eu, por este meio, confirmo que o voluntário deu seu livre consentimento em participar do estudo.

Assinatura do pesquisador

Data:

Eu, por meio deste, confirmo que testemunhei o voluntário recebendo estas informações e dando livremente seu consentimento em participar do estudo.

Assinatura da testemunha, se necessário

Data:

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (pacientes de treze a dezessete anos)

Título: “Avaliação dos marcadores do metabolismo mineral ósseo em pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne”

Investigadores:

10. Juliana Gurgel Gianetti -
gurgelju@yahoo.com.br Telefone: (31) 99548040

11. Maria Goretti Moreira Guimarães Penido -
mariagorettipenido@yahoo.com.br Telefone: (31) 92991595

12. Anna Carolina Dias Munaier Lages-
carollages@hotmail.com Telefone: (31)99050451

Comitê de Ética em Pesquisa:

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Av. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2º andar – Campus Pampulha – Belo Horizonte – (0xx31) 3409-4592).

Objetivos e justificativa:

Você está sendo convidado/a a participar de um estudo para avaliar se seu osso está em boas condições, se há mais algum tratamento a fazer para melhorá-lo.

A distrofia muscular de Duchenne é uma doença grave e caracteriza-se por fraqueza muscular progressiva que se torna evidente por volta dos cinco anos de idade. A perda da capacidade de andar ocorre em torno de doze anos de idade e a respiração é acometida, assim como o coração. A doença ainda não possui cura. O tratamento é feito para reduzir as incapacidades, prevenir complicações, prolongar a capacidade de andar e melhorar a qualidade de vida. Os corticoides são utilizados para atrasar a perda da força muscular e a perda da capacidade respiratória. Nessa doença os ossos sofrem um processo de enfraquecimento progressivo podendo causar fraturas. Este estudo tem como finalidade estudar como estão os ossos dos pacientes e verificar se há algum outro tratamento que poderia ser feito para melhorar a qualidade destes ossos.

Procedimentos:

Para este estudo você será submetido a um exame de sangue, um exame de urina que será colhida durante 24 horas em casa, e um exame dos ossos que se chama densitometria óssea para ver se a qualidade do seu osso é boa e se não há riscos de fraturas.

O sangue será colhido no mesmo momento que você faz exames periódicos para consultas com a Neurologia Pediátrica. A urina será colhida em casa. A densitometria óssea será feita pelo SUS. A densitometria é feita com um aparelho semelhante ao de radiografias e não será injetado nenhum material em você.

Questões:

Nós, pesquisadores responsáveis pelo estudo, explicaremos claramente todos os procedimentos e buscaremos esclarecer todas as suas dúvidas. Caso você apresente qualquer questão a respeito do estudo ou se algo acontecer neste intervalo, você poderá sempre entrar em contato conosco, nos telefones acima citados. Para dúvidas sobre a ética da pesquisa você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais.

Caráter Confidencial:

Todos os registros identificando você serão mantidos de modo confidencial e sua identidade será conhecida apenas pelos responsáveis pelo projeto.

Ao assinar este formulário, você autoriza o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e outras autoridades regulamentadoras a consultar seus registros a fim de checar os dados coletados neste projeto com o que está escrito nos registros. A sua identidade não será revelada e as leis regulando tais procedimentos serão seguidas. Este estudo seguirá as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos – Resolução nº 196/96 e 215/97 do Conselho Nacional de Saúde.

Benefícios:

A saúde do osso é um fator importante na evolução de pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne. Muitos pacientes necessitam de grandes cirurgias ortopédicas, principalmente na coluna, na tentativa de manter o paciente com o corpo reto; usam doses de corticóides durante muito tempo e isto prejudica o osso; e ainda, evoluem com poucos movimentos devido à progressão da doença, o que também prejudica os ossos.

Este estudo pretende avaliar se o osso desses pacientes está em boas condições, e se há mais algum tratamento a fazer para melhorá-lo.

Alternativas – Direito à Recusa:

Você poderá sair do estudo no momento que desejar e o seu tratamento médico será realizado independentemente da sua participação neste estudo. NÃO haverá qualquer custo ou qualquer tipo de pagamento ou compensação para você pela participação no estudo.

Riscos:

Os riscos do estudo estão relacionados ao desconforto durante a coleta de sangue e urina. Há possibilidade de sangramentos pequenos e dor no local da coleta. Entretanto, a coleta de sangue será realizada por pessoas treinadas e usando materiais esterilizados e descartáveis. Além disso, pode haver o desconforto causado durante a entrevista e durante a coleta de urina de 24 horas. O exame do osso é feito com um aparelho semelhante ao de radiografias e não será injetado nenhum material.

Consentimento:

Eu li e entendi o texto acima e da forma como foi descrita pelos pesquisadores. Eu recebi uma cópia deste termo de consentimento, tive chance de lê-lo e minhas dúvidas foram esclarecidas. Com a minha assinatura, concordo em participar do estudo descrito acima.

Assinatura do adolescente

Data:

Eu, por este meio, confirmo que o voluntário deu seu livre consentimento em participar do estudo.

Assinatura do pesquisador

Data:

Eu, por meio deste, confirmo que testemunhei o voluntário recebendo estas informações e dando livremente seu consentimento em participar do estudo.

Assinatura da testemunha, se necessário

Data:

ANEXO 6.3: LISTA DE ILUSTRAÇÕES ARTIGO 1:

Quadro 1 – Resumo dos achados na literatura sobre DMO em pacientes com DMD

Autor - ano	Tratamento GC	Nº pacientes	Achados DMO	Fraturas
Palmieri et al 1996 ⁷⁸	Não relatado	19	DMO reduzida (escore Z -1,0) Houve correlação negativa entre idade e escore Z da DMO: baixo desenvolvimento da massa óssea.	Não relatado.
Larson et al 2000 ⁷⁹	Não	40/36 com DXA.	Não cadeirantes: média do escore Z -0,8; Cadeirantes: média do escore Z 1,7 com piora progressiva até -3,9.	18 (44%)
Aparicio et al 2002 ⁸⁰	Não	10 não cadeirantes.	De acordo com escore Z colo do fêmur: 8 com osteoporose, 2 com redução da DMO. Na coluna 5/10 com redução da DMO.	Não relatado.
Louis et al 2003 ⁸¹	Não relatado	12 DMD e 3 Becker	DMO aumentou 3% em 5 ainda não cadeirantes.	Não relatado.
Bianchi et al 2003 ⁷⁷	22 - Dose crônica de 0,75 mg/kg/dia 38,5±6,8 meses	32	DMO (escore Z) é menor que o normal para a idade em todos os pacientes, mesmo no grupo tratado com esteroides.	6 pacientes (18%) tinham história de fraturas antes o estudo. Depois do estudo não houve fraturas.
Douvillez et al 2005 ⁸²	Não relatado.	22(idade 11,4±4,0 anos).	O CMO era menor e diminuiu antes da perda da deambulação e estava correlacionado com a fraqueza muscular.	A prevalência de fraturas foi alta .
Hawker et al 2005 ⁶⁰	Deflazacort dose inicial 0,9 mg/kg/dia até 6 a 7 anos.	42:11/16 com Alendronato (pré-puberai).	23/43 (antes do tratamento com alendronato) tinham DMO reduzida (escore Z < -1,0) na coluna e corpo total. Após 2 anos o escore Z não havia modificado para 16 pacientes. Média da idade óssea: 9,2 anos (5,5 – 14,5).	2 fraturas antes do tratamento com alendronato. Nenhuma fratura após o tratamento foi relatada.
Söderpalm et al 2007 ⁵⁶	16-prednisolon 0,22 a 0,35 mg/kg/dia 4 pacientes pararam o tratamento porque ganharam muito peso, mas usaram dose de 281 mg/kg	24 DMD (2,3–19,7 anos) 11 controles sadios pareados pela idade.	Reduzida DMO em todos os sítios avaliados no grupo de pacientes com DMD. A diferença entre o grupo DMD e os controles aumentaram com a idade. DMO da coluna vertebral nos pacientes com DMD era -2,5±1,9 e fora da coluna era -0,1±1,1. Marcadores de formação e reabsorção óssea mostraram reduzido remodelamento ósseo nos pacientes.	6 de 24 (25%) pacientes tiveram fraturas e todas ocorreram antes da inclusão no estudo.

Bianchi et al 2011 ⁵²	Prednisona: 1,25 mg/kg cada 2 dias.	33	Escore Z do CMO e da DMO diminuiram progressivamente na coluna lombar, com o tratamento; mas tiveram aumento estatisticamente significativo. Após 2 anos de tratamento o CMO da coluna lombar aumentou em relação ao pré- tratamento ($p < 0,01$) em 22 pacientes. 8 não tiveram aumento significativo e 3 continuaram piorando.	Durante o período de observação houve 4 fraturas em 4 pacientes enquanto durante o período de tratamento (2 anos) houve 2 fraturas em 2 pacientes.
Crabtree et al 2010 ⁸⁴	Prednisolona regime intermitente 10 dias com e 10 dias sem. Dose: 0,75 mg/kg/dia.	25	A área óssea craniana para altura e o CMO subcraniano para a área estavam significativamente reduzidos. Após 30 meses de terapia com esteroides houve aumento significativo da área óssea craniana para altura mas significante redução do CMO subcraniano para a área. Na coluna lombar não houve mudanças significativas.	Antes do tratamento com esteroides 6 crianças com história de fraturas. Um paciente perdeu a deambulação durante o segundo ano de tratamento e 2 meninos tiveram fraturas (dedo e fêmur).
Rufo et al 2011 ⁵⁷	Não	16 DMD e 11 Controles sadios pareados.	Em 6 pacientes (37%) o escore-Z da BMD era menor que -1,0; em 3 era entre -1,1 e -2,0; e nos outros 3 era abaixo de -2,0. A DMO foi ajustada para o volume da vértebra e calculada a DMO volumétrica. O escore-Z foi calculado baseado em controles pareados e sadios italianos.	Não relatado.
Mayo et al 2012 ⁴⁷	Deflazacorte com terapia em longo prazo (0,9 mg / kg / dia)	39	Antes da terapia com deflazacorte o escore-Z da CL corrigido para a idade e o corrigido para a altura foram reduzidos. Após a terapia com deflazacorte não houveram alterações significativas no escore-Z ajustado para a altura e houve uma mudança significativa ($p < 0,05$) no escore- Z corrigido para a idade.	9 fraturas de ossos longos ocorreram em 8 não cadeirantes. 7 fraturas vertebrais ocorreram em 6 cadeirantes após 5 anos de deflazacorte. O deflazacorte não aumentou o risco de fraturas em ossos longos.
Söderpalm et al 2012 ⁸⁵	13 paciente Com prednisona	30 (18 com DMD e 6 Becker); 6 excluídos	Os valores da CMO e DMO foram significativamente menores no grupo com DMD >10 anos em comparação com os pacientes com Becker com a mesma idade. No grupo com DMD >10 anos houve redução significativa da DMO CT e CL.	7 dos 18 pacientes com DMD (um deles com relato de fratura vertebral) e 4 dos 6 com Becker

King et al 2014 ⁸⁶	12 pacientes com história de uso. Esquema e tipo de corticoide não foram relatados.	22	Pacientes com DMD têm menores escores-Z DMO para a idade do que indivíduos saudáveis para todas as regiões, exceto para a cabeça. Pacientes que usaram GC apresentaram menor DMO para idade, menor DMO para estatura para a idade, e menor CMO areal do que aqueles que não usaram.	Não relatado.
Vuillerot et al 2014 ⁸⁷	21 tratados (20 c/ prednisona 0,75mg/kg/dia e 1 c/ 1mg/kg de 48/48h); e 8 não tratados.	29	Observaram aumento significativo da massa magra em pacientes com DMD tratados com GC (p <0,0001). Os não tratados apresentaram deterioração na composição corporal confirmada por um aumento significativo na percentagem de gordura corporal.	Não relatado.
Houston et al 2014 ⁸⁸	29 (todos tratados com GC, alguns c/ deflazacort e outros c/prednisona)	39	O escore-Z foi significativamente menor no quadril do que na CL (p<0,0001). Não houve diferença nos escores-Z no quadril total entre os pacientes que receberam e não receberam GC, no entanto, os pacientes tratados com GC tiveram escore-Z da DMO CL menor do que os não tratados (p <0,001). Com o uso do alendronato os escores-Z DMO CL tenderam ao aumento	Não relatado.
Tian et al 2014 ⁸⁹	Uso relatado, porém não especificado em quantos dos pacientes nem esquema ou tipo de corticoide utilizados.	408	A prevalência da osteoporose foi semelhante: 4,4%, 20,9% e 58,3% em idades de 5, 10 e 18 anos, respectivamente. Foram observados baixos escores-Z de DMO e CMO, que aumentaram com a idade e variaram com o local de medição.	A prevalência de fraturas totais foi de 16,5%, 37,4% e 83,3% em idades 5, 10 e 18 anos, e de fraturas vertebrais foi de 4,4%, 19,1% e 58,3% nas mesmas idades.

Modificada de Morgenroth et al¹⁰

Quadro 2 - Principais marcadores de formação e reabsorção óssea

Marcadores de formação	Origem	Ação
<i>Sangue</i>		
Fosfatase alcalina óssea	Enzimas na membrana plasmática de osteoblastos	Degradação do inibidor da mineralização do pirofosfato alcalino
Osteocalcina	Proteínas não-colágenas de ossos produzidas pelos osteoblastos durante a formação óssea e conectados a hidroxiapatita	Influências na mineralização do osteoide. Funciona com feedback negativo durante o processo de remodelação óssea

Propeptídeo aminoterminal do colágeno tipo I (PINP)	Produto específico da proliferação de osteoblastos e fibroblastos	Clivagem da protease pró colágeno de tipo 1, durante o processo de formação do colágeno tipo 1
Marcadores de reabsorção	Origem	Ação
<i>Sangue</i>		
Ligante do ativador do receptor do Kappa-B (RANKL)	Produzido por osteoblastos, ativado por células B e T	Se liga ao RANK, que é expresso em osteoclastos e seus precursores, estimulando a sua diferenciação e ativação
Osteoprotegerina	Secretada pelos osteoblastos	Receptor RANKL, reduz a reabsorção óssea através da ligação a ao RANKL e previne a osteoclastogênese
Osteopontina	Proteína não colágena da matriz da matriz óssea orgânica	Ação inibitória sobre a mineralização óssea e estimulatória sobre a reabsorção óssea
Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF23)	Produzido principalmente pelos osteócitos	Hormônio fostatúrico e parece ter ações inibitórias diretas sobre a mineralização óssea
Esclerotina	Secretada principalmente pelos osteócitos	Antagonista de sinalização Wnt, inibe a formação de osso
<i>Sangue e urina</i>		
C-telopeptídeo (CTX)	Isomerização de beta aspartil que ocorre no colágeno maduro	Clivagem do colágeno tipo 1 pela Catepsina K na reabsorção óssea
N-telopeptídeo (porção Amino-terminal do Colágeno tipo 1)	Colágeno tipo 1 do osso	Clivagem do colágeno tipo 1 pela Catepsina K na reabsorção óssea

Modificado de Bandeira et al¹⁰.

ANEXO 6.4: LISTA DE ILUSTRAÇÕES ARTIGO 2

6.4.1: LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Valores de referência dos parâmetros laboratoriais séricos avaliados de acordo com a faixa etária estudada

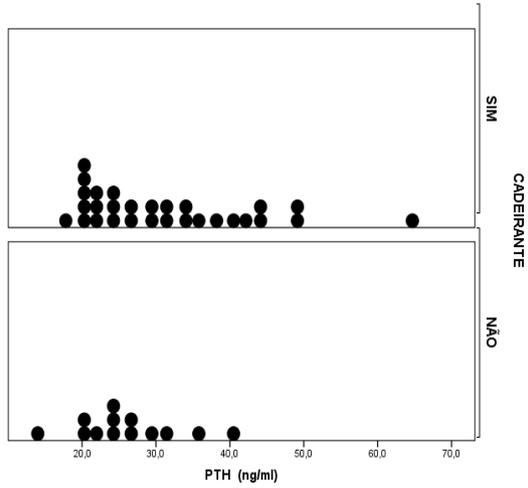
Parâmetros	Valores de Referência
Cálcio total	8,4 a 10,2 mg/dl
Fósforo	3,3 a 5,4 mg/dl
Ureia	19 a 43 mg/dl
Creatinina	0,66 a 1,25mg/dl
Fosfatase alcalina total	38 a 126 U/l
25OH vitamina D	Deficiência: abaixo de 10 ng/ml, Insuficiência: 10 a 30 ng/ml; Suficiência: 30 a 100 ng/ml, Toxicidade: maior que 100 ng/ml
PTH	16 a 65 pg/ml

Quadro 2 - Valores de referência dos parâmetros laboratoriais urinários avaliados de acordo com a faixa etária estudada

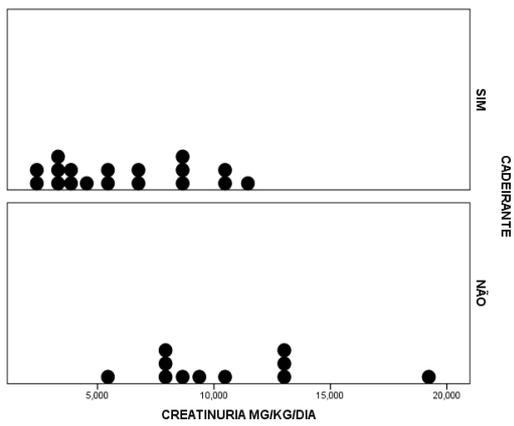
Parâmetros	Valores de Referência
Cálcio Urina 24 horas	4 mg/Kg
Fósforo Urina 24 horas	400 – 1300 mg
Creatinina Urina 24 horas	2 a 3 anos = 6 a 22 mg/Kg > 3 anos = 12 a 30 mg/Kg
Citrato Urina 24 horas	320 a 1240 mg

6.4.2 LISTA DE GRÁFICOS

(A)



(B)



(C)

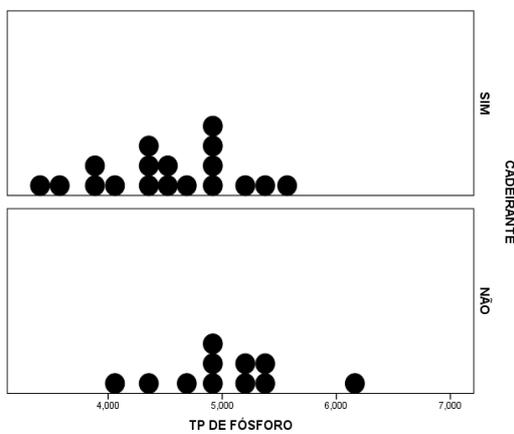


Gráfico 1 - Comparação entre os parâmetros bioquímicos séricos e urinários [PTH (A), creatinúria mg/Kg/dia (B) e TP de fósforo (C)] dos grupos DMD e C

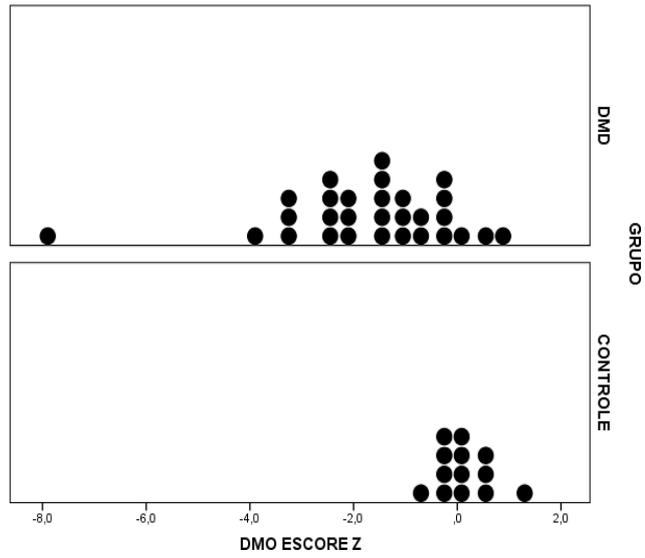


Gráfico 2 - Comparação dos valores do escore-Z da DMOa da coluna lombar medidos pela DXA entre os grupos DMD e C.

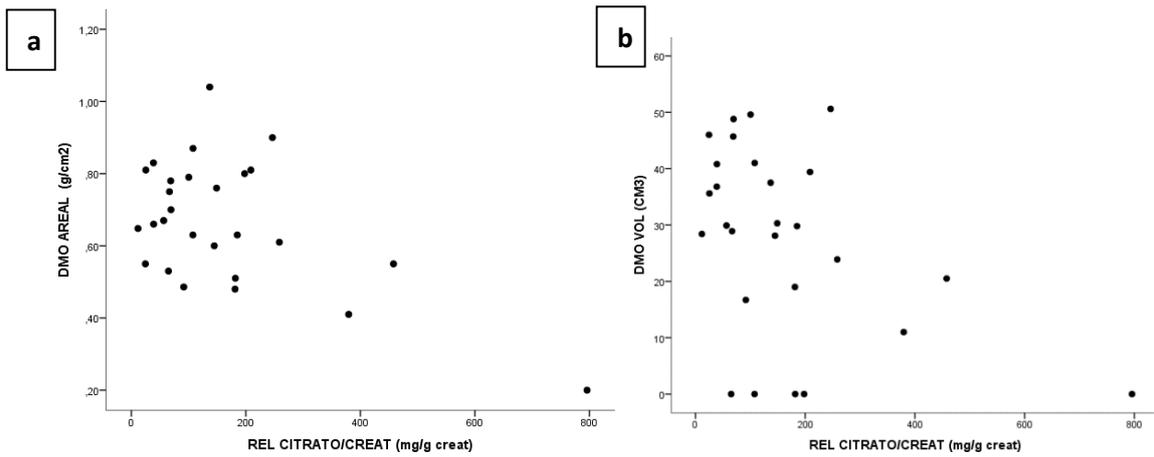


Gráfico 3 - (a) Correlação entre os valores de DMOa CL medidos pela DXA e a citratúria mg/g creatinina. (b) Correlação entre os valores absolutos de DMOv CL medidos pela DXA e a citratúria mg/g creatinina.

ANEXO 6.5: LISTA DE TABELAS ARTIGO 2:

Tabela 1 - Parâmetros antropométricos entre o grupo de pacientes (DMD) e o grupo controle (C)

<i>Variáveis</i>	<i>DMD</i> <i>n=29</i>	<i>C</i> <i>n=13</i>	<i>p</i>
Idade*	12,4±2,9	10,6±4,0	0,107 (1)
Peso**	43,6 (29,5-49,5)	28,5 (20,3-45,3)	0,117 (2)
Altura*	145,9±13,9	138,6±23,3	0,307 (1)
IMC**	18,9 (15,1-21,2)	15,7 (15,1-18,7)	0,105 (2)
Escore-Z IMC*	-0,30±2,05	-0,30±1,02	0,997 (1)

DMD: Distrofia Muscular de Duchenne; IMC: Índice de Massa Corporal. *Valores expressos em média e desvio-padrão; (1) Teste T; **Valores expressos em mediana e intervalo inter-quartil Q1 e Q3; (2) Teste de Mann Whitney.

Tabela 2 - Características clínicas do grupo DMD

<i>Variáveis</i>	<i>DMD</i> <i>n=29</i>
Idade do diagnóstico (anos)*	6,4±1,8
Tipo de diagnóstico**	
DNA	22 (75,9)
Biópsia	7 (24,1)
Cadeirante**	
Sim	18 (62,07)
Não	11 (37,93)
História de fratura**	
Sim	8 (27,6)
Não	21 (72,4)
História de escoliose**	
Sim	14 (48,3)
Não	15 (51,7)
Uso de corticóide**	
Sim	20 (69,0)
Não	9 (31,0)
Tipo de corticóide em uso**	
Deflazacorte (Pausado)	3 (15)
Prednisona	17 (85)
Tempo de uso de corticoide (meses)*	44,5 (24,0-81,0)
Uso de vitamina D**	
Sim	12 (41,4)
Não	17 (58,6)
Tempo de uso de vitamina D (meses)*	10,2±7,9

Cirurgia ortopédica para correção de escoliose em 10,3% dos pacientes.

*Valores expressos em média e desvio-padrão; **Valores expressos em número e porcentagem.

Tabela 3 - Comparação dos parâmetros antropométricos e das características clínicas entre os subgrupos DMD1 e DMD2

<i>Variáveis</i>	<i>DMD1 n=18</i>	<i>DMD2 n=11</i>	<i>p</i>
Idade (anos)*	13,0 (12,0;15,3)	10,0 (9,0;11,0)	0,002 (1)
Peso (Kg)**	46,6±13,2	32,6±9,1	0,005 (2)
Altura (cm)**	152,8±12,3	134,6±7,8	<0,0001 (2)
IMC**	19,8±5,3	17,8±3,8	0,286 (2)
Escore-Z IMC**	-0,45±2,22	-0,05±1,79	0,619 (2)
Idade do diagnóstico (anos)*	6,0 (6,0;7,0)	6,0 (4,5;7,0)	0,406 (1)
Tipo de diagnóstico***			
DNA	13 (72,2)	9 (81,8)	0,667 (3)
Biópsia	5 (27,8)	2 (18,2)	
História de fratura***			
Sim	7(38,9)	1(9,1)	0,110(3)
Não	11(61,1)	10,90,9)	
História de escoliose [#]			
Sim	12 (66,7)	2(18,2)	0,011 (4)
Não	6 (33,3)	9 (81,8)	
Uso de medicações***			
Sim	16 (88,9)	9 (81,2)	1,000 (3)
Não	2 (11,1)	2 (18,2)	
Uso de corticoíde [#]			
Sim	11 (61,1)	9 (81,8)	0,273 (4)
Não	7 (38,9)	2 (18,2)	
Tipo de corticoíde em uso***			
Deflazacorte	1 (5,6)	2 (18,2)	0,422 (3)
Prednisona	10 (55,6)	7 (63,6)	
Não usa	7 (38,9)	2 (18,2)	
Tempo de uso de corticoide (meses)*	48,0 (36,0-84,0)	24,0(21,0-70,5)	0,321 (1)
Uso de vitamina D***			
Sim	9 (50,0)	3 (27,3)	0,273 (3)
Não	9(50,0)	8 (72,7)	
Tempo de uso de vitamina D (meses)	6,0 (3,0-12,0)	12,0 (12,0-18,0)	0,123 (1)

DMD: Distrofia Muscular de Duchenne. *Valores expressos em mediana e intervalo inter-quartil Q1 e Q3; (1) Teste de Mann Whitney; **Valores expressos em média e desvio-padrão; (2) Teste T; ***Valores expressos em número e porcentagem; (3) Teste Qui-Quadrado Exato; [#] Valores expressos em número e porcentagem; (4) Teste Qui-Quadrado de Pearson Assintótico.

Tabela 4 - Comparação dos parâmetros antropométricos e das características clínicas entre os subgrupos DMD3 e DMD4

<i>Variáveis</i>	<i>DMD3 n=20</i>	<i>DMD4 n=9</i>	<i>p</i>
Idade (anos)*	11,9±2,3	13,6±3,8	0,256 (1)

Peso (Kg)*	40,1±19,8	44,0±10,5	0,477 (1)
Altura (cm)*	141,7±12,5	155,4±12,6	0,011 (1)
IMC*	19,5±5,4	18,0±3,1	0,457 (1)
Escore-Z IMC*	0,01±2,05	-0,98±1,97	0,235 (1)
Idade do diagnóstico (anos)*	6,4 ±1,7	6,4±2,1	0,952 (1)
Tipo de diagnóstico**			
DNA	16 (80,0)	6 (66,7)	0,642 (2)
Biópsia	4 (20,0)	3 (33,3)	
História de fratura** Sim			0,371 (2)
Não	7 (35,0)	1 (11,1)	
	13 (65,0)	8 (88,9)	
História de escoliose**			0,700 (2)
Sim	9 (45,0)	5 (55,6)	
Não	11 (55,0)	4 (44,4)	
Uso de vitamina D**			0,234 (2)
Sim	10 (50,0)	2 (22,2)	
Não	10 (50,0)	7 (77,8)	
Tempo de uso de vitamina D (meses)*	9,5±7,0	13,5±14,8	&

DMD: Distrofia Muscular de Duchenne. *Valores expressos em média e desvio-padrão; (1) Teste T; **Valores expressos em número e porcentagem; (2) Teste Qui-Quadrado Exato. & Não foi possível realizar o teste pois o grupo sem história de uso de corticoide que fez uso de vitamina D continha somente dois pacientes (n=2).

Tabela 5 - Comparação dos parâmetros bioquímicos séricos e da urina 24h entre os grupos DMD e C

<i>Variáveis</i>	<i>DMD n=29</i>	<i>C n=13</i>	<i>p</i>
Cálcio sérico (mg/dl)*	9,7±0,3	9,4±0,5	0,054 (1)
Fósforo sérico (mg/dl)*	5,1±0,6	4,2±0,5	<0,0001 (1)
Creatinina (mg/dl)**	0,19 (0,17-0,27)	0,50 (0,40-0,75)	<0,0001 (2)
Ureia (mg/dl)*	19,0±6,1	22,1±5,6	0,126 (1)
Fosfatase alcalina (U/l)*	108,2±31,9	243,8±70,5	<0,0001 (1)
PTH (pg/ml)**	29,0 (21,3;39,6)	25,0 (21,5;30,5)	0,308 (2)
Calciúria (mg/Kg/dia)**	1,2 (0,5-2,1)	2,6 (2,1-3,2)	0,003 (2)
Fosfatúria (mg/24h)*	452,8±162,0	349,8±178,0	0,080 (1)
TP de fósforo (mg/%)*	4,7±0,6	3,9±0,6	<0,0001 (1)
Citratúria mg/1,73m ² **	437,3 (275,1-624,4)	834,1 (687,4-979,8)	0,002 (2)
Citratúria mg/g Creatinina**	107,8 (64,9-197,9)	95,5 (72,5-139,5)	0,675 (2)
Creatinúria (mg/Kg/dia)*	7,8±3,9	18,2±5,6	<0,0001 (1)
Relação cálcio/creatinina urinária**	0,21 (0,08-0,34)	0,15 (0,11-0,19)	0,416 (2)

DMD: Distrofia Muscular de Duchenne. *Valores expressos em média e desvio-padrão; (1) Teste T; **Valores expressos em mediana e intervalo inter-quartil Q1 e Q3; (2) Teste de Mann Whitney.

Tabela 6 - Valores encontrados na análise de 25-OH vitamina D do grupo DMD

<i>Variáveis</i>	<i>DMD</i>
25-OH vitamina D (ng/ml)*	17,5±6,9
Níveis de 25-OH vitamina D**	
Deficiente (<10 ng/ml)	6 (20,7%)
Insuficiente (10-30 ng/ml)	21 (72,4%)
Suficiente (30-100 ng/ml)	2 (6,9%)
Toxicidade (>100 ng/ml)	0 (0,0%)

DMD: Distrofia Muscular de Duchenne. *Valores expressos em média e desvio-padrão;

**Valores expressos em número e porcentagem.

Tabela 7 - Comparação dos parâmetros laboratoriais séricos e da urina 24h entre os subgrupos DMD1 e DMD2

<i>Variáveis</i>	<i>DMD1 n=18</i>	<i>DMD2 n=11</i>	<i>p</i>
Cálcio sérico (mg/dl)*	9,7±0,4	9,7±0,3	0,552 (1)
Fósforo sérico (mg/dl)*	4,9±0,6	5,4±0,5	0,051 (1)
Creatinina (mg/dl)**	0,19 (0,15-0,27)	0,21 (0,19-0,28)	0,430 (2)
Ureia (mg/dl)*	18,8±4,9	19,3±8,0	0,855 (1)
Fosfatase Alcalina (U/l)*	100,9±30,5	120,2±31,8	0,116 (1)
PTH (pg/ml)*	35,2±12,6	24,9±5,0	0,005 (1)
25OH vitamina D (ng/ml)*	18,9±6,8	15,3±6,7	0,173 (1)
Calciúria (mg/Kg/dia)**	1,1 (0,4-2,0)	1,6 (0,7-2,3)	0,533 (2)
Fosfatúria (mg/24h)*	424,7±145,4	498,6±183,8	0,240 (1)
TP de fósforo (mg/%)*	4,5±0,6	5,0±0,6	0,049 (1)
Citratúria mg/1,73m ² *	463,2±289,1	642,9±510,4	0,251 (1)
Citratúria mg/g creatinina**	142,9 (67,8-200,6)	91,6 (47,6-201,6)	0,382 (2)
Creatinúria (mg/Kg/dia)*	6,1±3,0	10,5±3,9	0,002 (1)
Relação cálcio/creatinina**	0,22 (0,09-0,44)	0,16 (0,06-0,29)	0,303 (2)

DMD: Distrofia Muscular de Duchenne. *Valores expressos em média e desvio-padrão; (1) Teste T; **Valores expressos em mediana e intervalo inter-quartil Q1 e Q3; (2) Teste de Mann Whitney.

Tabela 8 - Comparação dos parâmetros bioquímicos séricos e da urina 24h entre os subgrupos com DMD3 e DMD4

<i>Variáveis</i>	<i>DMD3 n=20</i>	<i>DMD4 n=9</i>	<i>p</i>
Cálcio sérico (mg/dl)**	9,7 (9,4-10,0)	9,7 (9,6-9,9)	0,943 (2)
Fósforo sérico (mg/dl)*	5,0±0,6	5,1±0,7	0,691 (1)
Creatinina (mg/dl)*	0,21±0,08	0,25±0,13	0,344 (1)
Ureia (mg/dl)*	19,4±5,7	18,0±7,1	0,576 (1)
Fosfatase Alcalina (U/l)*	106,4±27,4	112,2±41,8	0,658 (1)
PTH (pg/ml)**	24,2 (20,6-64,4)	34,5 (29,6-49,2)	0,010 (2)
25OH vitamina D (ng/ml)*	17,8±7,4	17,0±5,7	0,791 (1)
Calciúria (mg/Kg/dia)**	1,6 (0,6-2,2)	1,0(0,3-1,9)	0,446 (2)
Fosfatúria (mg/24h)*	462,6±161,7	430,9±170,1	0,634 (1)

TP de fósforo (mg/%)*	4,7±0,6	4,7±0,7	0,853 (1)
Citratúria mg/1,73m ² **	418,5 (263,1-530,2)	520,2 (309,7-835,6)	0,382 (2)
Citratúria mg/g creatinina**	103,9 (52,1-182,5)	136,9 (67,7-352,1)	0,328 (2)
Creatinúria (mg/Kg/dia)**	8,3 (5,3-10,3)	4,5 (3,6-9,9)	0,239 (2)
Relação cálcio/creatinina*	0,22±0,15	0,29±0,28	0,379 (1)

DMD: Distrofia Muscular de Duchenne. *Valores expressos em média e desvio-padrão; (1) Teste T;

**Valores expressos em mediana e intervalo inter-quartil Q1 e Q3; (2) Teste de Mann Whitney.

Tabela 9 - Comparação dos parâmetros densitométricos entre os grupos DMD e C

<i>Variáveis</i>	<i>DMD</i> <i>n=29</i>	<i>C</i> <i>n=13</i>	<i>p</i>
DMOa CL (g/cm ²)*	0,66 (0,55-0,80)	0,73 (0,62-0,99)	0,131 (1)
DMOv CL (g/cm ³)*	28,9 (13,9-40,1)	23,0 (20,9-35,7)	0,775 (1)
CMO CL (g)*	23,0 (16,9-34,2)	16,6 (13,0-36,8)	0,500 (1)
Escore-Z DMOa CL*	-1,6 (-2,5;-0,5)	0,1 (-0,3;0,4)	<0,0001 (1)
Padrão de DMD: Esperado para idade Abaixo para idade	13 (44,8) 16 (55,2)	13 (100,0) 0 (0,0)	0,001 (2)

DMD: Distrofia Muscular de Duchenne; DXA: Técnica da Densitometria Óssea; DMOa CL: densidade mineral óssea areal da coluna lombar L1-L4; DMOv CL: densidade mineral óssea volumétrica estimada da coluna lombar L1-L4; CMO CL: conteúdo mineral ósseo da coluna lombar L1-L4. Escore-Z DMOa CL: Escore-Z da densidade mineral óssea da coluna lombar L1-L4; *Valores expressos em mediana e intervalo inter-quartil Q1 e Q3; (1) Teste de Mann Whitney; **Valores expressos em número e porcentagem; (2) Teste Qui-Quadrado Exato.

ANEXO 6.6: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DO METABOLISMO MINERAL ÓSSEO EM PACIENTES COM Distrofia Muscular de Duchenne

Pesquisador: Maria Goretti Moreira Guimarães Penido

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 18905313.0.0000.5149

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da UFMG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 451.012

Data da Relatoria: 04/11/2013

Apresentação do Projeto:

A distrofia muscular de Duchenne é uma das distrofias mais prevalentes e graves dentre as miopatias infantis. É uma doença hereditária progressiva com herança recessiva ligada ao cromossomo X, e o gene anormal localiza-se no braço curto do cromossomo X, lócus Xp21, sub banda Xp212. A deficiência da expressão da distrofina favorece a necrose da fibra muscular, desencadeando um estado inflamatório do músculo esquelético. A DMD caracteriza-se por fraqueza muscular simétrica e progressiva que se torna evidente por volta dos cinco anos de idade. A perda da capacidade de deambulação ocorre em torno de doze anos de idade e a dinâmica respiratória é acometida mais tardiamente, assim como o envolvimento da musculatura cardíaca, e problemas ortopédicos, que surgem em fase mais avançada da doença. A DMD ainda não possui cura. O tratamento objetiva reduzir as incapacidades, prevenir complicações, prolongar a mobilidade e melhorar a qualidade de vida. A perda óssea é caracterizada por baixa massa óssea e deterioração na micro-arquitetura do tecido ósseo, aumentando a fragilidade dos ossos e a susceptibilidade a fraturas. A redução da densidade mineral óssea é importante e mais de um terço dos pacientes têm fraturas patológicas. O mecanismo envolvido na dinâmica óssea ainda é incerto e a literatura é escassa, porém sabe-se que há redução da densidade mineral óssea, independente da terapia com corticóide. Estudos têm

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 451.012

demonstrado a participação de citocinas, em particular o TNF, IL-1 e a IL-6, no processo de reabsorção óssea nos pacientes com DMD. As alterações ósseas são secundárias não apenas à falência da tração muscular, mas também ao marcante desequilíbrio entre a atividade entre osteoblastos e osteoclastos, causado pela circulação e produção local de citocinas. Consensos recentes recomendam avaliação de marcadores urinários e sanguíneos do metabolismo mineral ósseo assim como medida da massa óssea. O fator de crescimento fibroblástico 23 (FGF-23) tem participação especial no metabolismo mineral e tem sido indicado como um marcador de doença mineral óssea. Entretanto, a relação entre FGF-23 e a doença óssea da DMD são desconhecidas. A hipótese avaliada é: O metabolismo mineral ósseo em crianças e adolescentes com Distrofia Muscular de Duchenne está alterado.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar os marcadores do metabolismo mineral ósseo em crianças e adolescentes com Doença de Duchenne (DMD).

Objetivo Secundário:

(1) Avaliar a densidade mineral óssea (DMO) dos pacientes pediátricos com Doença de Duchenne (DMD) através da densitometria óssea; (2) Avaliar os marcadores de remodelamento ósseo (cálcio, fósforo, 25OH Vitamina D, paratormônio (PTH), fosfatase alcalina óssea, FGF-23) em amostras sanguíneas e urinárias; (3) Correlacionar os níveis séricos de FGF-23 com os níveis séricos de cálcio, fósforo, 25OH Vitamina D e PTH; (4) Correlacionar os níveis séricos de FGF-23 com os níveis urinários de cálcio e fósforo; (5) Correlacionar os níveis séricos de FGF-23 com a densidade mineral óssea da população estudada.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

De acordo com o projeto, os riscos para os sujeitos do estudo estão relacionados ao desconforto durante a coleta de material biológico. Há possibilidade de hematomas e dor no local da punção. A coleta sanguínea será realizada por pessoas devidamente habilitadas e seguindo as normas técnicas adequadas (materiais esterilizados e descartáveis), para minimizar todos esses riscos. Os indivíduos serão informados sobre os riscos previstos na coleta de sangue e onde as mesmas serão coletadas. Além disso, há ainda o desconforto relacionado ao constrangimento causado durante a entrevista e durante a coleta de urina de 24 horas. O desconforto e constrangimento serão minimizados na medida do possível, respeitando a integridade física e psicológica do indivíduo. As informações individuais obtidas serão mantidas em caráter confidencial, sendo de

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 451.012

acesso apenas dos pesquisadores. A identidade dos participantes não será conhecida, mantendo-se o anonimato dos mesmos. Os resultados do estudo serão tornados públicos, sejam eles favoráveis ou não.

Benefícios:

A preservação da saúde óssea é um fator importante na evolução de pacientes com DMD. Grande parte destes pacientes é submetida a extensas cirurgias ortopédicas, principalmente na coluna, na tentativa de manter o paciente ereto. Além disso, os mesmos fazem uso prolongado de variadas doses de corticóides e evoluem com sedentarismo progressivo devido à perda da função da massa muscular. Nesse sentido, a qualidade da massa óssea é importante para o sucesso da terapia ortopédica e melhora da qualidade de vida destes pacientes. O estudo em questão busca analisar e estudar a dinâmica mineral óssea, a fim de minimizar esse remodelamento ósseo e garantir uma sobrevida maior e com mais qualidade aos pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo transversal, será desenvolvido no Ambulatório de Neurologia Pediátrica da Unidade de Neurologia Pediátrica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. A população será composta por 60 pacientes pediátricos com DMD que já se encontram em acompanhamento no referido Ambulatório de Neurologia. Os pacientes serão captados quando procurarem o Ambulatório de Neurologia Pediátrica da Unidade de Neurologia Pediátrica da FM- UFMG para consulta médica de rotina. Num primeiro momento, após sensibilização da família e do paciente para participar do estudo, o mesmo será avaliado quanto aos critérios de inclusão e exclusão. Àquele em condição de participar do estudo será apresentado o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). A coleta de dados será realizada em 2 etapas: avaliação clínica e exames complementares. A avaliação clínica será realizada pela pesquisadora. Amostras sanguíneas serão coletadas para dosagem de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina, 25OH vitamina D, paratormônio, FGF-23 e creatinina. As amostras urinárias serão coletadas para dosagem de cálcio, citrato, fosfato e creatinina. O método de avaliação da integridade óssea será o da densitometria óssea, pela técnica de absorciometria por dois fótons de raios X (DXA), utilizando-se o aparelho de emissão de fótons com fonte de Raio X Lunar DPX - IQ 2516. O princípio da técnica de medida da densidade mineral óssea é a mensuração da transmissão de Raios X através do corpo. Será realizado fora do Hospital das Clínicas no Sistema Único de Saúde, quando o paciente for avaliado pela clínica ortopédica que o acompanha. Os exames sanguíneos e urinários de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina, creatinina, citrato e fosfato serão realizados nos laboratórios do Hospital das Clínicas e fazem parte da avaliação de rotina desses pacientes. O PTH, 25OH vitamina D e FGF-23 serão

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 451.012

realizados com recursos próprios da pesquisadora fora das dependências do Hospital das Clínicas, entretanto, os materiais serão coletados no mesmo momento da coleta das amostras sanguíneas e urinárias para os exames que serão realizados nos laboratórios do Hospital das Clínicas, sendo parte da rotina de exames desses pacientes. Isto significa dizer que não haverá deslocamento adicional do paciente, assim como outras amostras sanguíneas e urinárias. Os kits adequados para dosagem do FGF-23 já existem e estão disponíveis para este estudo. Este material será dosado no Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica da Faculdade de medicina da UFMG. As informações obtidas na avaliação clínica e os resultados de exames serão registrados em planilhas específicas de banco de dados (plataforma Windows Excel, 2000, Microsoft Corp, Redmont, USA) para então serem analisadas

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos apresentados: Projeto de Pesquisa; Folha de Rosto Assinada pelo Diretor da Faculdade de Medicina; Parecer Consubstanciado com Aprovação da Câmara do Departamento de Pediatria da UFMG; Declaração de Registro na Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão do Hospital das Clínicas da UFMG; Carta de Anuência da Gerência Funcional da Pediatria do Hospital das Clínicas da UFMG; TCLE.

O TCLE esta em forma de convite, explicita os objetivos, os procedimentos, os possíveis riscos e benefícios, garante o direito a recusa e sigilo das informações.

Recomendações:

TCLE: Modificado o nº da Resolução Conselho Nacional de Saúde. Para menores de 18 anos foi elaborado o Termo de Assentimento em linguagem acessível.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Somos pela aprovação do projeto "AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DO METABOLISMO MINERAL ÓSSEO EM PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE" da pesquisadora Maria Goretti Moreira Guimarães Penido.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado conforme parecer.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 451.012

BELO HORIZONTE, 08 de Novembro de 2013

Assinador por:
Maria Teresa Marques Amaral
(Coordenador)

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br