

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Medicina

**ESTUDO DE MUTAÇÕES NO GENE *SEPN1* EM PACIENTES
BRASILEIROS PORTADORES DE MIOPATIAS E
DISTROFIAS MUSCULARES CONGÊNITAS**

ERALDA LUÍZA CASTRO CONCENTINO

Belo Horizonte

2011

ERALDA LUÍZA CASTRO CONCENTINO

**ESTUDO DE MUTAÇÕES NO GENE *SEPN1* EM PACIENTES
BRASILEIROS PORTADORES DE MIOPATIAS E
DISTROFIAS MUSCULARES CONGÊNITAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Área de Concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Gurgel Giannetti.

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina da UFMG
Março de 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Clélio Campolina Diniz

Vice-Reitora: Prof^a. Rocksane de Carvalho Norton

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Ricardo Santiago Gómez

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Renato de Lima Santos

Diretor da Faculdade de Medicina: Francisco José Penna

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina: Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

Subcoordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof^a. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Chefe do Departamento de Pediatria: Benigna Maria de Oliveira

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente: Prof^a. Ana Cristina Simões e Silva

Subcoordenador do Programa de Pós-Graduação em Medicina - Área de concentração em pediatria: Prof. Eduardo Araújo Oliveira

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Área de concentração em Saúde da Criança e do Adolescente:

Ana Cristina Simões e Silva –Titular / Benigna Maria de Oliveira - Suplente

Cássio da Cunha Ibiapina -Titular / Cristina Gonçalves Alvim - Suplente

Eduardo Araújo de Oliveira –Titular / Eleonora M. Lima – Suplente

Francisco José Penna -Titular / Alexandre Rodrigues Ferreira - Suplente

Jorge Andrade Pinto -Titular / Vitor Haase - Suplente

Ivani Novato Silva –Titular / Juliana Gurgel – Suplente

Marcos José Burle de Aguiar-Titular / Lúcia Maria Horta de Figueiredo Goulart-Suplente

Maria Cândida Ferrarez Bouzada Viana –Titular / Cláudia Regina Lindgren - Suplente

Michelle Ralil da Costa (Disc. Titular) / Marcela Guimarães Cortes (Disc. Suplente)

Dedico esta conquista
à minha querida mãe,
que tanto sonhou e incentivou
esta entre todas as minhas vitórias.

Mamãe, nada seria possível
sem a sua constante presença
na minha vida, mesmo que,
agora, de outra dimensão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, por Sua presença constante em minha vida, em meus projetos e sonhos. Por iluminar e colocar nela pessoas tão especiais às quais também devo meus sinceros agradecimentos.

À minha querida orientadora, amiga e grande exemplo de vida, de coragem e de determinação, Dr^a. Juliana Gurgel Giannetti. Agradeço também por todas as oportunidades de crescimento profissional e pessoal e pelos brilhantes ensinamentos. Por sua paciência, carinho e principalmente por sua preciosa amizade.

À querida Dr^a. Mariz Vainzof, por seu inestimável apoio nesta pesquisa, pela grande oportunidade de trabalho e aprendizado junto à sua equipe, por toda a sua paciência e pelos valiosos ensinamentos.

A toda a equipe do Centro de Estudos do Genoma Humano, pelos ensinamentos e orientações.

À querida Prof^a. Lúcia Porto, pelos aprendizados e por toda sua doçura.

À querida Dr^a. Sarah Camargos, pela amizade e pelos ensinamentos.

Às queridas companheiras de laboratório, Lourdinha e Margareth, pelo companheirismo e pelos momentos alegres.

A todos os integrantes do grupo de Doenças Neuromusculares do Hospital das Clínicas-UFMG, pela troca de experiências e pelo apoio mútuo.

Aos pais e pacientes que aceitaram participar desta pesquisa.

Aos meus irmãos, Luciana e Luis, pela amizade, apoio e pelo nosso amor incondicional.

A minha sobrinha, Maria Eduarda, por ser a minha grande alegria e por ser elemento motivador para a conclusão desta etapa em minha vida profissional.

Ao meu pai, pelo incentivo e carinho.

Ao Renato, pelo apoio, carinho e paciência.

À minha amada mãe, por todo o seu amor e dedicação. Por ser meu grande exemplo de perseverança e fé. Obrigada, mamãe, por fazer de mim quem eu sou.

NOTA EXPLICATIVA

Seguindo os critérios estabelecidos pelo Colegiado 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 (FM-UFMG), esta dissertação foi apresentada na forma de artigos científicos, contendo um artigo de revisão e outro original.

E de acordo com a resolução 03/2010 que regulamenta o formato de teses e dissertações do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da UFMG a apresentação desta dissertação seguirá o esquema:

1. Considerações iniciais
2. Artigo I - Miopatias relacionadas à selenoproteína N
3. Objetivos
4. Metodologia
5. Artigo II - Miopatias relacionadas à selenoproteína N (*SEPN1*): estudo clínico, histopatológico e genético em pacientes brasileiros
6. Considerações finais
7. Apêndices e Anexos

RESUMO

Introdução: diferentes formas de miopatias estão relacionadas ao gene da selenoproteína N, entre as quais a distrofia muscular congênita tipo espinha rígida (DMER), miopatia multiminicore (DMm), desmiopatia com *mallory body* e miopatia com desproporção congênita de fibras (MDCF). Até o momento, não há estudos nacionais sobre mutações no gene *SEPN1* em pacientes brasileiros com miopatias relacionadas à selenoproteína N. O presente estudo é uma dissertação de mestrado apresentada na forma de dois artigos científicos: o primeiro, uma revisão da literatura sobre miopatias relacionadas à selenoproteína N; e o segundo mostra os resultados do estudo do gene *SEPN1* em pacientes brasileiros com tais afecções. **Objetivo:** avaliar a presença de mutações no gene *SEPN1* em paciente brasileiros com miopatias relacionadas à selenoproteína N e correlacionar os achados clínicos, histopatológicos e genéticos. **Metodologia:** pacientes portadores de miopatias relacionadas ao gene *SEPN1* foram submetidos a: avaliação clínica, dosagem de creatinofosfoquinase (CPK), eletroneuromiografia (ENMG) e biópsia muscular com estudo histoquímico por ocasião do diagnóstico. Realizou-se protocolo de pesquisa, no prontuário, dos dados clínicos dos pacientes. Fez-se revisão da histopatologia muscular dos pacientes incluídos na pesquisa bem como estudo molecular dos pacientes, de alguns familiares e de controles normais, pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento do gene *SEPN1*. **Resultados:** incluíram-se 18 pacientes de 16 famílias diferentes. Desses, 10 foram classificados como portadores de DMER, sete com DMm e um com MDCF. O estudo molecular revelou mutações em seis famílias. Família 1: um paciente com fenótipo clássico de DMm, com mutação em heterozigose composta (cG1010T/cT1384G). Famílias 2 e 3: dois pacientes não aparentados, com fenótipo de DMER, com inserção de uma base fora de fase em heterozigose (c713-714insA). Família 4: um paciente com MDCF com inserção de 12 bases em fase (c316-317Ins12bp). Família 5: um paciente com DMm forma pré-natal com artrogripose e mutação com sentido trocado em heterozigose (cG583A), cuja alteração complementar não foi identificada. Família 6: três irmãos afetados com quadro de miopatia e rigidez cervical, nos quais foi identificada uma inserção em fase, de três pares de base, em heterozigose (c438-439ins3bp). **Conclusão:** as miopatias relacionadas à selenoproteína N apresentaram amplo fenótipo clínico e histopatológico. Das seis mutações encontradas, duas (c713-714insA e cT1384G) estavam descritas na literatura como patogênicas, em pacientes com DMER e DMm. Das outras quatro não houve registros. A mutação cG1010T foi detectada em heterozigose composta com a mutação patogênica cT1384G em um paciente com DMm, sendo considerada, devido às suas características e ausência em controles normais, mutação nova patogênica. A mutação c438-439ins3bp é um polimorfismo, pois foi encontrada em homozigose em um dos pais assintomáticos e em 2% dos controles normais. As outras duas mutações cG583A e c316-317Ins12bp requerem mais estudos para melhor esclarecimento de sua patogenicidade. O estudo molecular pode auxiliar na confirmação do diagnóstico, bem como no aconselhamento genético familiar.

Palavras-chave: Miopatias relacionadas à selenoproteína N. Distrofia muscular congênita tipo espinha rígida. Miopatia multiminicore. Deminopatia com *mallory body*. Miopatia com desproporção congênita de fibras.

ABSTRACT

Introduction: different kinds of myopathy are related to the selenoprotein N gene, among which: congenital muscular dystrophy with rigid spine (RSMD) multiminicore myopathy (MmD), desminopathy with Mallory body and congenital fiber-type disproportion myopathy (CFTD). Until the present moment there aren't national studies that evaluated mutations in the gene *SEPN1* in Brazilian patients with myopathy related to selenoprotein N. This study is a dissertation and will be presented in the form of two papers: the first, a literature review of myopathies related to selenoprotein N and the second shows the results of the study of *SEPN1* gene in Brazilian patients with such conditions. **Objective:** to evaluate the presence of mutations in the *SEPN1* gene in Brazilian patients with myopathies related to selenoprotein N and to correlate the clinical, histopathological and genetic findings. **Methodology:** patients with myopathies related to *SEPN1* gene were submitted to: clinical evaluation, measurement of creatinephosphokinase (CPK), electromyography (ENMG) and muscle biopsy with histochemistry study because of diagnosis. We conducted a research protocol, through the medical record and clinical data of patients. We reviewed the muscle histopathology of patients included in the research and molecular study of patients, some family members and normal controls, by technique of polymerase chain reaction (PCR) and sequencing of the gene *SEPN1*. **Results:** Were included eighteen patients from sixteen different families. This patients ten were classified with, seven patients were classified with MmD and one patient with CFTD. The molecular analysis revealed mutations in six families. Family 1: A patient with classic phenotype of MmD with compound heterozygous mutation (cG1010T/cT1384G). Family 2 and 3: Two patients unrelated with RSMD phenotype with insertion of a base out of phase in heterozygous (c713-714insA). Família 4: One patient with CFTD showed insertion of 12 bases in phase (c316-317 Ins.12bp). Family 5: One patient with MmD prenatal form with arthrogyrosis showed a missense mutation in heterozygose (cG583A) in which the complementar change was not identified. Family 6: Three affected siblings with myopathy and stiff neck which was identified one insertion in phase of three base pairs in heterozygous (c438-439ins3bp). **Conclusion:** Myopathies related to selenoprotein N have a wide clinical phenotype and histology. Among the six mutations found two (C713-714insA and cT1384G) had previously been described in the literature as pathogenic in patients with DMER and MmD. The others four changes were not found descriptions in the literature. The mutation cG1010T was found in compound heterozygous with the pathogenic mutation cT1384G in a patient with MmD, being considered due to their characteristics and absence in normal controls, a new pathogenic mutation. The mutation c438-439ins3bp, is a polymorphism because it was found homozygous in a parent asymptomatic and in 2% of normal controls. The other two mutations cG583A and c316-317Ins12bp require further studies for better elucidation as to its pathogenicity. The molecular analysis can help confirm the diagnosis, as well as genetic counseling of families.

Keywords: Myopathies related to selenoprotein N. Congenital muscular dystrophy with rigid spine. Multiminicore myopathy. Desminopathy with Mallory-body. Congenital fiber-type disproportion myopathy.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTA1	<i>Actin gene</i>
AD	Autossômico dominante
AE	Artéria esquerda
AR	Autossômico recessiva
ATPase	Adenosina trifosfatase
BIN1	<i>Bridging integrator 1 gene</i>
BP	<i>Base Pair</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CFL2	<i>Cofilin 2 gene</i>
CG	Citosina-Guanina
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COL6A1	<i>Collagen type VI alpha 1 gene</i>
COL6A2	<i>Collagen type VI alpha 2 gene</i>
COL6A3	<i>Collagen type VI alpha 3 gene</i>
COX	Citocromo C oxidase
CPK	Creatinofosfoquinase
CV	Capacidade vital
DHL	Desidrogenase láctica
DMC	Distrofia muscular congênita
DMER	Distrofia muscular congênita tipo espinha rígida
DNM	Doença neuromuscular
dNTP	Desorribonucleotídeo trifosfatado
ECG	Eletrocardiograma
ECO	Ecocardiograma
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ENMG	Eletroneuromiografia
ERS	Elemento de redefinição da selenocisteína
FE	Fração de ejeção
FHL1	<i>Four and a half LIM domains 1 gene</i>
FKRP	<i>Fukutin gene</i>

FM	Faculdade de Medicina
Gomori	Tricrômico de gomori modificado
HC	Hospital das Clínicas
HE	Hematoxilina-eosina
ITGA7	<i>Integrin alpha 7 gene</i>
LAMA2	<i>Laminin alpha 2 gene</i>
LARGE	<i>Like-glycosyltransferase gene</i>
MC	Miopatia congênita
MDCF	Miopatia com desproporção congênita de fibras
MmD	Miopatia multiminicore
MTM1	<i>Myotubularin 1 gene</i>
MYH3	<i>Myosin heavy chain 3 gene</i>
MYH7	<i>Myosin heavy chain 7 gene</i>
MYH8	<i>Myosin heavy chain 8 gene</i>
MYOT	<i>Myotilin gene</i>
NADH	Nicotinamida adenine dinucleotídeo
NEB	<i>Nebulin gene</i>
ORO	Oil Red O
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PFT	Pico de fluxo da tosse
POMGNT1	Protein O-linked mannose beta1,2-N acetylglucosaminyltransferase gene
POMT1	<i>Protein-O-mannosyltransferase 1 gene</i>
POMT2	<i>Protein-O-mannosyltransferase 2 gene</i>
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
RNA_t	Ácido ribonucleico transportador
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RYR1	<i>Ryanodine Receptor Intracellular gene</i>
SCAD	<i>Short-chain acyl gene</i>
SDH	Succinato desidrogenase
SEC	Selenocisteína
SECIS	Sequência de inserção da selenocisteína
SECISBP2	<i>Selenocysteine insertion sequence-binding protein 2</i>

SEPN1	Selenoproteína N1
TGA	Códon da selenocisteína
TNNI	Troponin I gene
TNNT1	<i>Troponin T type 1 gene</i>
TNNT2	<i>Troponin T type 2 gene</i>
TNNT3	<i>Troponin T type 3 gene</i>
TPM2	<i>Tropomyosin 2</i>
TPM3	<i>Tropomyosin 3</i>
TTN	<i>Titin gene</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO¹

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	14
REFERÊNCIAS.....	17
2 ARTIGO 1 - MIOPATIAS RELACIONADAS À SELENOPROTEÍNA N.....	19
3 OBJETIVOS.....	47
3.1 Objetivo geral.....	47
3.2 Objetivos específicos.....	47
4 METODOLOGIA.....	48
5 ARTIGO 2 - MIOPATIAS RELACIONADAS À SELENOPROTEÍNA N (SEPN1): ESTUDO CLÍNICO, HISTOPATOLÓGICO E GENÉTICO EM PACIENTES BRASILEIROS.....	58
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	90
APÊNDICES E ANEXOS.....	91

¹ Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas aprovadas pelo Acordo Ortográfico assinado entre os países que integram a Comunidade de Países de Língua Portuguesa (CPLP), em vigor no Brasil desde 2009.

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

As miopatias são doenças que afetam primariamente o tecido muscular e podem ser tanto de origem genética quanto adquirida. Classicamente, as miopatias genéticas podem ser subdivididas entre os grupos: congênitas, metabólicas e distrofias musculares (congênitas e progressivas) (CARVALHO, 2005).

As miopatias congênitas (MCs) caracterizam-se por hipotonia e fraqueza generalizadas presentes desde os primeiros meses de vida, com hipotrofia muscular global e progressão clínica estável ou lentamente progressiva (SEWRY; JIMENEZ-MALLEBRERA; MUNTONI, 2008). Quanto à biópsia muscular, normalmente verifica-se o predomínio e/ou a atrofia das fibras do tipo I associado a outras alterações morfológicas tais como: corpos nemalínicos, *cores*, minicores, entre outras (LAING, 2007).

O grupo das distrofias musculares congênitas (DMCs) é caracterizado como doenças musculares com manifestações clínicas evidentes desde o nascimento ou nos primeiros anos de vida, associada a um padrão distrófico à biópsia muscular (REED, 2009a; 2009b). Destaca-se que as miopatias congênitas e as distrofias musculares congênitas, apesar de manifestarem-se clinicamente por fraqueza e hipotonia nos primeiros anos de vida, geralmente têm achados histopatológicos diferentes e constituem dois vastos e diferentes grupos de doenças musculares (SEWRY; JIMENEZ-MALLEBRERA; MUNTONI, 2008).

Atualmente, o avanço dos conhecimentos de tais doenças e dos seus mecanismos, a partir das diversas pesquisas nesse campo, permite melhor compreensão a respeito das doenças musculares, assim como dos vários aspectos que as circundam (SEWRY; JIMENEZ-MALLEBRERA; MUNTONI, 2008).

O crescente conhecimento sobre os genes e seus produtos gênicos com expressão no tecido muscular gerou compreensão mais ampla sobre o funcionamento, a distribuição e o papel das várias proteínas musculares, levando à elaboração de uma nova classificação baseada no defeito genético e na proteína alterada. Por outro lado, o avanço do conhecimento no defeito genético primário revela grande variabilidade fenotípica e genotípica. Desta forma, nota-se que um

achado histopatológico pode estar associado a mutações em diferentes genes, bem como mutações em um mesmo gene podem revelar alterações histopatológicas diversas (LAING, 2007; SEWRY; JIMENEZ-MALLEBRERA; MUNTONI, 2008).

Na classificação atual descreve-se um grupo de miopatias relacionadas à selenoproteína N. Esta é uma proteína da família das selenoproteínas, que são proteínas caracterizadas pela presença da selenocisteína (SEC) em sua estrutura primária. A selenocisteína representa a principal forma biológica do *selenium* (MOGHADASZADEH; BEGGS, 2006).

A selenoproteína N é codificada pelo gene *SEPN1*, que está localizado na região 36 do braço curto do cromossoma 1 (1p36) e é uma glicoproteína integral de membrana de 70 kDa localizada no retículo endoplasmático de diversos tecidos, incluindo pâncreas, rim, coração, fígado, pulmão, cérebro e músculo-esquelético, e se expressa precocemente durante a embriogênese (MOGHADASZADEH *et al.*, 2001; PETIT *et al.*, 2003).

Em 2001, foram identificadas as primeiras mutações no gene da selenoproteína N (*SEPN1*) em pacientes com distrofia muscular congênita tipo espinha rígida (MOGHADASZADEH *et al.*, 2001). Desde então, mutações no gene *SEPN1* foram associadas a outras formas de doenças musculares congênitas (FERREIRO *et al.*, 2002; 2004).

Em 2004, Ferreiro *et al.* propuseram o reconhecimento de um grupo de miopatias relacionadas à selenoproteína N, no qual se incluíam três formas de doenças musculares autossômicas recessivas, sendo elas: distrofia muscular congênita tipo espinha rígida, miopatia multiminicore e a desminopatia com *mallory body*.

Em 2006, a miopatia com desproporção congênita de fibras foi incluída neste grupo como sendo a quarta doença associada ao gene *SEPN1* (CLARKE *et al.*, 2006).

Apesar dessas quatro doenças musculares apresentarem algumas características semelhantes, são descritas na literatura como condições com fenótipos clínicos e histopatológicos bem definidos (CLARKE *et al.*, 2006; MOGHADASZADEH; BEGGS, 2006).

Desde então, pesquisas avaliando a associação desses fenótipos ao gene *SEPN1* têm sido realizadas, porém até o presente momento não existem estudos descritos na população brasileira (ALLAMAND *et al.*, 2006; CAGLIANI *et al.*, 2011; CLARKE *et al.*, 2006; LESCURE *et al.*, 2009; MAITI *et al.*, 2009; OKAMOTO *et al.*, 2006; PEAT *et al.*, 2008; SCHARA *et al.*, 2008; TAJSHARGHI *et al.*, 2005; TREVES *et al.*, 2008; VENANCE *et al.*, 2005).

Portanto, esta pesquisa tem como seu foco principal o estudo dos pacientes brasileiros com tais diagnósticos, a fim de avaliar a associação desses fenótipos ao gene *SEPN1*, identificar mutações e comparar com aquelas descritas na literatura.

Esta dissertação será apresentada sob a forma de artigos, conforme orientado pelo 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.

Foram elaborados dois artigos: o primeiro consiste em uma revisão da literatura sobre as miopatias relacionadas à selenoproteína N. O segundo artigo foi elaborado utilizando os resultados do estudo clínico, histopatológico e molecular realizado em pacientes portadores de doenças musculares acompanhados no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e pelo Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo.

REFERÊNCIAS

- ALLAMAND, V. A single homozygous point mutation in a 3'untranslated region motif of selenoprotein N mRNA causes SEPN1-related myopathy. **EMBO Reports**, v. 7, n. 4, p. 450-4, 2006.
- CAGLIANI, R. *et al.* New molecular findings in congenital myopathies due to selenoprotein N gene mutations. **J Neurol Sci**, v. 300, n. 1-2, p. 107-13, Jan. 2011.
- CARVALHO, A.A. Myopathies. **Revista de Neurociências**, v. 13, n. 3 (supl-versão eletrônica), jul/set., 2005.
- CLARKE, N.F. *et al.* SEPN1: associated with congenital fiber-type disproportion and insulin resistance. **Ann Neurol**, v. 59, n. 3, p. 546-52, Mar. 2006.
- FERREIRO, A. *et al.* Desmin-related myopathy with Mallory body-like inclusions is caused by mutations of the selenoprotein N gene. **Ann Neurol**, v. 55, n. 5, p. 676-86, 2004.
- FERREIRO, A. *et al.* Mutations of the selenoprotein N gene, which is implicated in rigid spine muscular dystrophy, cause the classical phenotype of multiminicore disease: reassessing the nosology of early-onset myopathies. **Am J Hum Genet**, v. 71, p. 739-749, 2002.
- LAING, N.G. Congenital myopathies. **Current Opinion in Neurology**, v. 20, n. 5, p. 583-589, 2007.
- LESCURE, A. *et al.* Selenoprotein function and muscle disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1790, n. 11, p. 1569-74, Nov. 2009.
- MAITI, B. *et al.* A mutation in the SEPN1 selenocysteine redefinition element (SRE) reduces selenocysteine incorporation and leads to SEPN1-related myopathy. **Hum Mutat**, v. 30, n. 3, p. 411-6, Mar. 2009.
- MOGHADASZADEH, B.; BEGGS, A.H. Selenoproteins and their impact on human health through diverse physiological pathways. **Physiology (Bethesda)**, v. 21, p. 307-15, Oct. 2006.
- MOGHADAZADEH, B. *et al.* Mutations in *SEPN1* cause congenital muscular dystrophy with spinal rigidity and restrictive respiratory syndrome. **Nat Genet**, v. 29, p. 17-18, 2001.
- OKAMOTO, Y. *et al.* Molecular mechanism of rigid spine with muscular dystrophy type 1 caused by novel mutations of selenoprotein N gene. **Neurogenetics**, v. 7, n. 3, p. 175-83, Jul. 2006.

PEAT, R.A. *et al.* Diagnosis and etiology of congenital muscular dystrophy. **Neurology**, v. 71, n. 5, p. 312-21, Jul. 2008.

PETIT, N. *et al.* Selenoprotein N: an endoplasmic reticulum glycoprotein with an early developmental expression pattern. **Hum Mol Genet**, v. 12, n. 9, p. 1045-53, May, 2003.

REED, U.C. Congenital muscular dystrophy. Part I: a review of phenotypical and diagnostic aspects. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 67, n. 1, p. 144-168, 2009a.

REED, U.C. Congenital Muscular Dystrophy. Part II: a review of pathogenesis and therapeutic perspectives. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 67, n. 2-A, p. 343-362, 2009b.

SCHARA, U. *et al.* The phenotype and long-term follow-up in 11 patients with juvenile selenoprotein N1-related myopathy. **Eur J Paediatr Neurol**, v. 12, n. 3, p. 224-30, May, 2008.

SEWRY, C.A.; JIMENEZ-MALLEBRERA, C.; MUNTONI, F. Congenital myopathies. **Current Opinion in Neurology**, v. 21, n. 5, p. 569-575, 2008.

TAJSHARGHI, H. *et al.* Early onset myopathy with a novel mutation in the Selenoprotein N gene (*SEPN1*). **Neuromuscul Disord**, v. 15, n. 4, p. 299-302, Apr. 2005.

TREVES, S. *et al.* Congenital muscle disorders with cores: the ryanodine receptor calcium channel paradigm. **Curr Opin Pharmacol**, v. 8, n. 3, p. 319-26, Jun. 2008.

VENANCE, S.L. *et al.* Rigid spine muscular dystrophy due to *SEPN1* mutation presenting as cor pulmonale. **Neurology**, v. 64, n. 2, p. 395-6, Jan. 2005.

2 ARTIGO 1 - MIOPATIAS RELACIONADAS À SELENOPROTEÍNA N

RESUMO

O presente estudo consiste em uma revisão bibliográfica sobre as miopatias relacionadas à selenoproteína N, o gene *SEPN1* e seu produto gênico - a selenoproteína N. **Fonte de dados:** revisão bibliográfica não sistemática, referente ao período de 1956 a 2011, utilizando as bases de dados PubMed/ MEDLINE e LILACS, a partir das seguintes palavras-chave: miopatias relacionadas à selenoproteína N, distrofia muscular congênita tipo espinha rígida, miopatia multiminicore, deminopatia com *mallory body* e a miopatia com desproporção congênita de fibras. **Síntese dos dados:** as miopatias relacionadas à selenoproteína N representam um grupo heterogêneo do ponto de vista clínico e histopatológico. São reconhecidas quatro diferentes formas de miopatias: distrofia muscular congênita forma espinha rígida, miopatia multiminicore, deminopatia com *mallory body* e a miopatia com desproporção congênita de fibras. Cerca de 40 mutações já foram descritas no gene *SEPN1* em pacientes com essas formas de miopatias. O gene *SEPN1* codifica a selenoproteína N, que é uma glicoproteína localizada no retículo endoplasmático que se expressa precocemente durante o desenvolvimento tecidual. Até o momento não existem registros de dados referentes a estudos que tenham avaliado a associação desses fenótipos ao gene *SEPN1* na população brasileira.

Palavras-chave: Miopatias relacionadas à selenoproteína N. Distrofia muscular congênita tipo espinha rígida. Miopatia multiminicore. Deminopatia com *mallory body*. Miopatia com desproporção congênita de fibras.

ABSTRACT

The present study consists of a literature review on myopathies related to selenoprotein N, the gene *SEPN1* and its gene product - the selenoprotein N. **Source of data:** non-systematic literature review, covering the period 1956 to 2011, using the database PubMed / MEDLINE and LILACS, from the following keywords: Myopathies related to selenoprotein N. Congenital muscular dystrophy with rigid spine. Multiminicore myopathy. Desminopathy with Mallory-body. Congenital fiber-type disproportion myopathy. **Data Synthesis:** Myopathies related to selenoprotein N represent a heterogeneous group in terms of clinical and histopathological study. Are recognized four different types of myopathies, congenital muscular dystrophy with rigid spine. Multiminicore myopathy. Desminopathy with Mallory-body. Congenital fiber-type disproportion myopathy. Approximately 40 mutations have been described in *SEPN1* gene in patients with these forms of myopathies. The gene *SEPN1* encoding the selenoprotein N which is a glycoprotein located in the endoplasmic reticulum that is expressed early during tissue development. Until the present moment there are no records of data from studies that have evaluated the association of these phenotypes to gene *SEPN1* in Brazilian population.

Keywords: Myopathies related to selenoprotein N. Congenital muscular dystrophy with rigid spine. Multiminicore myopathy. Desminopathy with Mallory-body. Congenital fiber-type disproportion myopathy.

2.1 Introdução

As doenças neuromusculares (DNMs) são afecções que acometem a unidade motora, podendo comprometer os neurônios do corno anterior da medula espinhal, a raiz nervosa e os nervos periféricos, a junção neuromuscular ou o músculo. Existe a estimativa de que uma em cada 3.000 pessoas apresente algum tipo de doença neuromuscular¹. Nos Estados Unidos, a prevalência estimada de pessoas com doenças neuromusculares é de 400.000².

As doenças musculares consistem em um subgrupo das DNMs, caracterizadas pelo acometimento primário do tecido muscular e recebem o nome de miopatias. As miopatias podem ser divididas em genéticas, também conhecidas como hereditárias, ou adquiridas. Na infância nota-se predomínio de condições de origem genéticas, enquanto que as adquiridas são bem mais raras do que nos adultos².

Entre as miopatias genéticas e/ou hereditárias, são reconhecidos os seguintes subgrupos: congênitas, as distrofias musculares (congênitas ou progressivas) e miopatias metabólicas³.

As miopatias congênitas (MCs) caracterizam-se por hipotonia e fraqueza generalizadas presentes desde os primeiros meses de vida, com hipotrofia muscular global e progressão clínica estável ou lentamente progressiva⁴. Pode haver alterações dismórficas leves, como fácies alongada, deformidade torácica e escoliose. A dosagem de enzimas musculares geralmente se apresenta normal. Quanto à biópsia muscular, normalmente verifica-se o predomínio e/ou a atrofia das fibras do tipo I associado a outras alterações estruturais, tais como: corpos nemalínicos, *cores*, minicores, entre outras⁵.

O grupo das distrofias musculares congênitas (DMCs) é caracterizado como doenças musculares com manifestações clínicas evidentes desde o nascimento ou nos primeiros anos de vida, associada a um padrão distrófico à biópsia muscular⁶.

Destaca-se que as miopatias congênitas e as distrofias musculares congênitas, apesar de manifestarem-se clinicamente por fraqueza e hipotonia nos primeiros anos de vida, geralmente têm achados histopatológicos diferentes e constituem dois vastos e diferentes grupos de doenças musculares⁴.

Ressalta-se que a classificação das miopatias vem sofrendo modificações ao longo dos anos, de acordo com o avanço do conhecimento nesta área. As primeiras classificações baseavam-se em achados clínicos e histopatológicos, posteriormente foram incluídas informações sobre as proteínas musculares afetadas. Mais recentemente, as classificações tanto das miopatias congênitas quanto das distrofias musculares utilizam informações sobre o defeito genético primário, ou seja, os genes e seus produtos gênicos (proteínas). Por outro lado, o avanço do conhecimento no defeito genético primário revela a grande variabilidade fenotípica e genotípica. Desta forma, nota-se que um achado histopatológico pode estar associado a mutações em diferentes genes bem como mutações em um mesmo gene podem revelar alterações histopatológicas diversas^{4,5}.

Na classificação atual, descreve-se um grupo de miopatias relacionadas à selenoproteína N. Esta é uma proteína da família das selenoproteínas, que se caracteriza pela presença da selenocisteína (SEC) em sua estrutura primária. A selenocisteína representa a principal forma biológica do *selenium*⁷. Esse novo grupo de miopatias é um exemplo da variabilidade fenotípica ligada a um mesmo gene, no qual estão incluídas tanto formas de miopatias congênitas como de distrofias musculares congênitas⁸⁻¹¹.

A seguir será feita breve revisão dos grupos de miopatias congênitas, distrofias musculares congênitas com ênfase no grupo de miopatias relacionadas à selenoproteína N.

2.2 Miopatias congênitas

As MCs são condições genéticas e/ou hereditárias que geralmente apresentam anormalidade primária no tecido muscular, que pode ser estrutural ou não, e possuem curso estável ou lentamente progressivo⁵.

As miopatias congênitas em geral apresentam incidência estimada em torno de seis a cada 100.000 nascidos vivos ou 1/10 de todos os casos de desordens neuromusculares¹².

Quando comparadas a outras categorias de doenças musculares, as miopatias congênitas são consideradas descobertas relativamente novas, sendo que a primeira delas a ser descrita foi a miopatia congênita central *core*, em 1956¹³.

Após 40 anos já havia mais de 40 miopatias congênitas diferentes listadas em uma revisão, subdividindo-as em formas clássicas, aceitas e questionáveis¹⁴.

As classificações iniciais das miopatias congênitas baseavam-se no padrão de alterações observadas no tecido muscular. Eram descritos três grupos: miopatias estruturais, mistas e não estruturais. As miopatias estruturais consistiam em afecções que se caracterizavam pela presença de estruturas anormais nas fibras musculares. Estas alterações estruturais poderiam ser derivadas de constituintes normais do músculo ou não. Eram subdivididas em três grupos: as miopatias estruturais com anormalidades do sarcômero, com anormalidades da linha Z e com anormalidades nucleares; as miopatias mistas, assim denominadas por apresentarem mais de uma lesão estrutural, podendo representar mera coincidência ou não. As miopatias conhecidas como não estruturais, eram aquelas cujas anormalidades histopatológicas consistiam em alterações do diâmetro e/ou predomínio de tipo de fibras musculares. Já as miopatias mistas apresentavam alterações descritas nos dois grupos anteriores¹⁴.

A partir de estudos envolvendo as proteínas musculares e biologia molecular, novas informações acerca das miopatias congênitas foram obtidas. Desta forma, a aplicação clínica das classificações tradicionais baseadas exclusivamente nos achados histopatológicos tornou-se limitada, sendo necessária a sua substituição por classificações que incluam dados relacionados ao defeito genético e seus produtos gênicos⁷.

Classicamente, as miopatias congênitas são consideradas condições com fenótipo leve, início precoce dos sintomas, geralmente nos primeiros dois anos de vida, e curso estável ou lentamente progressivo⁵. No entanto, são também reconhecidas formas graves com limitações motoras e comprometimento da musculatura respiratória acentuadas, tais como a miopatia miotubular e a forma neonatal da miopatia nemalínica. A biópsia muscular é fundamental para o diagnóstico, uma vez que pode revelar anormalidades estruturais específicas frequentemente associadas ao predomínio e /ou atrofia de fibras tipo I^{4,5,15}.

Diferentes formas de herança são descritas, formas autossômicas dominantes, recessivas, bem como formas ligadas ao X. Entre elas, a herança autossômica recessiva é a mais comum^{3,6}.

Entre as miopatias congênitas mais frequentes, descrevem-se a miopatia central *core*, miopatia miotubular, miopatia centronuclear e miopatia nemalínica¹⁷.

No Quadro 1 encontra-se a descrição das principais miopatias congênitas, baseada em achados histopatológicos e genéticos.

Quadro 1 - Classificação das miopatias congênitas/defeito genético

Classificação miopatias congênitas	Tipo de herança	Gene relacionado
Miopatia nemalínica com corpos nemalínicos	AD ou AR AR AD AD AR AD	ACTA1 NEB TPM3 TPM2 TNNT1 CFL2
Outras miopatias com corpos nemalínicos -corpos nemalínicos associados a <i>cores</i> -corpos nemalínicos associados a <i>caps</i>	AD AD	RYR1 TPM2
Miopatias congênitas com cores: - miopatia central <i>core</i> - miopatia multiminicore - miopatia congênita com miocardiopatia fatal	AD ou AR AR AR	RYR1 SEPN1 TTN SCAD SECISBP2
Miopatias com núcleos centrais e centronuclear: -miopatia miotubular -miopatia centronuclear -miopatia com cardiopatia fatal	Ligado ao X AD AR AD AR	MTM1 DNM2 BIN1 RYR1 TTN
Miopatias congênitas com acúmulo de proteínas: - miopatia com agregados de actina - miopatia com corpos nemalínicos - <i>cap disease</i> - miopatia com corpos redutores - miopatia com corpos esferoides	AD AD AD Ligado ao X AD	ACTA1 MYH7 TPM2 FHL1 MYOT
Miopatia com desproporção congênita de fibras	AD AR AD	ACTA1 SEPN1 TPM3
Classificação miopatias congênitas	Tipo de herança	Gene relacionado
Miopatia congênita caracterizada por envolvimento distal ou artrogripose distal ou ambos	AR AD AD AD AD AD	NEB TPM2 MYH3 MYH8 TNNI2 TNNT3

Fonte: Imagem modificada^{4,18-22}.

ACTA1= *actin gene*; AD= autossômico dominante; AR= autossômico recessiva; BIN= *Bridging integrator gene*; CFL= *cofilin gene*; DNM= doença neuromuscular; FHL1= *Four and a half LIM domains gene*; MTM= *Myotubularin gene*; MYH7= *Myosin heavy chain gene*; NEB= *Nebulin gene*; RYR= *Ryanodine Receptor Intracellular gene*; SCAD= *Short-chain acyl gene*; SECISBP2= *Selenocysteine insertion sequence-binding protein*; SEPN1= *selenoproteína N*; TNNI= **Troponin I**; TNNT= *Troponin T type gene*; TPM= *Tropomyosin*; TTN= *Titin gene*.

2.3 Distrofias musculares congênitas

As DMCs geralmente apresentam herança autossômica recessiva e manifestações clínicas evidentes desde o nascimento ou nos primeiros anos de vida, caracterizadas por hipotonia e fraqueza muscular associada a atraso no desenvolvimento motor. A biópsia muscular revela padrão distrófico⁶. Portanto, destaca-se que a diferenciação entre as DMCs e MCs é feita principalmente pelos achados da biópsia muscular.

A prevalência das DMCs é de 1:60.000 ao nascimento e de 1:100.000 na população geral⁶.

O quadro clínico é de gravidade variável e geralmente possui evolução clínica que cursa com fraqueza muscular de tronco e membros, hipotonia e diversas contraturas musculares. Algumas formas caracterizam-se pelo acometimento ocular e do sistema nervoso central, tais como a distrofia tipo *Fukuyama, muscle eye brain e walker warburg*^{6,16}.

Nesse grupo observou-se também, nas últimas décadas, acentuado avanço no conhecimento acerca dos defeitos genéticos, da expressão e função dos produtos gênicos (proteínas), bem como dos diferentes fenótipos. Assim, novas classificações baseadas nesses achados vêm sendo sugeridas. Em 2004, Voit e Tomé propuseram uma nova classificação que divide as DMCs em quatro grupos²³: DMC com deficiência primária de merosina; DMC associada a anormalidades da glicosilação da alfa-distroglicana; DMCs associada a contraturas articulares graves; DMC com deficiência primária ou secundária de integrina. Em 2006, Mendell, Boué e Martin descreveram uma classificação das DMCs dividindo-as em três grandes grupos baseados no gene e na localização da proteína alterada²⁴. Essas duas classificações encontram-se descritas no Quadro 2^{23,24}.

Quadro 2 – Novas classificações das distrofias musculares congênitas

Grupo das DMCs por Voit and Tomé, 2004			
DMC com deficiência primária de merosina: - DMC tipo 1A	DMC associada a anormalidades de glicolisação da alfa-distroglicana: - DMC Fukuyama, - DMC <i>Muscle eye brain</i> - Síndrome <i>walker-walburg</i> - DMC1B - DMC tipo 1C - DMC tipo 1D	DMCs associada a contraturas articulares graves: - DMC tipo espinha rígida - DMC tipo Ulrich - DMC tipo Bethlem	DMC com deficiência primária ou secundária da integrina
Grupo das DMCs por Mendell, Boué and Martin, 2006			
Anormalidades das proteínas da matriz extracelular - LAMA2 - COL6A1 - COL6A2 - COL6A3	Anormalidades dos receptores de membrana da matrix extracelular - Fukutin, - POMGNT1 - POMT1 - POMT2 - FKRP - LARGE - ITGA7	Anormalidades de proteínas do retículo endoplasmático - SEPN1	

Fonte:^{23,24}

DMC= distrofia muscular congênita; LAMA2= *Laminin alpha 2 gene*; COL6A1= *Collagen type VI alpha 1 gene*; COL6A2 = *Collagen type VI alpha 2 gene*; COL6A3; *Collagen type VI alpha 3 gene*; POMGNT1= *Protein O-linked mannose beta1,2-N acetylglucosaminyltransferase gene*; POMT1= *Protein-O-mannosyltransferase 1 gene*; POMT2= *Protein-O-mannosyltransferase 2 gene*; FKRP= *Fukutin gene*; LARGE= *Like-glycosyltransferase gene*; ITGA7= *Integrin alpha 7 gene*; SEPN1= *selenoproteína N1 gene*.

2.4 Miopatias relacionadas à selenoproteína N

Este grupo foi recentemente reconhecido e consiste de miopatias relacionadas ao gene *SEPN1*, entre as quais se incluem a distrofia muscular congênita tipo espinha rígida (DMER), a miopatia multiminicore (DMm), a desminopatia com *mallory body* e a miopatia com desproporção congênita de fibras (MDCF)⁸⁻¹¹.

Em 1998, Moghadaszadeh *et al.* mapearam o gene da selenoproteína N (*SEPN1*) no cromossoma 1 e em 2001 identificaram as primeiras mutações no gene *SEPN1* em pacientes com DMER.²⁵

Após a descrição inicial, novas mutações foram descritas no gene *SEPN1* associadas à DMER e à DMm^{9,10}.

Em 2004, identificaram-se mutações no gene *SEPN1* em pacientes com desminopatia com *mallory body* e propuseram o reconhecimento de um grupo de miopatia relacionada à selenoproteína N no qual se incluíam três formas de doenças musculares autossômicas recessivas causadas por mutações no gene *SEPN1*, sendo elas: a DMER, a DMm e a desminopatia com *mallory body*⁹.

Em 2006 foram identificadas mutações nesse gene em paciente com MDCF e esta forma foi incluída como sendo a quarta miopatia associada ao gene *SEPN1*¹¹.

Apesar dessas quatro doenças musculares apresentarem algumas características semelhantes, são descritas na literatura como condições com fenótipos clínicos e histopatológicos distintos^{7,11}.

Antes de descrever as principais características dessas miopatias, será feita breve revisão sobre o gene *SEPN1* e seu produto gênico, a selenoproteína N.

2.5 Gene *SEPN1*

O gene da selenoproteína N (*SEPN1*) está localizado no braço curto do cromossoma 1, na posição 36.13 (*locus RSMD1*)⁸ (Figura 1A).

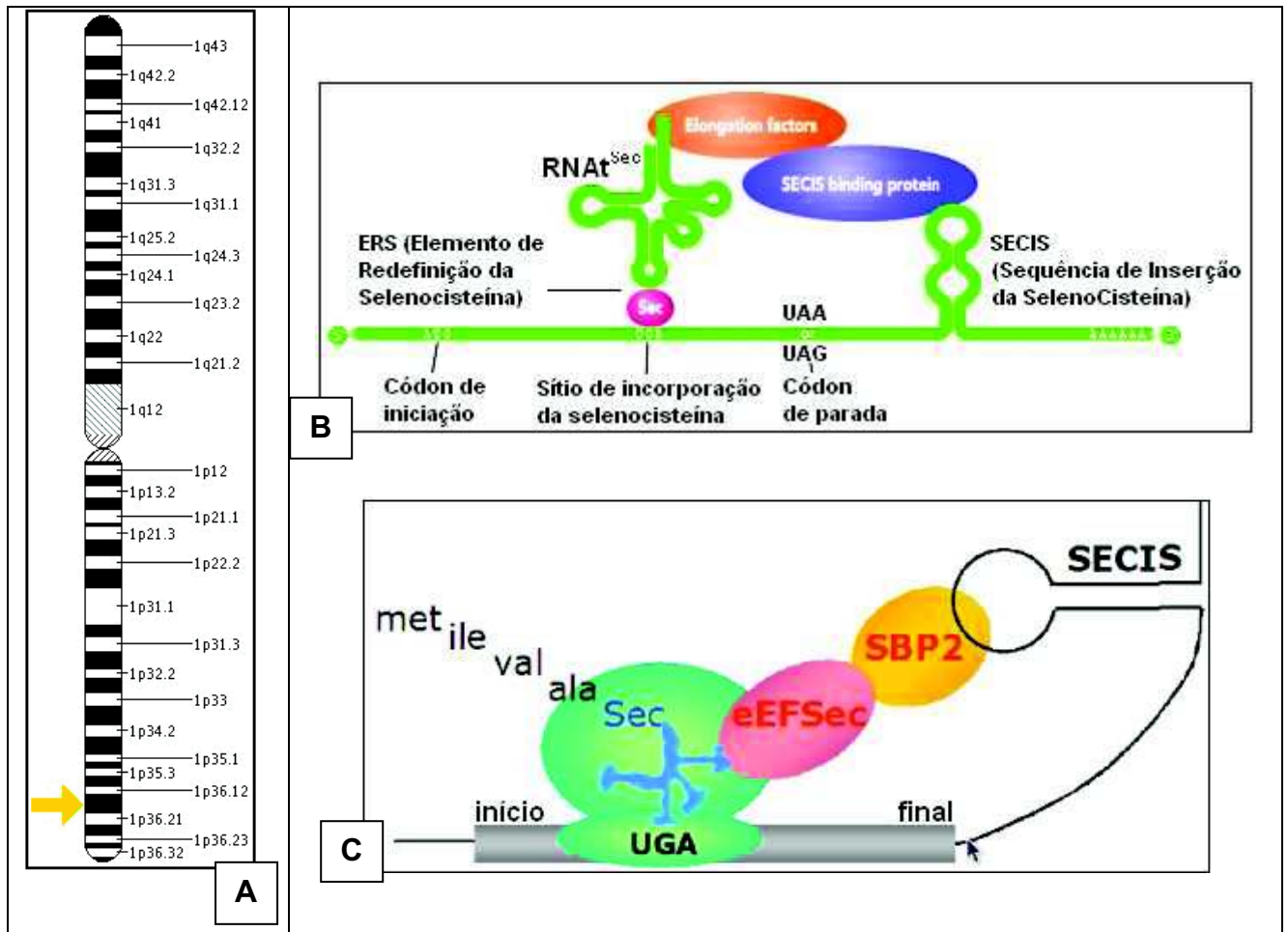


Figura 1 - Localização do gene *SEP1* no cromossoma 1 (A). Constituintes e mecanismo de inserção da SEC do gene *SEP1* (B e C).

Fonte: Adaptado^{7,31}.

Constituído de 13 éxons, o gene *SEP1* abrange uma região de 18.5 kb e seu transcrito é de 4.5 kb e codifica uma proteína de 590 aminoácidos, a qual se expressa principalmente no músculo-esquelético³⁷. O *selenium* é incorporado nas selenoproteínas como selenocisteínas³⁸.

A selenocisteína possui um sítio de atividade catalítica e é codificada por um códon UGA presente no éxon 10, localizado na região 1384 do ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA). O códon UGA geralmente constitui um códon de parada, porém para que seja reconhecido como um códon da selenocisteína, ele depende de estruturas secundárias presentes em sua constituição³⁴.

Tais estruturas correspondem ao elemento de redefinição da selenocisteína (ERS) localizado adjacente ao códon UGA no éxon 10 e a sequência de inserção

da selenocisteína (SECIS), que está localizado na região 3'UTR dos transcritos desse gene^{39,40} (Figura 1 B e C).

O ERS promove a incorporação da selenocisteína devido à redefinição do códon UGA durante a translação³³.

O elemento SECIS, assim como o ERS, é crucial para a inserção da selenocisteína ao códon UGA do éxon 10. Tal inserção ocorre a partir de um mecanismo complexo que envolve o recrutamento da proteína *Selenocysteine insertion sequence-binding protein 2* (SECISBP2), do fator de alongação da selenocisteína e do ácido ribonucleico transportador (RNAt) da selenocisteína^{29,33,41}.

Sendo assim, o gene *SEPN1* possui um códon de iniciação (ATG) presente no éxon 1, um códon de parada (TAG) presente no éxon 13, e apresenta o códon da selenocisteína (TGA) no éxon 10. Além do códon TGA que é redefinido em selenocisteína, o gene *SEPN1* também possui um segundo códon TGA no éxon 3, porém este não é lido como um códon da selenocisteína, pois não está envolvido nos mecanismos necessários para tal redefinição³⁴.

A partir de experimentos por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), conseguiu-se estabelecer a presença de duas isoformas da proteína *SEPN1*, sendo que a isoforma 1 corresponde a um transcrito de comprimento total, considerando que o éxon 3 está excluído na isoforma 2. Ambos transcritos foram detectados no músculo-esquelético, cerebral, pulmonar e na placenta, porém a isoforma 2 é sempre predominante⁸.

Portanto, presente ou não em seu transcrito, o éxon 3 corresponde a um *splice* alternativo e não participa da codificação da proteína³⁴.

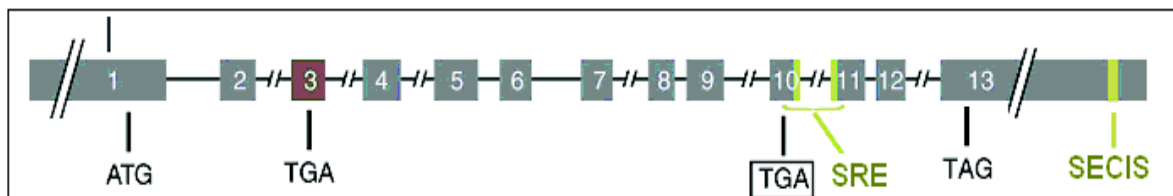


Figura 2 - Esquema representativo da localização dos éxons e principais constituintes do gene *SEPN*.

Fonte: Adaptado³⁴.

Cerca de 40 mutações patogênicas já foram descritas nos éxons 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 13 portanto, nota-se que os éxons 1, 10 e 11 apresentam um número maior de mutações^{9-11,26-35}. Das mutações já descritas na sequência codificante do gene *SEPN1*, a maioria delas são mutações sem sentido, microdeleções ou inserções³⁶.

Mutações sem sentido, que também afetam a incorporação eficiente da selenocisteína, já foram detectadas no elemento de redefinição da selenocistina e na sequência de inserção da selenocisteína na região 3'UTR do *SEPN1* (Figura 2)^{29,34}.

A primeira mutação na sequência de inserção da selenocisteína do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) da proteína foi detectada em um paciente com fenótipo de DMER²⁹. Tal mutação gerou significativa redução tanto nos níveis da proteína quanto do RNAm. Até então, todas as mutações patogênicas identificadas no gene *SEPN1* estavam localizadas na sequência codificante do gene *SEPN1*²⁹.

Além das patogênicas, outras diversas mutações consideradas como alelos variantes (polimorfismos) também têm sido descritas ao longo dos éxons desse gene (Quadro 3), exceto no éxon 3, visto que este corresponde a um *splice* alternativo e não participa da codificação da proteína^{8,29,34,42}.

Quadro 3 - Frequência de polimorfismos já descritos na literatura

Éxon	Nucleotídeo alterado	Frequência alélica (%)	Aminoácido alterado
4	c425 A→G	18	Y142C
7	c981 C→T	3	R327R
9	c1173 C→T	23	P391P
12	c1506 A→C	23	K502N

Fonte:²⁹.

2.6 Proteína SEPN1

As selenoproteínas pertencem a uma família de proteínas caracterizadas pela presença do 21º aminoácido, a selenocisteína (SEC), em sua estrutura primária. A selenocisteína representa a principal forma biológica do *selenium*^{41,43}.

A selenoproteína N (SEPN1) é codificada pelo gene *SEPN1* e é uma glicoproteína integral de membrana de 70 kDa localizada no retículo endoplasmático de diversos tecidos, incluindo pâncreas, fígado, coração, pulmão, cérebro e músculo-esquelético e que se expressa precocemente durante o desenvolvimento tecidual (Figura 3)^{8,36,42}.

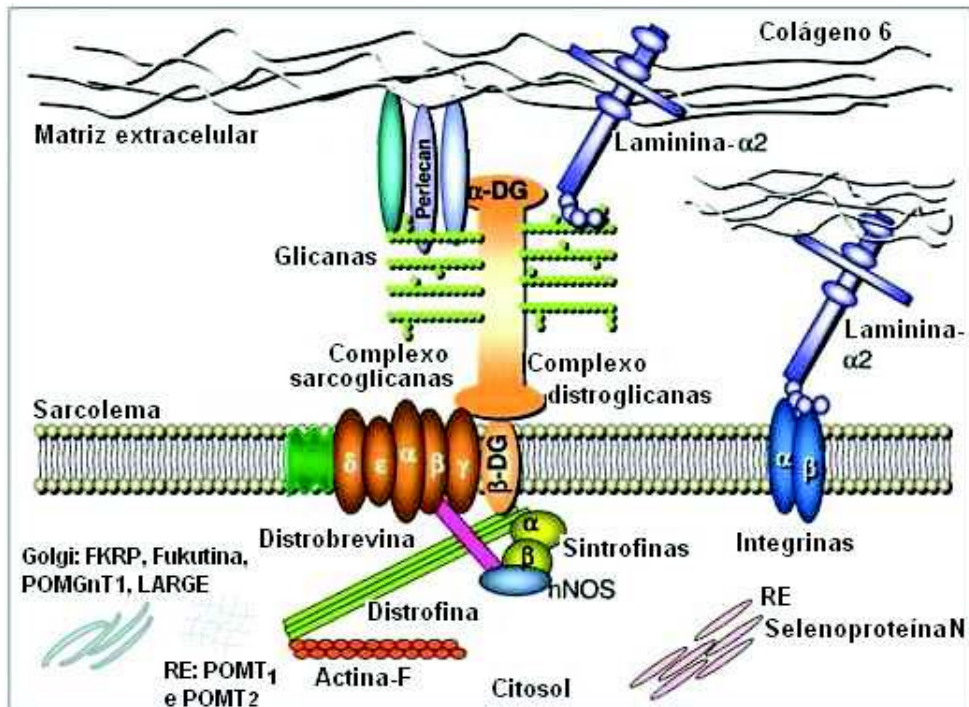


Figura 3 - Localização celular da selenoproteína N.

Fonte:⁶.

As selenoproteínas N foram os primeiros membros da família de selenoproteínas a serem associadas a doenças genéticas. Até então já foram identificadas em seres humanos aproximadamente 25 selenoproteínas. Destas, além da selenoproteína N, apenas a selenoproteína S (SEPS1) está relacionada a doenças genéticas. As selenoproteínas parecem possuir relações com as reações de oxidação e redução, porém ainda não existe conhecimento concreto sobre elas, nem mesmo a respeito da selenoproteína N^{7,36}.

Essa proteína parece possuir função enzimática, porém o seu papel na patogênese das doenças musculares ainda não é bem estabelecido. Estudos celulares recentes sugerem que células com deficiência de SEPN1 são mais suscetíveis ao estresse oxidativo^{8,44}.

Análises demonstraram que a selenoproteína N é uma glicoproteína do retículo endoplasmático altamente expressa em diversos tecidos fetais humanos, porém ela quase não é expressa em tecidos adultos. Destaca-se que a expressão desta proteína é essencial para o desenvolvimento de mamíferos⁴².

A selenoproteína N contém 590 aminoácidos e possui duas isoformas, a 1 e a 2. A isoforma 1 consiste em uma proteína de comprimento total, já na isoforma 2 a sequência referente à região do éxon 3 não está presente (Figura 4)^{8,34}.

As duas isoformas da proteína podem estar presentes, porém a isoforma 2 é sempre predominante, não havendo prejuízo da falta do produto do éxon 3, pois este corresponde a um *splice* alternativo e não participa da codificação da proteína^{8,34}.

10	20	30	40	50	60
MGRARPGQRG	PPSPGPAAQP	PAPPRRRARS	LALLGALLAA	AAAAAVRVCA	RHAFAQAAAR
70	80	90	100	110	120
QELALKTLGT	DGLFLFSSLD	TDGDMYISPĒ	EFKPIAEKLT	GSCSVTQTGV	QWCSHSSLQP
130	140	150	160	170	180
QLPWLNUSSC	LSLLRSTPAA	SCEEEELPPD	PSEETLTIEA	RFQPLLPETM	TKSKDGFLGV
190	200	210	220	230	240
SRLALSGLRN	WTAAASPSAV	FATRHFQPFLL	PPPGQELGEP	WWIIPSELSM	FTGYLSMNRFL
250	260	270	280	290	300
YPPPPKGKEV	IIHRLLSMFH	PRPFVKTRFA	PQGAVACLTA	ISDFYYTVMF	RIHAEFQLSE
310	320	330	340	350	360
PPDFPFWFSP	AQFTGHIILS	KDATHVRDFR	LFVPMHRSLN	VDMEWLYGAS	ESSNMEVDIG
370	380	390	400	410	420
YIPQMELEAT	GPSVPSVILD	EDGSMIDSHL	PSGEPLOQVVF	EEIKWQQLS	WEEAARRLEV
430	440	450	460	470	480
AMYPPKVSYS	LPFTEAFDRA	KAENKLVHSI	LLWALDDQS	CUGSGRTLRE	TVLESSPILT
490	500	510	520	530	540
LLNESFISTW	SLVKELEELQ	NKQENSSHQK	LAGLHLEKYS	FPVEMMICLP	NGTVVHHINA
550	560	570	580	590	
NYFLDITSVK	PEEIESNLFS	FSSTFEDPST	ATYMQFLKEG	LRRGLPLLQP	

Figura 4 - Isoforma 1 da selenoproteína N.

Na isoforma 2 a sequência marcada em vermelho não é codificada.

Fonte:²².

2.7 Distrofia muscular tipo espinha rígida

A distrofia muscular tipo espinha rígida (DMER) foi descrita pela primeira vez em 1973 por Dubowitz, sendo classificada no grupo das distrofias musculares congênitas⁴⁵. Essa doença é uma condição com herança autossômica recessiva caracterizada clinicamente como uma afecção de início na infância, com fraqueza muscular predominando em musculatura axial e limitação acentuada da

movimentação da coluna torácica e cervical. Observam-se contraturas em outras articulações tais como cotovelos e tornozelos. A doença apresenta, durante o seu curso, escoliose e insuficiência respiratória precoce e grave. A biópsia muscular desses pacientes revela proliferação de tecido muscular conjuntivo de grau variável, associada a alterações da citoarquitetura das fibras musculares que podem ser classificadas como *moth eaten* ou minicores, além de apresentarem imunomarcagem preservada para proteína merosina^{8,45}.

Esta foi a primeira forma de doença muscular relacionada ao gene *SEPN1*. Em 2001, foram identificadas as primeiras mutações no gene *SEPN1* em pacientes com DMER⁸. Os autores sugeriram que a selenoproteína N desempenha importante papel na fisiologia dos músculos-esqueléticos e no diafragma, mantendo o estado de de oxirredução no tecido muscular³⁶.

Posteriormente, vários outros autores também identificaram mutações no gene *SEPN1* como responsáveis pela DMER em seus pacientes estudados^{10,26-35}.

Ressalta-se, ainda, que se registraram várias famílias com características de síndrome da espinha rígida, que não demonstraram ligação com o cromossoma 1p36. Destacou-se que a espinha rígida ocorre em várias miopatias distintas, pois a limitação da flexão da coluna pode se desenvolver por causa da substituição dos músculos extensores da coluna vertebral por tecido fibroso e gorduroso, resultando no seu encurtamento⁴⁶⁻⁴⁸. Entre as miopatias que cursam com rigidez cervical, citam-se distrofia muscular tipo *Emery-Dreifuss*, atrofia muscular neurogênica, distrofia fácios-ecapuloperoneal, miopatia nemalínica, miopatia minicore, entre outras^{49,50}.

Tais observações sugerem que a rigidez cervical é um achado inespecífico e que a DMER pode estar associada a provável heterogeneidade genética, porém até o presente momento não há relatos de mutações em outros genes associados a essa forma de miopatia^{8,25}.

Entre os exames complementares indicados para a investigação diagnóstica da DMER, destacam-se a dosagem de enzimas musculares e a eletroneuromiografia (ENMG). Entre as enzimas musculares, a creatinofosfoquinase (CPK) apresenta valores normais ou elevação de até duas vezes o valor de referência ou limítrofe. A ENMG pode ser normal em pacientes

jovens ou naqueles pouco afetados. No entanto, na maioria dos casos encontra-se um padrão miopático^{8,22,51}.

2.8 Miopatia multiminicore

A miopatia multiminicore foi descrita pela primeira vez em 1971 por Engel *et al.* e foi a segunda forma de miopatia relacionada ao gene *SEPN1*⁵².

A miopatia multiminicore é uma desordem muscular associada à herança autossômica recessiva, de início precoce, caracterizada pela história de fraqueza e hipotonia nos primeiros anos de vida. À biópsia muscular, podem ser evidenciados múltiplos *cores*, além de evidências de minicores, que são pequenas áreas de desorganização sarcomérica e depleção de mitocôndrias. Essas áreas apresentam reatividade diminuída nas reações histoquímicas oxidativas associadas ao predomínio de fibras tipo I^{10,52}

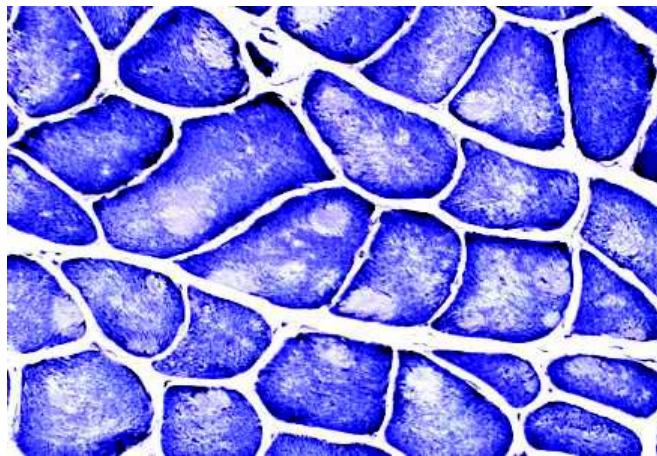


Figura 5 - Reação histológica nicotinamida adenine dinucleotídeo (NADH) apresentando múltiplos *cores*.

Fonte:⁵³.

Apesar dos minicores serem uma característica específica da miopatia multiminicore, já foram encontrados em alguns pacientes com outros defeitos moleculares e até em pacientes nos quais nenhum defeito genético foi identificado^{4,54}.

Em 2002 foram descritas nove mutações no gene *SEPN1* associadas a pacientes europeus portadores de miopatia multiminicore¹⁰. Destas, três já haviam

sido relatadas em pacientes com distrofia muscular congênita tipo espinha rígida⁸ (Quadro 4).

Quadro 4 - Mutações no gene *SEPN1* em pacientes com miopatia multiminicore

Família	Nº de crianças afetadas	Origem	Consanguinidade	Éxon	Mudança de nucleotídeo	Mudança do aminoácido
F1	1	Alemanha	Sim	1	22dup10bp	Frameshift-Q8
F2	4	Itália	Não	1	1A→G	Desconhecida
F3		Bélgica				
F4		Alemanha	Sim			
F5	1	França	Não	5	713-714insA	Frameshift-N238
F6	1	França	Não	5	713-714insA*	Frameshift-N238
				11	1397G→A*	R466Q
F7	2	Bélgica	Não	7	943G→A	G315S
F8	2	Reino Unido				
F9	1	Alemanha	Não	7	943G→A*	G315S
				11	1397G→A*	R466Q
F10	2	França	Não	7	878A→G*	H293R
				8	1019A→T*	N340I
F11	2	Portugal	Não	10	1384T→G	U462G
F12	1	França	Não	10	1358G→C*	W453S
				11	1397G→A*	R466Q

* = heterozigose

Fonte:¹⁰.

Naquela ocasião, Ferreiro *et al.* concluíram que das 20 mutações identificadas no gene da *SEPN1* já descritas, aproximadamente a metade havia sido identificada em pacientes com a forma clássica da miopatia multiminicore¹⁰.

É importante ressaltar que essa miopatia apresenta marcante heterogeneidade fenotípica, que permite a identificação de formas clínicas distintas. São reconhecidas quatro formas da doença:

- Forma clássica: é a mais prevalente, caracterizada pela predominância de fraqueza muscular axial e em dois terços dos pacientes leva ao desenvolvimento precoce de insuficiência respiratória e escoliose grave^{10,55}.
- Forma moderada com envolvimento das mãos: consiste de fraqueza muscular generalizada que afeta predominantemente a cintura pélvica e inclui a fraqueza da mão, amiotrofia e hiperfrouxidão; escoliose e envolvimento respiratórios são leves ou ausentes^{10,55}.

- Forma com oftalmoplegia: é caracterizada por quadro clínico semelhante ao da forma clássica, porém com oftalmoplegia^{55,57}.
- Forma pré-natal com artrogripose: esta é a forma mais rara, que se caracteriza pelo início pré-natal^{55,58,59}.

Além da variabilidade clínica, a doença multiminicore também é geneticamente heterogênea, tendo sido relacionada a mutações recessivas tanto ao gene da *SEPN1* quanto aos genes *RYR1*, *TITIN*, *SCAD* e *SECISBPS*^{4,10,18-20,22,55}.

Apesar das correlações genótipo-fenótipos ainda não estarem completamente estabelecidas, algumas considerações podem ser feitas. Pacientes com mutações no gene *RYR1* apresentam comprometimento da musculatura extraocular, susceptibilidade à hipertermia maligna e, à biópsia muscular, evidenciam-se *cores* grandes e múltiplos associados ao predomínio de fibras do tipo I. Os pacientes com mutações no gene *SEPN1* apresentam escoliose grave e progressiva associada e distúrbios respiratórios que requerem suporte ventilatório precoce, rigidez cervical e a biópsia muscular revela *cores* pequenos e múltiplos^{4,10,60}. Essas características estão ressaltadas no Quadro 5. Os pacientes com miocardiopatia apresentam mutações no gene *TTN* e no gene *SCAD*. Além do envolvimento cardíaco, mutações no gene *SCAD* também estão associadas ao envolvimento ocular, causando oftalmoplegia¹⁸⁻²⁰.

Os exames complementares revelam CPK em níveis normais ou levemente aumentadas (até 20% do valor normal), enquanto que na ENMG verifica-se o padrão miopático na maioria dos pacientes, porém pode mostrar-se normal em pacientes jovens ou naqueles pouco afetados^{22,55,58,59}.

Quadro 5 - Características clínicas e histopatológicas correlacionadas aos genes *SEPN1* e *RYR1* na miopatia muscular congênita multiminicore (DMm)

Características Clínicas	MmD relacionada à <i>SEPN1</i>	MmD relacionada ao <i>RYR1</i>
Envolvimento extraocular	Característica não relatada	Característica comum
Envolvimento bulbar	Característica relatada	Característica relatada
Envolvimento respiratório	Característica muito comum	Característica relatada
Escoliose	Característica muito comum	Característica comum
Suceptibilidade à hipertremia maligna	Característica não relatada	Característica relatada
Características histopatológicas	MmD relacionada à <i>SEPN1</i>	MmD relacionada ao <i>RYR1</i>
Uniformidade/predominância de fibras tipo I	Característica relatada	Característica muito comum
Aumento do núcleo interno	Característica relatada	Característica muito comum
Múltiplos <i>cores</i> grandes (multicores)	Característica relatada	Característica muito comum
Numerosos <i>cores</i> pequenos (minicores)	Característica muito comum	Característica relatada

Fonte:⁵³.

2.9 Desminopatia

A desminopatia, também conhecida como miopatia relacionada à desmina, apresenta acometimento cardíaco e esquelético e tem herança predominantemente autossômica dominante e mais raramente autossômica recessiva^{61,62}. Alguns casos de mutação de novo também foram descritos⁶³.

Essa miopatia pertence a um grupo heterogêneo de desordens musculares, morfologicamente caracterizados pelo acúmulo de agregados intrassarcoplasmáticos de desmina no tecido muscular⁹.

A desminopatia possui heterogeneidade genética, já tendo sido associadas a ela mutações no gene da desmina (*DES*), no gene *alfa-β-cristalin* (*CRYAB*) e no gene *SEPN1*^{62,64}.

Aproximadamente um terço dos casos relatados a essa forma de miopatia está relacionado a mutações no gene *DES* e no gene *CRYAB*^{62,65}.

Em 2004 o gene da *SEPN1* foi relacionado a essa forma de miopatia em pacientes com herança autossômica recessiva⁹.

Os autores suspeitaram da relação da desminopatia com o gene *SEPN1* após a reavaliação da biópsia muscular de dois irmãos sabidamente portadores de uma mutação sem sentido no gene *SEPN1*^{9,10}. Tal reavaliação revelou a inesperada presença de inclusões de *mallory body* juntamente com o relato de acúmulo de desmina e alfa- β -cristalin⁹.

Em seguida, o mesmo grupo descreveu uma mutação nova em uma família alemã com características fenotípicas e histopatológicas de desminopatia (c19-73del92). Posteriormente, esta mesma mutação foi associada a fenótipos diferentes de miopatias relacionadas ao *SEPN1*^{11,35}.

2.10 Miopatia congênita com desproporção de fibras

A miopatia congênita com desproporção de fibras (MCDF) é desordem muscular com herança predominantemente autossômica recessiva caracterizada por fraqueza e hipotonia desde os primeiros anos de vida. Geralmente, a fraqueza muscular é proximal nos membros, podendo haver comprometimento da musculatura facial (42% dos pacientes), oftalmoplegia (19% dos casos), escoliose e contraturas articulares. À biópsia muscular, geralmente são evidenciados sinais de hipotrofia de fibras tipo I, em que o diâmetro das fibras tipo I deve ser pelo menos 12% inferior ao das fibras tipo II. Na análise histopatológica muscular, devem-se excluir sinais de distrofia muscular na biópsia ou outras formas de miopatias^{11,66-68}.

Considerando o defeito primário, ressalta-se que a MCDF apresenta heterogeneidade genética, já tendo sido associada a mutações aos seguintes genes: *SEPN1*, *ACTA1*, *TPM3* e *CFTD2*^{11,21,22,69}.

O primeiro gene a ser associado a essa forma de miopatia congênita foi o gene da actina, o *ACTA1*. Os autores relataram que apenas reduzido percentual dos casos estava associado a este gene, indicando heterogeneidade genética⁶⁹.

Em 2006, foi identificada, entre outras, uma mutação no gene *SEPN1*¹¹ que já havia sido previamente associada à miopatia multiminicore⁹. Em seu estudo,

Clarke *et al.* encontraram a mutação c943G→A (pG315S) em duas famílias aparentadas com duas e três crianças com MCDF^{9,11}.

Mutações no gene da *SEPN1* foram descritas como sendo a segunda causa genética conhecida da miopatia por desproporção congênita de fibras¹¹.

Porém, em 2008 foram detectadas cinco diferentes mutações no gene *TPM3* como sendo responsáveis pelo fenótipo de miopatia com desproporção congênita de fibras em 26 pacientes. Após tal identificação, mutações no gene *TPM3* vêm sendo consideradas a causa genética mais comum dessa miopatia²¹.

A dosagem da enzima muscular CPK, assim como nas outras miopatias relacionadas ao gene *SEPN1*, pode apresentar valores normais ou elevação de até três vezes o valor de referência. A ENMG pode ser normal em pacientes jovens ou naqueles pouco afetados, porém, na maioria deles, um padrão miopático é evidenciado e, mais raramente, alguns pacientes podem apresentar achados neurogênicos^{8,51,55}.

Em conclusão, observa-se que as miopatias relacionadas à seleproteína N, consistem de um grupo heterogêneo de miopatias e distrofias congênitas. O fenótipo clínico é variável assim como os achados histopatológicos. Atualmente, cerca de 40 mutações já foram identificadas entre a sequência codificante do gene da *SEPN1* e a sequência de inserção da selenocisteína (SECIS). Além disso, cerca de 180 pacientes apresentando mutações no gene da *SEPN1* já foram identificados em todo o mundo, sendo a maioria na Europa, sugerindo que não se trata de uma doença tão rara. No Quadro 6 encontra-se uma compilação de todas as mutações descritas até o presente momento.^{10,11,26-36}

Quadro 6 - Relação de mutações descritas no gene *SEPN1*

Nº	Éxon	Mudança de Nucleotídeo	Mudança de aminoácido	Homozigose-Heterozigose	Nº de pacientes
1	1	c1A→G	Desconhecido	Homozigose	(4) ¹⁰
2	1	c1-2 ins T	Desconhecido	Homozigose	(1) ²⁸
3	1	c12_21dup10	Frameshift	Homozigose	(1) ³⁰
4	1	c13-22dup10	pQ8P - FSX77	Heterozigose: c48-51del99	(1) ³⁵
5	1	c1NV13-2:A→G		Heterozigose: c878A→G	(1) ¹¹
6	1	c19-73del92	Perda do códon de iniciação (ATG)	Homozigose	(3) ⁹
				Heterozigose: c1176delA	(1) ³⁵
				Heterozigose: c1A→G	(1) ¹¹
7	1	c22dup10bp	Frameshift at G7	Homozigose	(4) ⁸
				Homozigose	(1) ¹⁰
8	1	c-48-+51del99	Perda da 1º metionina	Heterozigose: c13-22dup10	(1) ³⁵
9	1	c80-99dup20bp	Frameshift at R27	Homozigose	(1) ²⁸
10	1	c23_32dup	pP12TfsX85	Homozigose	(1) ¹¹
11	1	c25_69del	Desconhecido	Heterozigose: c1388G→T	(1) ³³
12	1	c8_12dup	pR5GfsX63	-----	(--) ³⁴
13	1	c2dupT	Desconhecido	-----	(--) ³⁴
14	1	c69_76dup	pR26HfsX43	-----	(--) ³⁴
15	5	c583G→A	pA195T	-----	(--) ³⁴
16	5	c713-714 insA	Frameshift at N238	Homozigose	(1) ¹⁰
			Frameshift at N238	Heterozigose: c1397G→A	(1) ¹⁰
			Frameshift at N238	Heterozigose: c1370C→T	(1) ²⁶
			Frameshift	Heterozigose: missing	(2) ³⁰
			frameshift	Heterozigose: c943G→A	(1) ³⁰
17	6	c817G→A	pG273R	Homozigose	(6) ⁸
				Homozigose	(3) ³⁰
18	6	c863-864delTG	Frameshift	Heterozigose: c1469G→T	(1) ³⁰
19	7	c878A→G	pH293R	Heterozigose: c1397G→A	(2) ⁸
				Heterozigose: c1019A→T	(2) ¹⁰
				Heterozigose: c1NV13-2:A→G	(1) ¹¹
20	7	c943G→A	pG315S	Homozigose	(4) ¹⁰
				Heterozigose: c1397G→A	(1) ¹⁰
				Heterozigose: c713-714insA	(2) ³⁰
				Heterozigose: c1315C→T	(1) ³⁰
				Homozigose	(5) ¹¹
21	8	c1019 A→T	pN340I	Heterozigose: c878A→G	(2) ¹⁰
22	9	c1176delA	-----	Heterozigose: c19_73del92	(1) ³⁵
23	10	1385G→A	pU462stop	Homozigose	(1) ⁸
24	10	c1315C→T	pR439 stop	Heterozigose: c943G→A	(2) ³⁰

Continua Quadro 6

25	10	c1358G→C	pW453S	Heterozigose: c1397G→A	(1) ¹⁰
26	10	c1370C→T	pR439stop	Heterozigose: c713-714insA	(1) ²⁶
27	10	c1384T→G	pU462G	Homozigose	(2) ¹⁰
28	10	c1282-2A→G	aberrant splicing	-----	(--) ³⁴
29	11*	c1388-2A→G	Desconhecido	-----	(--) ³⁴
30	11*	c1388-1G→C			(2) ³⁵
31	11	c1397G→A	pR466Q	Heterozigose: c878A→G	(1) ⁸
				Heterozigose: c1358G→C	(1) ¹⁰
				Heterozigose: c943G→A	(1) ¹⁰
				Heterozigose: c713-714insA	(1) ¹⁰
				Heterozigose: c713-714insA	(1) ³⁰
				Homozigose	(1) ³²
				Heterozigose: c713-714insA	(3) ³³
				Heterozigose: c943G→A	(3) ³³
32	11(SRE)	c1388G→T	pG463V	Heterozigose: c1-25_69Del	(1) ³³
33	11(SRE)	c1405C→T	pR469W	Homozigose	(1) ³³
34	11(SRE)	c1406G→A	pR469Q	Homozigose	(2) ³³
35	11	c1446delC	Frameshift at L482	-----	(1) ⁸
36	11	c1469G→T	pW490L	Heterozigose:c863_864delTG	(1) ³⁰
37	13*	c1603-2A→G	Desconhecido	-----	(--) ³⁴
38	SECIS	c1207T→C	-----	-----	(--) ³⁴
39	3'UTR	g.17195T→C	Inserção:SECIS	Homozigose	(2) ²⁹

Fonte: ^{8,10,11,26-30-34}

Referências

1. Emery AE. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases: a world survey. *Neuromuscular Disorders* 1991; 1(1):19-29.
2. MacDonald CM. Physical activity, health impairments, and disability in neuromuscular disease. *Journal of American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation* 2002; 81(11):108-120.
3. Carvalho AA. Myopathies. *Revista de Neurociências* 2005 jul/set; 13(3 supl-versão eletrônica),
4. Sewry CA, Jimenez-Mallebrera C, Muntoni F. Congenital myopathies. *Current Opinion in Neurology* 2008; 21(5):569-575.
5. Laing NG. Congenital myopathies. *Current Opinion in Neurology* 2007; 20(5):583-589.
6. Reed UC. Congenital muscular dystrophy. Part I: a review of phenotypical and diagnostic aspects. *Arquivos de Neuropsiquiatria* 2009; 67(1):144-168.
7. Moghadaszadeh B, Beggs AH. Selenoproteins and their impact on human health through diverse physiological pathways. *Physiology (Bethesda)* 2006 Oct; 21:307-15.

8. Moghadazadeh B, Petit N, Jaillard C, Brockington M, Roy SQ, Merlini L, *et al.* Mutations in *SEPN1* cause congenital muscular dystrophy with spinal rigidity and restrictive respiratory syndrome. *Nat Genet* 2001, 29:17-18.
9. Ferreira A, Ceuterick de Groote C, Marks JJ, Goemans N, Schreiber G, Hanefeld F, *et al.* Desmin-related myopathy with Mallory body-like inclusions is caused by mutations of the selenoprotein N gene. *Ann Neurol* 2004; 55 (5):676-86.
10. Ferreira A, Quijano Roy S, Pichereau C, Moghadazadeh B, Goemans N, Bonnemann C, *et al.* Mutations of the selenoprotein N gene, which is implicated in rigid spine muscular dystrophy, cause the classical phenotype of multiminicore disease: reassessing the nosology of early-onset myopathies. *Am J Hum Genet* 2002, 71: 739-749.
11. Clarke NF, Kidson W, Quijano-Roy S, Estounet B, Ferreira A, Guicheney P, *et al.* *SEPN1*: associated with congenital fiber-type disproportion and insulin resistance. *Ann Neurol* 2006 Mar; 59 (3):546-52.
12. Wallgren-Pettersson, 1990, *apud* Jungbluth H. Multi-minicore disease. *Orphanet J Rare Dis* 2007 Jul; 13(2):31.
13. Magge KR, Shy GM. A new congenital non-progressive myopathy. *Brain* 1956 Dec; 79(4):610-21.
14. Goebel HH, Fidzianska A. Classification of congenital myopathies. *In*: Lane RJM. ed. *Handbook of muscle disease*, New York, Marcel Dekker, 1996: 165-175.
15. Dubowitz V. The congenital myopathies. *In*: *Muscle disorders in childhood*. 2. ed., London. Saunders, 1995: 134-176.
16. Reed UC. Congenital muscular dystrophy. Part II: a review of pathogenesis and therapeutic perspectives. *Arq Neuropsiquiatr* 2009; 67 (2-A): 343 -362.
17. North K. Wath's new in congenital myopathies. *Neuromuscular Disorders* 2008; 18 (6):433-442.
18. Carmignac V, Salih MA, Quijano-Roy S, Marchand S, Al Rayess MM, Mukhtar MM, *et al.* C-terminal titin deletions cause a novel early-onset myopathy with fatal cardiomyopathy. *Ann Neurol* 2007 Apr; 61(4):340-51.
19. Tein I, Elpeleg O, Ben-Zeev B, Korman SH, Lossos A, Lev D, *et al.* Short-chain acyl-CoA dehydrogenase gene mutation (c.319C>T) presents with clinical heterogeneity and is candidate founder mutation in individuals of Ashkenazi Jewish origin. *Mol Genet Metab* 2008 Feb; 93(2):179-89.
20. Tein I, Haslam RH, Rhead WJ, Bennett MJ, Becker LE, Vockley J. Short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: a cause of ophthalmoplegia and multicore myopathy. *Neurology* 1999 Jan 15; 52(2):366-72.

21. Clarke NF, Kolski H, Dye DE, Lim E, Smith RL, Patel R, *et al.* Mutations in TPM3 are a common cause of congenital fiber type disproportion. *Ann Neurol* 2008, 63(3):329-37.
22. PubMed. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: abril de 2011.
23. Voit T, Tome FM. The congenital muscular dystrophies. Engel AG, Franzini-Armstrong C. *Myology - basic and clinical*. Edition 3. New York: McGraw-Hill-Medical Publishing Division, 2004:1203-1238.
24. Mendell JR, Boué DR, Martin PT. The congenital muscular dystrophies: recent advances and molecular insights. *Pediatr Dev Pathol* 2006 Nov-Dec; 9(6):427-43.
25. Moghadaszadeh B, Desguerre I, Topaloglu H, Muntoni F, Pavsek S, Sewry C, *et al.* Identification of a new *locus* for a peculiar form of congenital muscular dystrophy with early rigidity of the spine, on chromosome 1p35-36. *Am J Hum Genet* 1998 Jun; 62(6):1439-45.
26. Tajsharghi H, Darin N, Tulinius M, Oldfors A. Early onset myopathy with a novel mutation in the Selenoprotein N gene (*SEPN1*). *Neuromuscul Disord* 2005 Apr; 15(4):299-302.
27. Venance SL, Koopman WJ, Miskie BA, Hegele RA, Hahn AF. Rigid spine muscular dystrophy due to *SEPN1* mutation presenting as cor pulmonale. *Neurology* 2005 Jan 25; 64(2):395-6.
28. Okamoto Y, Takashima H, Higuchi I, Matsuyama W, Suehara M, Nishihira Y, *et al.* Molecular mechanism of rigid spine with muscular dystrophy type 1 caused by novel mutations of selenoprotein N gene. *Neurogenetics* 2006 Jul; 7(3):175-83.
29. Allamand V, Richard P, Lescure A, Ledeuil C, Desjardin D, Petit N, *et al.* A single homozygous point mutation in a 3'untranslated region motif of selenoprotein N mRNA causes *SEPN1*-related myopathy. *EMBO Reports* 2006; 7(4):450-4.
30. Schara U, Kress W, Bönnemann CG, Breitbach-Faller N, Korenke CG, Schreiber G, *et al.* The phenotype and long-term follow-up in 11 patients with juvenile selenoprotein N1-related myopathy. *Eur J Paediatr Neurol* 2008 May; 12(3):224-30.
31. Treves S, Jungbluth H, Muntoni F, Zorzato F. Congenital muscle disorders with cores: the ryanodine receptor calcium channel paradigm. *Curr Opin Pharmacol* 2008 Jun; 8(3):319-26.
32. Peat RA, Smith JM, Compton AG, Baker NL, Pace RA, Burkin DJ, *et al.* Diagnosis and etiology of congenital muscular dystrophy. *Neurology* 2008 Jul 29; 71(5):312-21.
33. Maiti B, Arbogast S, Allamand V, Moyle MW, Anderson CB, Richard P, *et al.* A mutation in the *SEPN1* selenocysteine redefinition element (SRE) reduces

selenocysteine incorporation and leads to SEPN1-related myopathy. *Hum Mutat* 2009 Mar; 30(3):411-6.

34. Lescure A, Rederstorff M, Krol A, Guicheney P, Allamand V. Selenoprotein function and muscle disease. *Biochim Biophys Acta* 2009 Nov; 1790(11):1569-74.

35. Cagliani R, Fruguglietti ME, Berardinelli A, D'Angelo MG, Prella A, Riva S, *et al.* New molecular findings in congenital myopathies due to selenoprotein N gene mutations. *J Neurol Sci* 2011 Jan 15; 300(1-2):107-13.

36. Arbogast S, Ferreiro A. Selenoprotein and protection against oxidative stress: selenoprotein N as a novel player at the crossroads of redox signaling and calcium homeostasis. *Antioxid Redox Signal* 2010; 12(7):893-904.

37. Lescure A, Gautheret D, Carbon P, Krol A. Novel selenoproteins identified in silico and in vivo by using a conserved RNA structural motif. *J Biol Chem* 1999 Dec 31; 274(53):38147-54.

38. Lescure A, Fagegaltier D, Carbon P, Krol A. Protein factors mediating selenoprotein synthesis. *Curr Protein Pept Sci* 2002 Feb; 3(1):143-51.

39. Berry MJ, Banu L, Harney JW, Larsen PR. Functional characterization of the eukaryotic SECIS elements which direct selenocysteine insertion at UGA codons. *EMBO J.* 1993 Aug;12(8):3315-22.

40. Gu QP, Beilstein MA, Vendeland SC, Lugade A, Ream W, Whanger PD. Conserved features of selenocysteine insertion sequence (SECIS) elements in selenoprotein W cDNAs from five species. *Gene.* 1997 Jul 9; 193(2):187-96.

41. Schoenmakers E, Agostini M, Mitchell C, Schoenmakers N, Papp L, Rajanayagam O, *et al.* Mutations in the selenocysteine insertion sequence-binding protein 2 gene lead to a multisystem selenoprotein deficiency disorder in humans. *J Clin Invest* 2010 Dec 1; 120(12):4220-35.

42. Petit N, Lescure A, Rederstorff M, Krol A, Moghadaszadeh B, Wewer UM, *et al.* Selenoprotein N: an endoplasmic reticulum glycoprotein with an early developmental expression pattern. *Hum Mol Genet* 2003 May 1;12(9):1045-53.

43. Rederstorff M, Krol A, Lescure A. Understanding the importance of *selenium* and selenoproteins in muscle function. *Cell Mol Life Sci* 2006 Jan; 63(1):52-9.

44. Arbogast S, Beuvin M, Fraysse B, Zhou H, Muntoni F, Ferreiro A. Oxidative stress in SEPN1-related myopathy: from pathophysiology to treatment. *Ann Neurol* 2009 Jun; 65(6):677-86.

45. Dubowitz V. Rigid spine syndrome: a muscle syndrome in search of a name. *Proc R Soc Med* 1973; 66(3):219-20.

46. Poewe W, Willeit H, Sluga E, Mayr U, 1985 *apud* Moghadaszadeh B, Desguerre I, Topaloglu H, Muntoni F, Pavsek S, Sewry C, *et al.* Identification of a new *locus* for

a peculiar form of congenital muscular dystrophy with early rigidity of the spine, on chromosome 1p35-36. *Am J Hum Genet* 1998 Jun; 62(6).

47. Van Munster ETL, Joosten EMG, van Munster-Uijtdehaage MAM, Kruls HJA, Ter Laak HJ, 1986 *apud* Moghadaszadeh B, Desguerre I, Topaloglu H, Muntoni F, Pavsek S, Sewry C, *et al.* Identification of a new *locus* for a peculiar form of congenital muscular dystrophy with early rigidity of the spine, on chromosome 1p35-36. *Am J Hum Genet* 1998 Jun; 62(6).

48. Merlini L, Granata C, Ballestrazzi A, Marini ML, 1989 *apud* Moghadaszadeh B, Desguerre I, Topaloglu H, Muntoni F, Pavsek S, Sewry C, *et al.* Identification of a new *locus* for a peculiar form of congenital muscular dystrophy with early rigidity of the spine, on chromosome 1p35-36. *Am J Hum Genet* 1998 Jun; 62(6).

49. Palmucci L, Mongini T, Doriguzzi C, Maniscalco M, Schiffer D, 1991 *apud* Moghadaszadeh B, Desguerre I, Topaloglu H, Muntoni F, Pavsek S, Sewry C, *et al.* Identification of a new *locus* for a peculiar form of congenital muscular dystrophy with early rigidity of the spine, on chromosome 1p35-36. *Am J Hum Genet* 1998 Jun; 62(6).

50. Topaloglu, Gosgus S, Yalaz K, Kulkali T, Serdaroglu A 1994 *apud* Moghadaszadeh B, Desguerre I, Topaloglu H, Muntoni F, Pavsek S, Sewry C, *et al.* Identification of a new *locus* for a peculiar form of congenital muscular dystrophy with early rigidity of the spine, on chromosome 1p35-36. *Am J Hum Genet* 1998 Jun; 62(6).

51. Muntoni F, Voit T. The congenital muscular dystrophies in 2004: a century of exciting progress. *Neuromuscul Disord* 2004 Oct; 14(10):635-49.

52. Engel AG, Gomez MR, Groover RV. Multicore disease. A recently recognized congenital myopathy associated with multifocal degeneration of muscle fibers. *Mayo Clin Proc* 1971 Oct; 46(10):666-81.

53. Jungbluth H. Multi-minicore disease. *Orphanet J Rare Dis* 2007 Jul; 13(2):31.

54. Jimenez-Mallebrera C, Zhou H, Manzur A. Core myopathy without mutations in the *ryr1* or *sepn1* genes. *Neuromuscul Disord* 2007; 17:883.

55. *Gene Tests*. Disponível em: <http://www.genetests.org>. Acesso em: fevereiro de 2011.

56. Jungbluth H, Zhou H, Hartley L, Halliger-Keller B, Messina S, Longman C, *et al.* Minicore myopathy with ophthalmoplegia caused by mutations in the ryanodine receptor type 1 gene. *Neurology* 2005 Dec 27; 65(12):1930-5.

57. Jungbluth H, Sewry C, Brown SC, Manzur AY, Mercuri E, Bushby K, Rowe P *et al.* Minicore myopathy in children: a clinical and histopathological study of 19 cases. *Neuromuscul Disord* 2000 Jun; 10(4-5):264-73.

58. Ferreira A, Estournet B, Chateau D, Romero NB, Laroche C, Odent S, Toutain A, *et al.*. Multi-minicore disease—searching for boundaries: phenotype analysis of 38 cases. *Ann Neurol* 2000 Nov; 48(5):745-57.
59. Nucci A, Queiroz LS, Zambelli HJ, Martins Filho J. Multi-minicore disease revisited. *Arq Neuropsiquiatr* 2004 Dec; 62(4):935-9.
60. Zorzato F, Jungbluth H, Zhou H, Muntoni F, Treves S. Functional effects of mutations identified in patients with multiminicore disease. *IUBMB Life* 2007 Jan; 59(1):14-20.
61. Goldfarb LG, Dalakas MC. Tragedy in a heartbeat: malfunctioning desmin causes skeletal and cardiac muscle disease. *J Clin Invest* 2009 Jul; 119(7):1806-13.
62. Goldfarb LG, Park KY, Cervenáková L, Gorokhova S, Lee HS, Vasconcelos O, *et al.* Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy. *Nat Genet* 1998 Aug; 19(4):402-3.
63. Van Spaendonck-Zwarts K, van Hessem L, Jongbloed JD, de Walle HE, Capetanaki Y, van der Kooi AJ, *et al.* Desmin-related myopathy: a review and meta-analysis. *Clin Genet* 2010 Jul 21.
64. Rappaport L, Contard F, Samuel JL, Delcayre C, Marotte F, Tomè F, *et al.* Storage of phosphorylated desmin in a familial myopathy. *FEBS Lett.* 1988 Apr 25;231(2):421-5.
65. Fardeau M, Godet-Guillain J, Tome FM, Collin H, Gaudeau S, Boffety C, *et al.* A new familial muscular disorder demonstrated by the intra-sarcoplasmic accumulation of a granulo-filamentous material which is dense on electron microscopy (author's transl). *Rev Neurol (Paris)* 1978 Jun-Jul; 134(6-7):411-25.
66. Brooke MH. Congenital fiber type disproportion. *In*: Kakulas BA (ed) *Clinical studies in myology. Proceedings of the 2nd International Congress on Muscle Diseases, held in Perth, Australia, Nov. 22-29, 1971.* *Experta Medica* 147-59, 1973.
67. Cavanagh NP, Lake BD, McMeniman P. Congenital fibre type disproportion myopathy. A histological diagnosis with an uncertain clinical outlook. *Arch Dis Child.* 1979 Oct; 54(10):735-43.
68. Clarke NF, North KN. Congenital fiber type disproportion--30 years on. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003 Oct; 62(10):977-89.
69. Laing NG, Clarke NF, Dye DE, Liyanage K, Walker KR, Kobayashi Y, *et al.* Actin mutations are one cause of congenital fibre type disproportion. *Ann Neurol* 2004 Nov; 56(5):689-94.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Estudar os pacientes brasileiros com diagnóstico de distrofia muscular congênita tipo espinha rígida, miopatia multiminicore e miopatia com desproporção congênita de fibras, a fim de avaliar a associação desses fenótipos ao gene *SEPN1*.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar mutações no gene *SEPN1* em pacientes brasileiros portadores de distrofia muscular congênita tipo espinha rígida, miopatia multiminicore e miopatia com desproporção congênita de fibras.
- Correlacionar o genótipo com o fenótipo clínico e histopatológico dos pacientes incluídos neste estudo.
- Comparar as mutações encontradas em pacientes brasileiros com aquelas descritas na literatura.

4 Metodologia

4.1 Pacientes e métodos

Realizou-se estudo transversal envolvendo 18 pacientes com diferentes formas de miopatias, acompanhados no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (USP), no período entre fevereiro de 2008 e maio de 2011.

4.1.1 Critérios de inclusão

- Pacientes com distrofia muscular congênita tipo espinha rígida: história de fraqueza e hipotonia nos primeiros anos de vida, hipotrofia generalizada associada à limitação da movimentação da coluna cervical e/ou torácica. Biópsia muscular sem anormalidades estruturais, exceto pela presença de minicores ou *moth eaten*.
- Pacientes com miopatia multiminicore: história de fraqueza e hipotonia nos primeiros anos de vida e biópsia muscular evidenciando minicores (áreas com reatividade diminuída nas reações histoquímicas oxidativas), associados ao predomínio de fibras do tipo I.
- Pacientes com miopatia com desproporção congênita de fibras: história de fraqueza e hipotonia nos primeiros anos de vida e biópsia muscular evidenciando hipotrofia de fibras tipo I, cujo diâmetro das fibras tipo I deve ser pelo menos 12% inferior ao das fibras tipo II.

4.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos apenas os pacientes que se recusaram a participar.

4.1.3 Procedimentos

Todos os pacientes incluídos nesta pesquisa foram reavaliados clinicamente pelo mesmo neurologista e foi preenchido um protocolo elaborado com base em aspectos clínicos relevantes.

A pesquisa foi realizada nas dependências do Hospital das Clínicas e no Centro de Estudos do Genoma Humano. A avaliação clínica e a coleta de sangue foram feitas no Ambulatório de Doenças Neuromusculares às tardes das segundas-feiras no Ambulatório São Vicente, primeiro andar, sala 107. Os pacientes procedentes do Centro de Estudos do Genoma Humano foram avaliados clinicamente em consultas previamente agendadas, pelo mesmo neurologista, naquele centro.

O estudo histopatológico e molecular foi realizado no Laboratório de Investigações de Doenças Musculares no Departamento de Anatomia Patológica da FM da UFMG, terceiro andar, sala 331. O sequenciamento e o estudo de controles normais foram realizados no Centro de Estudos do Genoma Humano da USP, em São Paulo.

Ao final do estudo os pacientes receberam um relatório e aconselhamento genético familiar.

4.1.3.1 Avaliação clínica e exames complementares

Os pacientes foram reavaliados clinicamente por neurologista por meio de anamnese, exame físico e exame neurológico de cada um deles. Foi preenchido um protocolo contendo os dados relevantes da história clínica e o exame neurológico (APÊNDICE A).

Foram levantados do prontuário dos pacientes os seguintes exames complementares: dosagem sérica de creatinofosfoquinase (CPK), eletroneuromiografia (ENMG), eletrocardiograma (ECG) e ecocardiograma (ECO) e provas de função pulmonar (espirometria e oximetria).

Os pacientes não submetidos anteriormente à avaliação da função pulmonar e avaliação cardiológica foram encaminhados a essa avaliação.

Os pais e os irmãos de alguns dos pacientes incluídos na pesquisa também foram avaliados clinicamente, na tentativa de se detectarem manifestações menores da doença.

4.1.3.2 Estudo histológico e histoquímico muscular

Este estudo foi efetuado a partir de uma nova análise das lâminas das biópsias musculares estocadas, realizadas por ocasião do diagnóstico.

Em alguns pacientes, os fragmentos de músculo estocados foram utilizados para uma nova confecção de lâminas e melhor análise do estudo histoquímico muscular, mediante a autorização do paciente e/ou responsável. Foram obtidos cortes histológicos de 5 a 8 micrômetros de espessura em aparelho de criostato, fixados em lâminas de vidro. Em seguida, foram realizadas colorações histológicas e reações enzimáticas histoquímicas: hematoxilina-eosina (HE), tricômico de Gomori modificado (GOMORI), ácido periódico de Schiff (PAS) e *Oil Red O* (ORO) e as reações histoquímicas oxidativas: succinato desidrogenase (SDH), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), citocromo C oxidase (COX) e adenosina trifosfatase (ATPases) 9,4 e 4,3.

4.1.3.3 Estudo molecular

A - Coleta do sangue e extração do DNA

O estudo molecular utilizou amostras de DNA genômico extraídas a partir da coleta de 10 mL de sangue periférico dos pacientes e de seus familiares, em tubos contendo anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). A coleta do material foi feita no Ambulatório de Doenças Musculares do Hospital das Clínicas da UFMG e a extração do DNA genômico foi realizada utilizando-se o *kit* de extração *Wizard Genomic DNA Purifications Kit* – (Promega CAT # A1125). Conforme procedimento abaixo:

Procedimento para isolamento de DNA genômico de sangue total
(3ml):

- 1) Balance gentilmente o tubo contendo o sangue total até que ele esteja totalmente homogeneizado, então transfira o sangue para um

tubo estéril de centrifuga de 15ml contendo 9,0ml de solução de lise de células. Em seguida inverta o tubo 5-6 vezes para a sua mistura.

2º) Incube a mistura por 10 minutos em temperatura ambiente (inverta o tubo 2-3 vezes durante a incubação) para a lise das células vermelhas do sangue. Centrifugue a 2,000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente.

(Obss: 2,000 x g = 2560 rpm / ajustar a temperatura a 25C°)

3º) Remova e descarte o tanto de sobrenadante que for possível sem perturbar o pellet branco visível. Aproximadamente 50-100µl de líquido residual permanecerá no tubo de 15ml.

*Se a amostra de sangue tiver sido congelada, repita as etapas 1-4 até que o pellet fique branco. Pode haver alguma perda de DNA de amostras congeladas.

(Obss: Algumas células vermelhas do sangue ou fragmentos de células podem estar visíveis juntamente com as células brancas do sangue. Se o pellet aparentar conter apenas células sanguíneas vermelhas, adicione uma alíquota adicional de solução de lise de célula após ter removido o sobrenadante sobre o pellet de células e então repita as etapas 3-4.)

4º) Agite vigorosamente o tubo no vórtex até que as células brancas do sangue sejam resuspendidas (10-15 segundos).

(Obss: Resuspender completamente as células brancas do sangue para obter uma lise de células eficiente.)

5º) Adicione 3,0ml da solução de lise de núcleo no tubo contendo as células resuspendidas. Pipete a solução 5-6 vezes para a lise das células brancas do sangue. A solução deverá tornar-se muito viscosa. Se grumos de células estiverem visíveis após a mistura, incube a solução a 37°C até que os grumos estejam d esfeitos. Se os grumos ainda estiverem visíveis após 1 hora, adicione solução de lise de núcleo adicional (1,0ml) e repita a incubação.

6º) Adicione 1,0ml de solução de precipitação de proteína para lise e agite vigorosamente no vórtex durante 10-20 segundos. Pequenos grumos de proteínas podem estar visíveis após agitação no vórtex.

(Obss: Se a solução adicional de lise de núcleo tiver sido adicionada na etapa 6, adicione então um total de 1,3ml de solução de precipitação de proteínas)

7º) Centrifugue a 2,000 x g por 10 minutos em temperatura ambiente.

Um pellet de proteína marrom escuro deve estar visível. Se o pellet não for visualizado, recorra à seção IV para possível esclarecimento sobre o que ocorreu.

8º) Transfira o sobrenadante para um tubo de 15ml limpo contendo 3ml de isopropanol a temperatura ambiente.

(Nota: Algum sobrenadante pode permanecer no tubo original contendo o pellet de proteínas. Deixe este líquido residual no tubo para evitar contaminação da solução de DNA com o precipitado de proteínas.)

9º) Misture gentilmente invertendo a solução até que seja formada uma massa visível de fios de DNA tipo linhas brancas.

10) Centrifugue a 2,000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente. O DNA será visível como um pequeno pellet branco.

11) Descarte o sobrenadante e adicione 3ml de etanol 70% a temperatura ambiente ao DNA. Inverta gentilmente o tubo várias vezes para lavar o pellet de DNA e os lados do tubo. Centrifugue novamente como na etapa 12.

12) Cuidadosamente aspire o etanol usando ou uma pipeta de Pauster escura ou uma pipeta tipo de sequenciamento. O pellet de DNA esta muito frágil neste ponto do procedimento, e muito cuidado deve ser tomado para evitar a aspiração do pellet para dentro da pipeta. Inverta o tubo sobre um papel absorvente limpo e deixe o pellet secar ao ar livre durante 10-15 minutos.

13) Adicione 250µl de solução de reidratação de DNA, para amostras de 3.0ml, e reidrate o DNA pela incubação a 65°C durante 1 hora. Periodicamente misture a solução batendo gentilmente no tubo.

Alternativamente, reidrate o DNA pela incubação da solução em overnight a temperatura ambiente ou a 4°C.

14) Estoque o DNA a 2-8°C.

B - Amplificação do DNA genômico

Para o estudo de mutações no gene *SEPN1*, foram desenhados 12 pares de *primers* (*forward* e *reverse*) com o uso programa *primer 3*, que foram sintetizados pela empresa *IDT - Prodimol Ltda.* (Quadro 1). Não foi realizada a amplificação do éxon 3, pois este corresponde a um *splice* alternativo e não participa da codificação da proteína²¹.

Quadro 1 - Informações sobre os *primers*, produto de PCR e temperatura de *anealing*

<i>Primer</i>	Sequência do primer	Tamanho do Produto de PCR	Temperatura de <i>Anealing</i>
SEPN1 - 1F	CTTGGCGTTCCGGTGTAG	456 bp	60°C
SEPN1 - 1R	ACTCGTCCATGCCCATGTC		
SEPN1 - 2F	CAGTCTCTCCTCCCAAGCAG	198 bp	60°C
SEPN1 - 2R	TCAGTGAAGACACCGTTGG		
SEPN1 - 4F	GGTGAGCCCTGTAGCATAAG	232 bp	58°C
SEPN1 - 4R	TCGGGATACACACAGATGAC		
SEPN1 - 5F	ACCCACATGGTACAGGAGAC	298 bp	60°C
SEPN1 - 5R	CACCCAGCTGTCCTCAC		
SEPN1 - 6F	ACCCAGCAAGCCAGTACG	180 bp	60°C
SEPN1 - 6R	CCAGTGTGGCCCACTCAC		
SEPN1 - 7F	AAGGTGGGCAGCTCTGGT	232 bp	60°C
SEPN1 - 7R	AGCAGGACAAGCTGTAGGAG		
SEPN1 - 8F	TGATGATGGTGTCACTCTGC	207 bp	58°C
SEPN1 - 8R	TAGAGACCCTCCAAAATGCT		
SEPN1 - 9F	CCCCTACCACTGACCTCTG	248 bp	60°C
SEPN1 - 9R	CCTGACCCTGGCCTTCAC		
SEPN1 - 10F	CTTCGCTCTGTCTCGGTGT	196 bp	60°C
SEPN1 - 10R	TCTGGTACCCACAAGGTGT		
SEPN1 - 11F	CGCCTCACCTTCTGTCTT	182 bp	60°C
SEPN1 - 11R	ACTGTTCCGGACGCTCCT		
SEPN1 - 12bF	AGTGTGCAACTGTCCCCACA	220 bp	58°C
SEPN1 - 12bR	CGAAGCCTGATGAAGTCTGC		
SEPN1 - 13F	CCCATAGAAGAGAGGGGCACA	269 bp	60°C
SEPN1 - 13R	TGCATCAGATCCCGTCCAG		

Para a amplificação dos éxons do gene *SEPN1*, utilizou-se a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), com os seguintes ciclos térmicos:

Temp. de desnaturação: - 94°C, durante 1 minuto.

Seguido por 35 ciclos de: - 94°C, durante 30 segundos.

- Temp. de *anealing* de cada éxon, durante 1 minuto (de acordo com tabela a seguir).

- 72°C, durante 30 segundos.

Temp. de extensão final: - 72°C, durante 30 segundos.

Os éxons 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 foram amplificados utilizando-se o kit PCR Master Mix (Promega CAT # M7502), de acordo com o protocolo:

Para o volume total 25 µL para cada amostra, usou-se aproximadamente:

DNA (20 ng) _____ 2,0 µL

Água miliQ _____ 8,5 µL

Primer F (2,0 Mm ou 20 Mm)** ___ 1,0 µL

Primer R (2,0 MM ou 20 Mm)** ___ 1,0 µL

**Mix* _____ 12,5 μ L

*(*Mix* contendo todos os desorribonucleotídeos trifosfatados - dNTPs - e a *taq* polimerase)

**Para amplificação dos éxons 2, 10 e 13 foi necessária a utilização do *primer* a uma concentração de 20 Mm; para os demais usou-se concentração de 2,0 Mm.

O éxon 1 continha regiões ricas em citosina-guanina (CG) e para sua amplificação foi necessária a utilização de uma segunda *Taq*. Empregou-se a *Go taq Colorless Master Mix* (Promega CAT # M7133), de acordo com o seguinte protocolo:

DNA (20ng) _____ 1,0 μ L

Água miliQ _____ 0,0 μ L

Primer F (20 Mm) _____ 1,0 μ L

Primer R (20 Mm) _____ 1,0 μ L

DMSO _____ 2,5 μ L

**Mix* _____ 19,5 μ L

*(*Mix* contendo todos os dNTPs e a *Go taq*).

A verificação da amplificação do produto de PCR foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo 2 μ L de brometo de etídio em cuba horizontal a uma voltagem de cerca de 100 volts.

Depois de verificada a PCR, os produtos de PCR foram purificados com *kit* de purificação Qiagen (Qiagen CAT#28106) com base em metodologia rotineira, para posterior sequenciamento.

C - Sequenciamento do gene *SEPN1*

O sequenciamento do produto de PCR dos 12 éxons codificantes do gene *SEPN1* foi realizado no sequenciador ABI 373 DNA *Sequencer* (*Applied Biosystem*) de 96 capilares no Centro de Estudos do Genoma Humano da USP - São Paulo, de acordo com as especificações do fabricante.

O sequenciamento dos produtos de PCR seguiu o seguinte protocolo:

Para o volume total de 10 μ L para cada amostra, utilizou-se aproximadamente:

Big Dye _____ 2,0 μ L

Primer F ou R _____ 2,5 μ L

Buffer _____ 1,0 μ L
Água miliQ _____ 2,5 μ L
Produto de PCR purificado _____ 2,0 μ L

Para a reação de sequenciamento do gene, utilizaram-se os seguintes ciclos térmicos em termociclador:

Temperatura de desnaturação: - 96°C, durante 1 minuto.
Seguido por 25 ciclos de: - 96°C, durante 10 segundos.
- 50°C, durante 5 segundos.
- 60°C, durante 4 minutos

Após a reação de sequenciamento, os produtos de sequenciamento foram purificados por técnica que utiliza o reagente *sephadex* em placa *multiscreen* de 96 poços para os quais os produtos são transferidos para purificação e novamente transferidos para uma placa de sequenciamento, levados, então, ao sequenciador. As referências dos reagentes e placas utilizados para essa reação encontram-se no ANEXO A.

D - Análise do sequenciamento

A análise dos cromatogramas foi feita manualmente por dois observadores diferentes (pesquisadora e sua orientadora).

As mutações novas identificadas foram analisadas e sua triagem foi feita em cerca de 100 controles normais, utilizando amostras do banco de controles do Centro de Estudos do Genoma Humano da USP (APÊNDICE B).

4.1.4 Aspectos éticos

Termos de consentimento pós-informado foram elaborados de acordo com a faixa etária e orientação do Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) (APÊNDICE C). Os pacientes foram admitidos no estudo após receberem as informações necessárias e assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido e a autorização para foto e vídeo (APÊNDICE D).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da UFMG, sob o número - ETIC 555/08, pela Câmara do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da UFMG, pela diretoria da FM-UFMG, pelas unidades funcionais onde foram realizados os procedimentos e pelo Departamento de Ensino Pesquisa e Extensão do HC-UFMG (ANEXOS B, C, D, E, F, G e H).

5 ARTIGO 2 - MIOPATIAS RELACIONADAS À SELENOPROTEÍNA N (SEPN1): ESTUDO CLÍNICO, HISTOPATOLÓGICO E GENÉTICO EM PACIENTES BRASILEIROS

RESUMO

Introdução: diferentes formas de miopatias estão relacionadas ao gene da selenoproteína N, entre elas a distrofia muscular congênita tipo espinha rígida (DMER), a miopatia multiminicore (DMm), a desminopatia com *mallory body* e a miopatia com desproporção congênita de fibras (MDCF). Até o momento, não há estudos nacionais que avaliaram mutações no gene *SEPN1* em pacientes brasileiros com miopatias relacionadas à selenoproteína N. **Objetivo:** avaliar mutações no gene *SEPN1* em pacientes brasileiros com diferentes formas de miopatias relacionadas à selenoproteína N e correlacionar os achados clínicos, histopatológicos e genéticos. **Metodologia:** pacientes portadores de miopatias relacionadas ao gene *SEPN1* foram submetidos a: avaliação clínica, dosagem de creatinofosfoquinase (CPK), eletroneuromiografia (ENMG) e biópsia muscular com estudo histoquímico por ocasião do diagnóstico. Realizou-se protocolo de pesquisa com levantamento, no prontuário, dos dados clínicos dos pacientes. Fez-se revisão da histopatologia muscular dos pacientes incluídos na pesquisa bem como estudo molecular dos pacientes, de alguns familiares e de controles normais, pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento do gene *SEPN1*. **Resultados:** incluíram-se 18 pacientes de 16 famílias diferentes. Desses, 10 foram classificados como portadores de DMER, sete com DMm e um com MDCF. O estudo molecular revelou mutações em seis famílias. Família 1: um paciente com fenótipo clássico de DMm, com mutação em heterozigose composta (cG1010T/cT1384G). Famílias 2 e 3: dois pacientes não aparentados com fenótipo de DMER com inserção de uma base fora de fase em heterozigose (c713-714insA). Família 4: um paciente com MDCF apresentou inserção de 12 bases em fase (c316-317 Ins.12bp). Família 5: um paciente com DMm forma pré-natal com artrogripose, com mutação com sentido trocado em heterozigose (cG583A) cuja alteração complementar não foi identificada. Família 6: três irmãos com quadro de miopatia e rigidez cervical, nos quais foi registrada uma inserção em fase, de três pares de base, em heterozigose (c438-439ins3bp). **Conclusão:** as miopatias relacionadas à selenoproteína N apresentaram amplo fenótipo clínico e histopatológico. Entre as seis mutações encontradas, duas (c713-714insA e cT1384G) já haviam sido descritas na literatura como patogênicas, em pacientes com DMER e DMm. Das outras quatro não foram encontrados registros. A mutação cG1010T foi detectada em heterozigose composta com a mutação patogênica cT1384G em um paciente com DMm, sendo considerada, devido às suas características e ausência em controles normais, uma mutação nova patogênica. A mutação c438-439ins3bp é um polimorfismo, pois foi encontrada em homozigose em um dos pais assintomáticos e em 2% dos controles normais. As outras duas mutações cG583A e c316-317ins12bp requerem mais estudos para melhor esclarecimento quanto à sua patogenicidade. A avaliação clínica e histopatológica, apesar de fundamental, não é suficiente devido à grande variabilidade fenotípica e genética de tais formas de miopatias. O estudo molecular é essencial para identificação do defeito genético e conseqüente aconselhamento genético

Palavras-chave: Miopatias relacionadas à selenoproteína N. Distrofia muscular congênita tipo espinha rígida. Miopatia multiminicore. Miopatia com desproporção de fibras. Deminopatia com *mallory body*.

ABSTRACT

Introduction: Different kinds of myopathy are related to the selenoprotein N gene, among which: congenital muscular dystrophy with rigid spine (RSMD) multiminicore myopathy (MmD), desminopathy with Mallory body and congenital fiber-type disproportion myopathy (CFTD). Until the present moment there isn't any description of national studies that evaluated the presence of mutations in the gene *SEPN1* in Brazilian patients with myopathy related to selenoprotein N. Evaluate mutations in the *SEPN1* gene in patients with different forms of myopathies related to the selenoprotein N gene. **Objective:** Correlate the clinical, histopathological and genetic findings. **Methodology:** Patients with myopathies related to *SEPN1* were submitted to clinical evaluation, measurement of creatinephosphokinase (CPK), electromyography (ENMG) and muscle biopsy with histochemistry because of diagnosis. We conducted a research protocol, the medical record, clinical data of patients. We reviewed the histopathology muscle of patients included in the research and molecular study of patients, some family members and normal controls, by technique of polymerase chain reaction (PCR) and sequencing of the gene *SEPN1*. **Results:** Were included eighteen patients from sixteen different families. This patients ten were classified as having RSMD, seven patients were classified with MmD (classic phenotype) and one with CFTD. The molecular analysis revealed mutations in six families. Family 1: A patient with classic phenotype of MmD with compound heterozygous mutation (cG1010T/cT1384G). Family 2 and 3: Two patients unrelated with RSMD phenotype with insertion of a base out of phase in heterozygous (c713-714insA). Family 4: One patient with CFTD showed insertion of 12 bases in phase (c316-317 Ins.12bp). Family 5: One patient with MmD prenatal form with arthrogyrosis showed a missense mutation in heterozygous (cG583A) in which the complementary change was not identified. Family 6: Three affected siblings with myopathy and stiff neck which was identified in phase one insertion in phase of three base pairs in heterozygous (c438-439ins3bp). **Conclusion:** The selenoprotein N related to myopathies shows a wide clinical phenotype and histology. Among the six mutations found two (C713-714insA and cT1384G) had previously been described in the literature as pathogenic in patients with RSMD and MmD. The others four changes were not found in the literature description. The mutation cG1010T was found in compound heterozygous with the pathogenic mutation cT1384G in a patient with MmD, being considered due to their characteristics and absence in normal controls, a new pathogenic mutation. The mutation c438-439ins3bp, is a polymorphism because it was found homozygous in a parent asymptomatic and in 2% of normal controls. The others two mutations cG583A and c316-317Ins12bp require further studies for better elucidation as to its pathogenicity. The clinical and histopathological findings, although essential, is not sufficient due to high phenotypic and genetic variation this forms of myopathies. The molecular analysis is essential to identify the genetic defect and consequent genetic counseling.

Keywords: Myopathies related to selenoprotein N. Congenital muscular dystrophy with rigid spine. Multiminicore myopathy. Desminopathy with Mallory-body. Congenital fiber-type disproportion myopathy.

5.1 Introdução

As selenoproteínas pertencem a uma família de proteínas caracterizadas pela presença da selenocisteína em sua estrutura primária, a qual representa a principal forma biológica do *selenium*. A selenoproteína N é codificada pelo gene *SEPN1* e é uma glicoproteína integral de membrana de 70 kDa localizada no retículo endoplasmático que se expressa precocemente durante o desenvolvimento tecidual^{1,2}.

Aproximadamente 25 selenoproteínas já foram identificadas em humanos e parecem estar envolvidas em reações de oxidação e redução. Estudos celulares recentes sugerem que células com deficiência de *SEPN1* são mais suscetíveis ao estresse oxidativo¹⁻³.

As selenoproteínas N foram os primeiros membros da família de selenoproteínas a serem associadas a doenças genéticas. No entanto, a função precisa das diferentes selenoproteínas, inclusive da selenoproteína N, permanece desconhecida^{2,4}.

O gene da selenoproteína N (*SEPN1*) foi localizado por Moghadaszadeh *et al.*, em 1998, que em 2001 identificaram as primeiras mutações nesse gene em pacientes com distrofia muscular congênita tipo espinha rígida⁵. Desde então, mutações no gene *SEPN1* foram associadas a outras formas de doenças musculares congênitas^{6,7}.

Em 2004, propôs-se o reconhecimento de um grupo de miopatia relacionada à selenoproteína N, no qual se incluíam três formas de doenças musculares autossômicas recessivas: distrofia muscular congênita tipo espinha rígida, miopatia multiminicore e desminopatia com *mallory body*⁶.

Posteriormente, em 2006 a miopatia com desproporção congênita de fibras também foi incluída neste grupo como sendo a quarta forma de miopatia relacionada à *SEPN1*⁸.

Apesar dessas quatro doenças musculares apresentarem algumas características semelhantes, são descritas na literatura como condições com fenótipos clínicos e histopatológicos distintos⁸.

Descrita em 1973 pela primeira vez, a distrofia muscular congênita tipo espinha rígida é uma forma de distrofia muscular congênita que se caracteriza

cl clinicamente por início dos sintomas na infância e fraqueza muscular predominando em musculatura axial associada à limitação acentuada da movimentação da coluna torácica e cervical⁹. Observam-se também contraturas em outras articulações tais como cotovelos e tornozelos. A doença cursa com escoliose e insuficiência respiratória, que são de instalação precoce e grave. A biópsia muscular desses pacientes revela proliferação de tecido muscular conjuntivo associada a alterações da citoarquitetura das fibras musculares que podem ser classificadas como *moth eaten* ou minicores. No estudo imuno-histoquímico verifica-se imunomarcagem preservada para proteína merosina⁹. Quanto ao defeito genético, até então foram descritas mutações apenas no gene *SEPN1*¹.

A miopatia multiminicore é classificada como uma forma de miopatia congênita estrutural que apresenta heterogeneidade genética, sendo descritas mutações nos genes *SEPN1*, *RYR1*, *TNN*, *SCAD* e *SECISBP2*^{7,10-14}.

De forma geral, clinicamente os pacientes apresentam hipotonia e fraqueza muscular desde a infância, havendo também o comprometimento da musculatura da face e da coluna cervical. Nota-se frequentemente rigidez da coluna cervical, voz anasalada e palato ogival^{7,15}. Os pacientes portadores de mutações no gene *SEPN1* apresentam escoliose grave, insuficiência ventilatória, rigidez cervical e à biópsia muscular percebem-se *cores* pequenos e múltiplos minicores. Ao contrário, nos pacientes com mutações no gene *RYR1* há menos comprometimento ventilatório, porém há o envolvimento da musculatura extraocular, susceptibilidade à hipertermia maligna e à biópsia muscular evidenciam-se *cores* grandes e múltiplos associados a predomínio de fibras tipo I^{7,10}. A forma com acometimento do músculo cardíaco está relacionada tanto com o gene *TTN* quanto com o *SCAD*¹¹⁻¹³.

A miopatia com desproporção congênita de fibras (MDCF) apresenta-se clinicamente por fraqueza e hipotonia de início precoce na infância. Geralmente a fraqueza muscular é proximal nos membros, podendo haver comprometimento da musculatura facial (42% dos pacientes), oftalmoplegia (19% dos casos), escoliose e contraturas articulares. À biópsia muscular verifica-se como padrão a hipotrofia de fibras tipo I (o diâmetro das fibras tipo I deve ser pelo menos 12% inferior aos das fibras tipo II)^{8,16-18}.

A MDCF possui heterogeneidade genética, já tendo sido associada a mutações nos genes *SEPN1*, *ACTA1*, *TPM3* e *CFTD2*^{8,14,19,20}.

Até o presente momento, não existem estudos na população brasileira que tenham verificado tais fenótipos associados ao gene *SEPN1*. O objetivo deste trabalho foi realizar estudo clínico, histopatológico e genético em pacientes brasileiros com diferentes formas de miopatias associada à selenoproteína N, bem como correlacionar os achados moleculares com o fenótipo dos pacientes.

5.2 Pacientes e métodos

Realizou-se estudo transversal envolvendo 18 pacientes com diferentes formas de miopatias, acompanhados no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (USP), no período entre fevereiro de 2009 e maio de 2011.

5.2.1 Critérios de inclusão

- Pacientes com distrofia muscular congênita tipo espinha rígida: história de fraqueza e hipotonia nos primeiros anos de vida, hipotrofia generalizada associada à limitação da movimentação da coluna cervical e/ou torácica. Biópsia muscular sem anormalidades estruturais, exceto pela presença de minicores ou *moth eaten*.
- Pacientes com miopatia multiminicore: história de fraqueza e hipotonia nos primeiros anos de vida e biópsia muscular evidenciando minicores (áreas com reatividade diminuída nas reações histoquímicas oxidativas), associados ao predomínio de fibras do tipo I.
- Pacientes com miopatia com desproporção congênita de fibras: história de fraqueza e hipotonia nos primeiros anos de vida e biópsia muscular evidenciando hipotrofia de fibras tipo I, cujo diâmetro das fibras tipo I deve ser pelo menos 12% inferior ao das fibras tipo II.

5.2.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos apenas os pacientes que se recusaram a participar.

5.2.3 Procedimentos

Todos os pacientes incluídos nesta pesquisa foram reavaliados clinicamente pelo mesmo neurologista e foi preenchido um protocolo elaborado com base em aspectos clínicos relevantes.

Foi realizado estudo histopatológico e molecular incluindo estudo de controles normais.

Ao final do estudo os pacientes receberam um relatório e aconselhamento genético familiar.

5.2.3.1 Avaliação clínica e exames complementares

Os pacientes foram reavaliados clinicamente por neurologista por meio de anamnese, exame físico e exame neurológico de cada um deles.

Foram levantados do prontuário dos pacientes os seguintes exames complementares: dosagem sérica de creatinofosfoquinase (CPK), eletroneuromiografia (ENMG), eletrocardiograma (ECG) e ecocardiograma (ECO) e provas de função pulmonar (espirometria e oximetria).

Os pais e os irmãos de alguns dos pacientes incluídos na pesquisa também foram avaliados clinicamente, na tentativa de se detectarem manifestações menores da doença.

5.2.3.2 Estudo histológico e histoquímico muscular

Este estudo foi realizado a partir de uma nova análise das lâminas das biópsias musculares estocadas, realizadas por ocasião do diagnóstico.

Foram realizadas as colorações histológicas e as reações enzimáticas histoquímicas: hematoxilina-eosina (HE), tricômico de Gomori modificado (GOMORI), ácido periódico de Schiff (PAS) e *Oil Red O* (ORO) e as reações

histoquímicas oxidativas: succinato desidrogenase (SDH), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), citocromo C oxidase (COX) e adenosina trifosfatase (ATPases) 9,4 e 4,3.

5.2.3.3 Estudo molecular

A - Coleta do sangue e extração do DNA

DNA genômico foi obtido a partir da coleta de 10 mL de sangue periférico dos pacientes e de seus familiares. A extração do DNA genômico foi realizada através de metodologia rotineira, utilizando-se o *kit* de extração *Wizard Genomic DNA Purifications Kit* – (Promega CAT # A1125).

B - Amplificação do DNA genômico

Para o estudo de mutações no gene *SEPN1*, foram desenhados 12 pares de *primers* (*forward* e *reverse*) com o uso programa *primer 3*, que foram sintetizados pela empresa *IDT - Prodimol Ltda.* (Quadro 1). Não foi realizada a amplificação do éxon 3, pois este corresponde a um *splice* alternativo e não participa da codificação da proteína²¹.

Quadro 1 - Informações sobre os *primers*, produto de PCR e temperatura de *anealing*

Primer	Sequência do primer	Tamanho do Produto de PCR	Temperatura de <i>Anealing</i>
SEPN1 - 1F	CTTGGCGTTCCGGTGTAG	456 bp	60°C
SEPN1 - 1R	ACTCGTCCATGCCCATGTC		
SEPN1 - 2F	CAGTCTCTCCTCCCAAGCAG	198 bp	60°C
SEPN1 - 2R	TCAGTGAAGACACCGTTGG		
SEPN1 - 4F	GGTGAGCCCTGTAGCATAAG	232 bp	58°C
SEPN1 - 4R	TCGGGATACACACAGATGAC		
SEPN1 - 5F	ACCCACATGGTACAGGAGAC	298 bp	60°C
SEPN1 - 5R	CACCCAGCTGTCCTCAC		
SEPN1 - 6F	ACCCAGCAAGCCAGTACG	180 bp	60°C
SEPN1 - 6R	CCAGTGTGGCCCACTCAC		
SEPN1 - 7F	AAGGTGGGCAGCTCTGGT	232 bp	60°C
SEPN1 - 7R	AGCAGGACAAGCTGTAGGAG		
SEPN1 - 8F	TGATGATGGTGTCACTCTGC	207 bp	58°C
SEPN1 - 8R	TAGAGACCCTCCAAAATGCT		
SEPN1 - 9F	CCCCTACCACTGACCTCTG	248 bp	60°C
SEPN1 - 9R	CCTGACCCTGGCCTTCAC		
SEPN1 - 10F	CTTCGCTCTGTCTCGGTGT	196 bp	60°C
SEPN1 - 10R	TCTGGTACCCACAAGGTGT		
SEPN1 - 11F	CGCCTCACCTTCTGTCTT	182 bp	60°C
SEPN1 - 11R	ACTGTTCCGGACGCTCCT		
SEPN1 - 12bF	AGTGTGCAACTGTCCCCACA	220 bp	58°C
SEPN1 - 12bR	CGAAGCCTGATGAAGTCTGC		
SEPN1 - 13F	CCCATAGAAGAGAGGGGCACA	269 bp	60°C
SEPN1 - 13R	TGCATCAGATCCCGTCCAG		

Para a amplificação dos éxons do gene *SEPN1*, utilizou-se a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Os éxons 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 foram amplificados utilizando-se o *kit PCR Master Mix* (Promega CAT # M7502), de acordo com especificações do fabricante.

O éxon 1 continha regiões ricas em citosina-guanina (CG) e para sua amplificação foi necessária a utilização da *Go taq Colorless Master Mix* (Promega CAT # M7133), de acordo com especificações do fabricante.

Os produtos de PCR foram purificados com *kit* de purificação Qiagen (Qiagen CAT#28106) com base em metodologia rotineira, para posterior sequenciamento.

C - Sequenciamento do gene *SEPN1*

O sequenciamento do produto de PCR dos 12 éxons codificantes do gene *SEPN1* foi realizado em sequenciador ABI 373 DNA *Sequencer* (*Applied Biosystem*) de 96 capilares.

O sequenciamento dos produtos de PCR seguiu o seguinte protocolo:

Para o volume total de 10 μL para cada amostra, utilizou-se aproximadamente:

Big Dye _____ 2,0 μL
Primer F ou R _____ 2,5 μL
 Buffer _____ 1,0 μL
 Água miliQ _____ 2,5 μL
 Produto de PCR purificado ____ 2,0 μL

Para a reação de sequenciamento do gene, utilizaram-se os seguintes ciclos térmicos em termociclador:

Temperatura de desnaturação: - 96°C, durante 1 minuto.
 Seguido por 25 ciclos de: - 96°C, durante 10 segundos.
 - 50°C, durante 5 segundos.
 - 60°C, durante 4 minutos

Os produtos de sequenciamento foram purificados por técnica que utiliza o reagente *sephadex* em placa *multiscreen* de 96 poços.

D - Análise do sequenciamento

A análise dos cromatogramas foi feita manualmente por dois observadores diferentes (pesquisadora e sua orientadora).

As mutações novas identificadas foram analisadas e sua triagem foi feita em cerca de 100 controles normais, utilizando amostras do banco de controles do Centro de Estudos do Genoma Humano da USP (APÊNDICE B).

5.2.4 Aspectos éticos

Termos de consentimento pós-informado foram elaborados de acordo com a faixa etária e orientação do Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) (APÊNDICE C). Os pacientes foram admitidos no estudo após receberem as informações necessárias e assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido e a autorização para foto e vídeo (APÊNDICE D).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da UFMG, sob o número - ETIC 555/08, pela Câmara do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da UFMG, pela diretoria da FM-UFMG, pelas unidades funcionais onde foram realizados os procedimentos e pelo Departamento de Ensino Pesquisa e Extensão do HC-UFMG (ANEXOS B, C, D, E, F, G e H).

5.3 Resultados

Os dados de identificação, assim como a procedência e a naturalidade dos pacientes, estão descritos no Quadro 2.

Quadro 2 - Dados dos pacientes incluídos na pesquisa

Caso	Sexo	Diagnóstico	Idade atual	Centro de Referência (Naturalidade)
01	M	Espinha Rígida	19a	HC-UFMG (Ibirité-MG)
02	F	Espinha Rígida	23a	HC-UFMG (Ibirité-MG)
03	M	Espinha Rígida	27a	HC-UFMG (Ibirité-MG))
04	M	Multiminicore forma clássica	14a	HC-UFMG (Belo Horizonte-MG)
05	M	Multiminicore com artrogripose	14a	HC-UFMG (Ribeirão das Neves-MG)
06	M	Multiminicore	1a 7m	HC-UFMG (Recife-PE)
07	M	Espinha Rígida	36a	HC-UFMG (Santa Luzia-MG)
08	M	Desproporção congênita de fibras	30a	HC-UFMG (Belo Horizonte-MG)
09	M	Multiminicore com envolvimento de mãos	21a	HC-UFMG (Belo Horizonte-MG)
10	F	Multiminicore clássica	13a	HC-UFMG (Belo Horizonte-MG)
11	F	Espinha Rígida	19a	HC-UFMG (Belo Horizonte-MG)
12	F	Espinha Rígida	9a	HC-UFMG (Recife-PE)
13	M	Multiminicore com envolvimento de mãos	9a	HC-UFMG (Sabará-MG)
14	M	Espinha Rígida	23a	HC-UFMG (Belo Horizonte-MG)
15	F	Espinha Rígida	27a	Genoma-USP (São Paulo-SP)
16	M	Multiminicore	21a	Genoma-USP (Guarulhos-SP)
17	F	Espinha Rígida	17a	Genoma-USP (Rondonópolis-MT)
18	F	Espinha Rígida	26a	Genoma-USP (Belém-PA)

a= anos; F= feminino; M= masculino; HC= Hospital das Clínicas; USP= Universidade de São Paulo.

Entre os 18 pacientes incluídos no estudo, 14 eram provenientes do Ambulatório de Doenças Neuromusculares do HC-UFMG e quatro do Centro de Estudos do Genoma Humano da USP. As idades variaram de um a 36 anos e, quanto ao gênero, 11 pacientes eram do sexo masculino. Dos 18 pacientes, 10

foram classificados como portadores de distrofia congênita tipo espinha rígida, sete com miopatia multiminicore e um com miopatia com desproporção congênita de fibras.

5.3.1 Avaliação clínica

Quadro 3 - História clínica dos pacientes envolvidos na pesquisa

Caso	Idade de início dos sintomas	Idade ao diagnóstico	Sintomas iniciais	Rigidez Cervical	Cons.	Parente afetado
01	1a	17a	Fraqueza muscular, quedas frequentes, dificuldade para correr e subir escadas.	S	N	S-irmãos
02	7a	15a	Dificuldade de marcha.	S	N	S-irmãos
03	2a	18a	Fraqueza muscular, atraso e dificuldade na aquisição da marcha.	S	N	S-irmãos
04	10m	3a9m	Hipotonia e fraqueza cervical.	S	N	N
05	Ao nascimento	7a	Artrogripose.	S	N	N
06	Ao nascimento	1a 7m	Hipotonia global. Alteração de mãos e pés.	N	N	N
07	3a	5a: clínico 35a: biópsia	Dificuldade na marcha, fraqueza de membros inferiores, quedas frequentes e dificuldade para subir escadas.	S	N	N
08	1º ano de vida	5a: clínico 11a: biópsia	Hipotonia e fraqueza cervical.	S	N	N
09	Ao nascimento	16a	Hipotonia ao nascimento.	S	N	N
10	9 meses	6a	Fraqueza muscular em membros inferiores e déficit ponderal.	S	N	S
11	1a	10a	Fraqueza muscular e rigidez cervical	S	N	N
12	1a	8a	Hipotonia global e limitação da movimentação cervical.	S	N	N
13	Ao nascimento	4a	Mãos e pés tortos.	N	N	N
14	3 meses	6a	Dificuldade para extensão cervical.	S	N	N
15	5a	17	Fraqueza cervical, distúrbio de marcha e quedas frequentes.	S	N	S - mãe
16	2a6m	17a	Atraso da marcha.	S	N	S - tio materno
17	9a	11a	Fraqueza muscular e rigidez cervical.	S	N	N
18	3a	5a	Dificuldade de subir escadas e distúrbio de marcha	S	N	N

a= anos; m= meses; S= sim; N= não; Cons= consanguinidade.

No Quadro 3 encontram-se os dados clínicos referentes à anamnese dos pacientes. A idade de início dos sintomas variou do primeiro dia de vida aos sete anos de idade. A idade do diagnóstico variou de um ano e sete meses aos 17 anos. Não foi observada consanguinidade entre os pais dos pacientes avaliados. Havia outros membros familiares acometidos em três famílias estudadas. Os casos 1, 2 e 3 eram irmãos em uma mesma prole.

5.3.2 Exames complementares

No Quadro 5 listam-se os valores dos níveis de CPK e da ENMG.

Quadro 5 - Exames complementares dos pacientes envolvidos na pesquisa

Caso	CPK	ENMG
01	2.326 u/L	Padrão miopático
02	1.505 u/L	Padrão miopático
03	1.924 u/L	Padrão miopático
04	142 u/L	Padrão miopático
05	280 u/L	Padrão miopático
06	N.A	N.A
07	395 u/L	Padrão miopático crônico
08	213 u/L	Padrão miopático
09	48 u/L	Padrão miopático
10	N.A	Padrão miopático
11	141 u/L	Padrão miopático
12	Normal	Padrão miopático
13	63 u/L	Padrão miopático
14	162 u/L	Padrão miopático
15	640 u/L	Padrão miopático
16	1.462 u/L	N.A
17	390 u/L	Padrão miopático
18	49u/L	Padrão miopático

N.A= não analisado.

Os resultados da CPK foram obtidos em 16 pacientes e mostrou níveis que variaram desde valores normais até aumento de 13 vezes o valor normal. Dos 18 pacientes, 16 foram submetidos à ENMG cujo resultado revelou padrão miopático em todos.

5.3.3 Função pulmonar e cardíaca

Os dados obtidos da avaliação da função pulmonar, incluindo a capacidade vital forçada e o pico de fluxo da tosse, bem como da avaliação cardiológica, incluindo os achados do eletrocardiograma e ecocardiograma, estão apresentados no Quadro 6.

Quadro 6 - Função pulmonar e cardíaca dos pacientes envolvidos na pesquisa

Caso	CV	PFT	ECG	ECO
01	72% (3,61 L)	410 L/min	Ritmo cardíaco sinusal, sobrecarga de AE, bloqueio de ramo direito.	Insuficiência valvar mitral de grau leve, regurgitação valvar bicúspide leve, dimensões cavitárias e espessura das paredes normais, FE=65% (normal)
02	61% (2,23 L)	340 L/min	Normal	Prolapso mitral discreto, FE=69%.
03	73% (3,87 L)	490 L/min	N.R	N.R
04	46%	250 L/min	Normal	Insuficiência mitral discreta, função ventricular preservada, câmaras cardíacas normais, FE=70%
05	27% (1,08 L)	N.A	Normal	Dilatação leve de aorta ascendente, boa função sistólica, FE=74%
06	46%	N.A	Normal	Normal
07	107% (4,88 L)	390 L/min	N.A	Normal FE=65%
08	47% (2,49 L)	N.A	Bloqueio de ramo direito.	Normal
09	44%	N.A	Normal	Normal, FE=55%
10	0,55 L	120 L/min	Normal	Normal
11	32% (0,84 L)	150 L/min	Bloqueio incompleto de ramo direito.	Normal, FE=64%
12	N.A	N.A	Normal	Normal
13	N.A	N.A	Normal	Normal
14	N.A	N.A	Normal	Normal
15	N.A	N.A	N.A	N.A
16	52% (2,32 L)	250 L/min	N.A	N.A
17	27%		N.A	N.A
18	43% (1,54 L)	260 L/min	N.A	N.A

AE= artéria esquerda; CV= capacidade vital; PFT= pico de fluxo da tosse; ECG=eletrocardiograma; ECO= ecocardiograma; FE= fração de ejeção; N.A= não analisado; N.R=não realizado.

A avaliação da função pulmonar foi feita em 14 pacientes. Com exceção do caso 7, todos tinham comprometimento da CV e do PFT. A avaliação cardiológica foi feita em 13 pacientes e todos apresentaram ausência de comprometimento do miocárdio, com valores normais da fração de ejeção.

5.3.4 Biópsia muscular

Os achados do estudo histopatológico muscular estão descritos no Quadro 7.

Quadro 7 - Estudos histopatológicos e histoquímicos

Caso	Idade à biópsia	Músculo	Tecido conjuntivo	Minicores	Proporção do tipo de fibras	Variação do calibre das fibras	Núcleos internos	Padrão
01	17a	Bíceps	Endo: P Peri: P	A (<i>Moth eaten</i> - P)	Pred.Tipo I	P	P	M
02	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A
03	N.R	N.R	N.R	N.R	N.R	N.R	N.R	N.R
04	3a9m	Bíceps	Endo: P Peri: P	P fibras tipo I e II (Pred.tipo I)	Normal	P	A	M
05	12a	Bíceps	Endo: P Peri: P	P	Pred.Tipo I	P	P	M
06	1a 7m	Bíceps	Endo: P Peri: P	P	Pred.Tipo I	P	P	M
07	31a	Bíceps	Endo: P Peri: P	P (<i>Moth eaten</i> - P)	Normal	P	P	D
08	30a	Bíceps	Endo: P Peri: P	A (<i>Moth eaten</i> - P)	Pred.Tipo I	P	P	M
09	16a 2m	Bíceps	Endo: P Peri: P	P	100% Tipo I	P	P	M
10	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A
11	10a	Bíceps	Endo: P Peri: P	N.A	N.A	P	P	D
12	9a	Quadríceps	Endo: P Peri: P	P Cores e minicores (<i>Moth eaten</i> - P)	Pred.Tipo I	P	P	M
13	4a	Bíceps	Endo: P Peri: P	P (<i>central core</i> -P)	Pred.Tipo I (Fascículos pred total de tipo I)	P	P	M
14	6a	Quadríceps	Endo: P Peri: P	A	Pred.Tipo I	P	P	M
15	17a	Deltoide	Endo: P	A	Pred.Tipo I	P	P	D
16	17a	Bíceps	Peri: P	P	Normal	P	P	M
17	12a	Bíceps	N.A	A	Pred.Tipo I	N.A	P	D
18	5a	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	-----

P= presente; A= ausente; a= anos; N.A = não analisado; N.R = não realizado; M= miopático; D= distrófico; Pred= predomínio.

Dos 18 pacientes incluídos neste estudo somente o paciente 03 não realizou biópsia muscular. O estudo histoquímico foi realizado em fragmentos musculares extraídos de músculo bíceps, quadríceps ou deltoide. Não foi possível analisar as lâminas dos pacientes 02, 10, 14 e 18, uma vez que foram submetidos à biópsia muscular em outros centros de pesquisa e os resultados apresentados foram obtidos de informações contidas no laudo da biópsia. Entre os 13 pacientes que tiveram suas biópsias musculares realizadas no Hospital das Clínicas da UFMG e no Centro de Estudos do Genoma Humano, pode-se verificar que 12 deles apresentavam proliferação de tecido conjuntivo perimisial e/ou endomisial. Entre as alterações da citoarquitetura interna observou-se a presença de minicores, *moth eaten* e *cores* de forma isolada ou associada em 10 pacientes. Em todos os pacientes cujas biópsias foram analisadas houve variação no calibre das fibras musculares. Com exceção do paciente de número 04, nos demais notou-se internalização nuclear. O padrão das biópsias musculares foi classificado como miopático em nove e distrófico em cinco pacientes.

Quanto à proporção do tipo de fibras, constatou-se proporção adequada de tipo de fibras em três pacientes e predomínio de fibras tipo I em nove.

A idade da realização das biópsias variou de um a 31 anos.

5.4 Estudo do DNA

Os dados referentes ao estudo molecular encontram-se detalhados em forma de quadro no APÊNDICE E, com informações sobre as mutações e os polimorfismos encontrados em cada paciente.

O estudo molecular foi realizado em todos os 18 pacientes incluídos no estudo e, entre estes, encontraram-se mutações em oito, que serão detalhadas a seguir.

5.4.1 Análise das mutações encontradas

Pacientes: 01, 02 e 03

Trata-se de três irmãos de uma mesma prole, com fenótipo clínico de distrofia muscular congênita tipo espinha rígida.

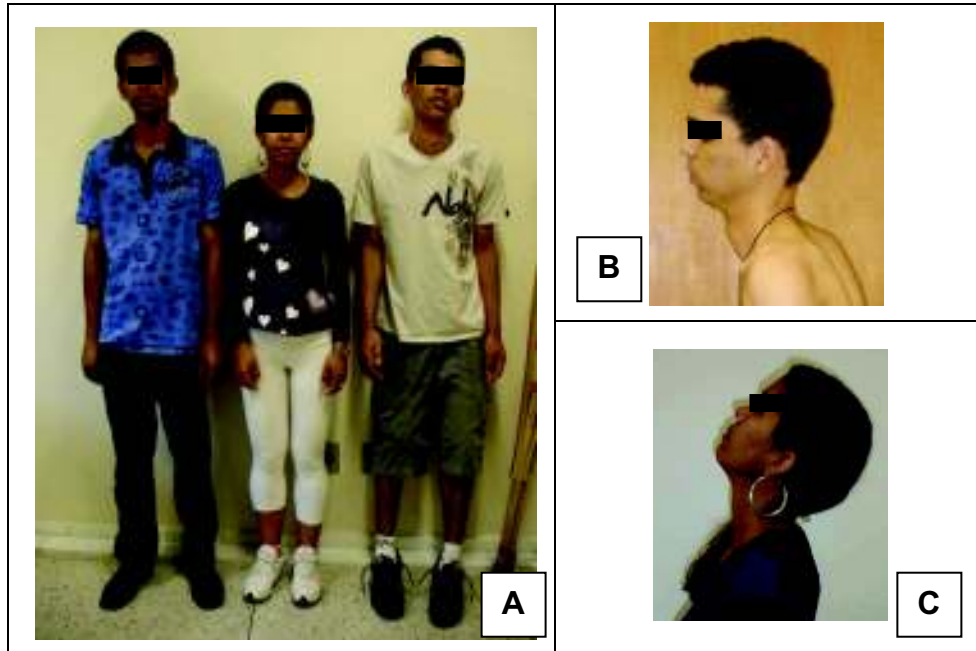


Figura 1 - Três irmãos afetados apresentando fraqueza muscular proximal e rigidez cervical, fenótipo de distrofia muscular congênita forma espinha rígida e comprometimento ventilatório leve (A). Demonstração da rigidez cervical (B, C).

O estudo molecular revelou uma inserção GAG no éxon 4 (c438-439 Ins.GAG), em heterozigose nos três irmãos (Figura 1). Não há descrição dessa alteração na literatura. O estudo nos pais revelou inserção em homozigose no pai e ausência da mesma na mãe. O pai foi avaliado clinicamente e não foram encontradas anormalidades no seu exame físico e neurológico, exceto pela presença de discreta escoliose torácica.

A pesquisa dessa inserção em 100 controles normais revelou sua presença em dois indivíduos, em heterozigose (APÊNDICE B).

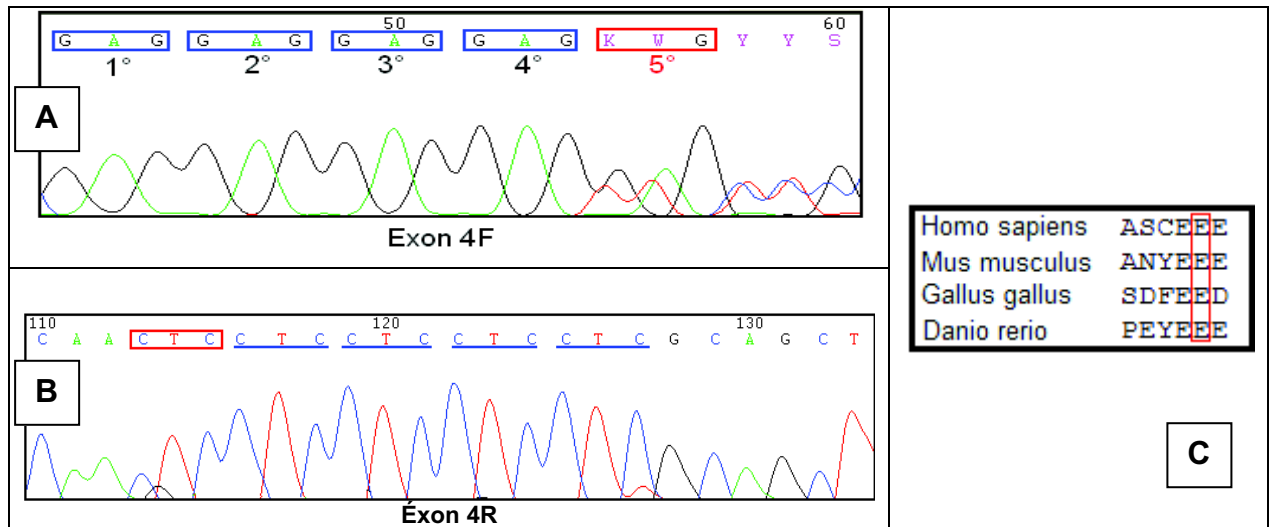


Figura 2 - Cromatograma da família 01 demonstrando a mutação c438-439 Ins.GAG (pE143Y), em heterozigose (A). Nota-se a inserção GAG encontrada no pai em homozigose (visto pelo reverse) (B). Demonstra o estado de conservação da mutação c438-439 Ins.GAG (pE143Y) (C)

Paciente: 04

Trata-se de paciente com fenótipo de miopatia multiminicore, forma clássica.

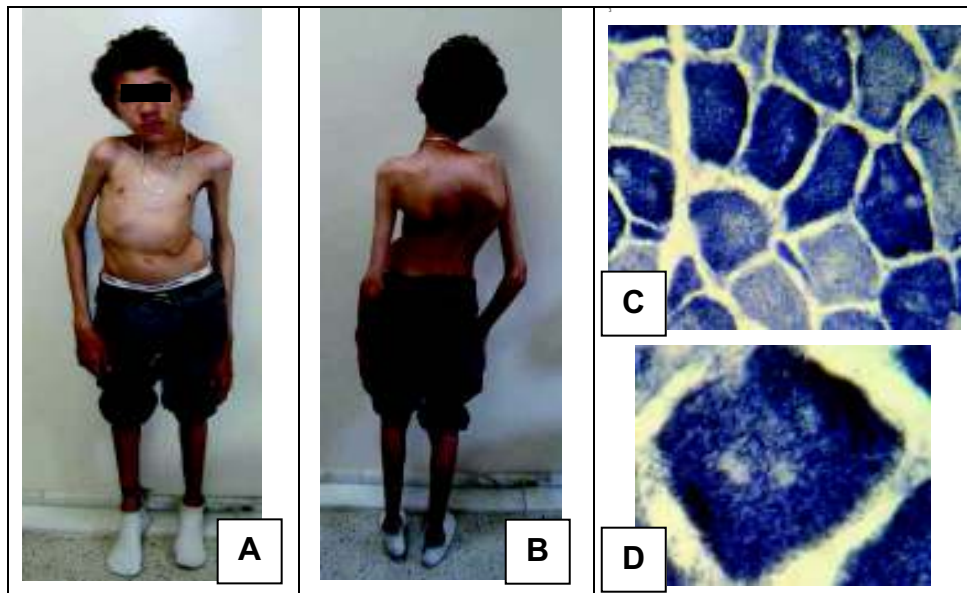


Figura 3 - Paciente aos 13 anos de idade portador de miopatia multiminicore forma clássica (A e B), com acentuação da escoliose e agravamento do comprometimento ventilatório. Reação histoquímica NADH, revelando a presença de multiminicores (C e D).

O estudo molecular revelou a presença de mutações em heterozigose composta. Uma das mutações consiste na troca de uma timina por uma guanina no nucleotídeo 1384 do cDNA no éxon 10, levando à troca do códon da selenocisteína por uma glicina na região 426 da proteína (c1384 T→G*/ (pU426G). Tal mutação foi descrita na literatura e é considerada patogênica⁷.

A segunda mutação consiste na troca de uma guanina por uma timina nucleotídeo 1010 do cDNA no éxon 7, que leva à troca de uma arginina por uma metionina no aminoácido 337 da proteína (c1010 G→T* / pR337M). Essa mutação não foi descrita na literatura até o presente momento. Analisando o estado de conservação desse aminoácido entre as espécies, observa-se que ele é altamente conservado. O estudo em 100 controles normais não revelou essa mutação nas amostras estudadas (APÊNDICE B).

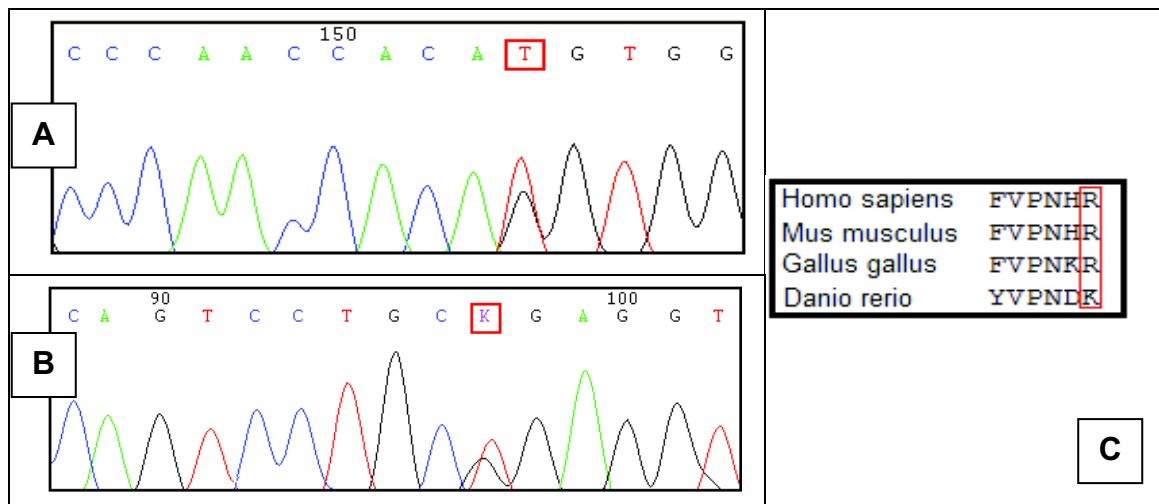


Figura 4 – Cromatograma do paciente 04 apresentando mutações em heterozigose composta nos éxons 7 e 10, respectivamente (A e B), e estado de conservação da mutação c1010 G→T (pR337M) (C).

Pacientes: 14 e 17

Trata-se de dois pacientes não aparentados com fenótipo de distrofia congênita tipo espinha rígida nos quais foram encontradas as mesmas alterações.

O estudo molecular revelou a inserção de uma base (adenina) fora de fase em heterozigose entre os nucleotídeos 713 e 714 do cDNA no éxon 5 do gene (c713-714isnA), que é uma mutação considerada patogênica na literatura. Em

ambos os pacientes não foi possível a identificação da mutação complementar no outro alelo.

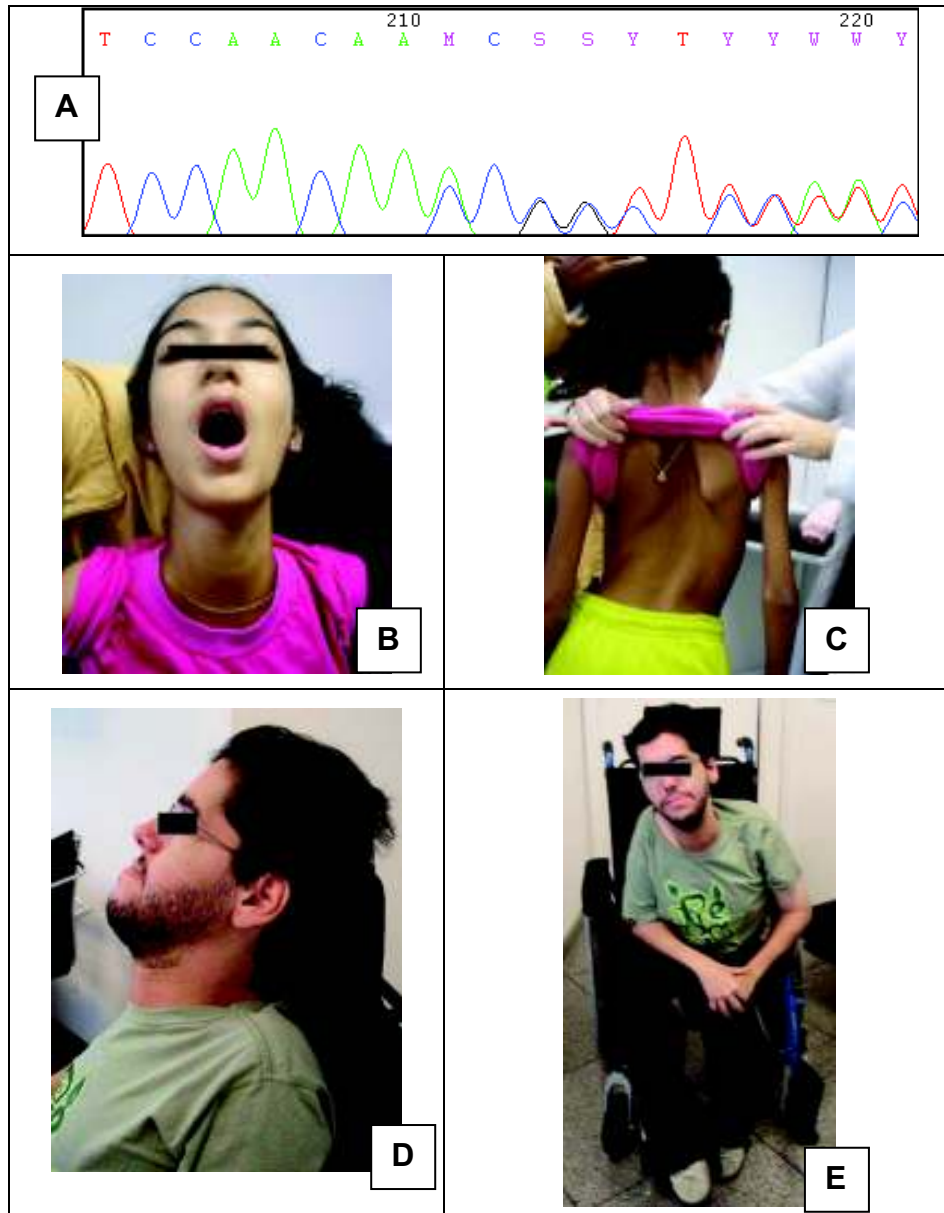


Figura 5 - Cromatograma demonstrando mutação c713-714Ins.A (pN238K) no éxon 5 (A). Imagens da paciente 17 (B e C). Imagens do paciente 08 (D e E).

Paciente: 05

Trata-se de paciente com fenótipo de miopatia multimínico-re forma pré-natal com artrogripose múltipla.

O estudo molecular identificou uma mutação *missense* em heterozigose no éxon 5, na qual houve a troca de uma guanina por uma adenina no nucleotídeo 583 do cDNA, levando à troca de uma alanina por uma treonina no aminoácido 195 da proteína. Tal alteração não foi descrita previamente na literatura e também não foi encontrada em 100 controles normais (APÊNDICE B). O estudo molecular foi realizado nos pais do paciente e identificou-se a mesma mutação em heterozigose no pai, o qual é assintomático. Não foi encontrada outra mutação no segundo alelo do paciente.

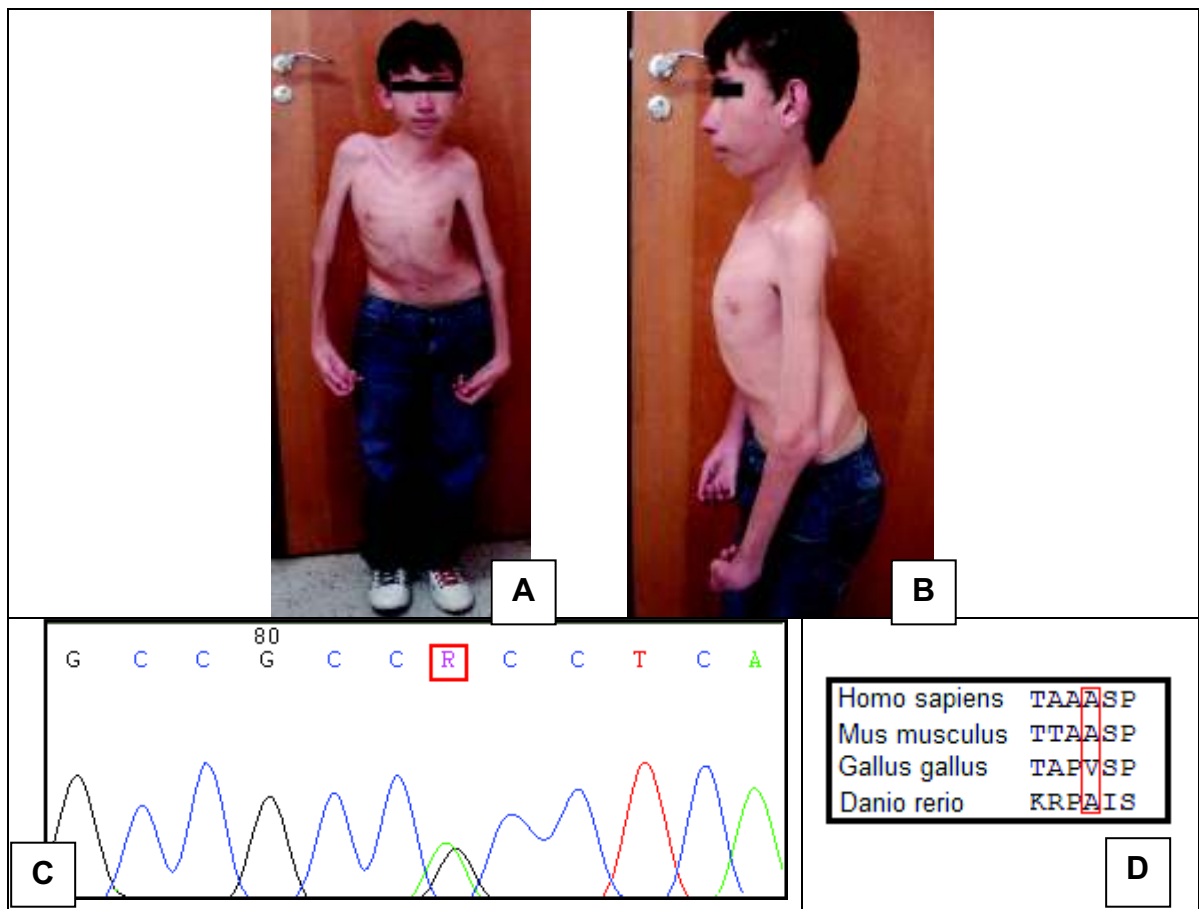


Figura 6 - Paciente aos 12 anos de idade portador de miopatia multiminicore forma pré-natal com artrogripose. Apresenta também acentuação da escoliose e agravamento do comprometimento ventilatório (A e B). Cromatograma demonstrando a mutação c583 G→A* (pA195T) em heterozigose no éxon 5 (C). Demonstra o estado de conservação da mutação apresentada (D).

Paciente: 08

Trata-se de paciente apresentando diagnóstico clínico e histopatológico compatível com miopatia com desproporção congênita de fibras.

O estudo molecular revelou a inserção de 12 bases na região c136-137 do cDNA no éxon 1. Tal inserção encontra-se em fase e não inclui um códon de parada de leitura. Não foi possível detectar anormalidades no outro alelo do paciente ao longo dos éxons estudados.

Essa inserção não foi descrita na literatura até o presente momento e não foi identificada em 100 controles normais (APÊNDICE B).

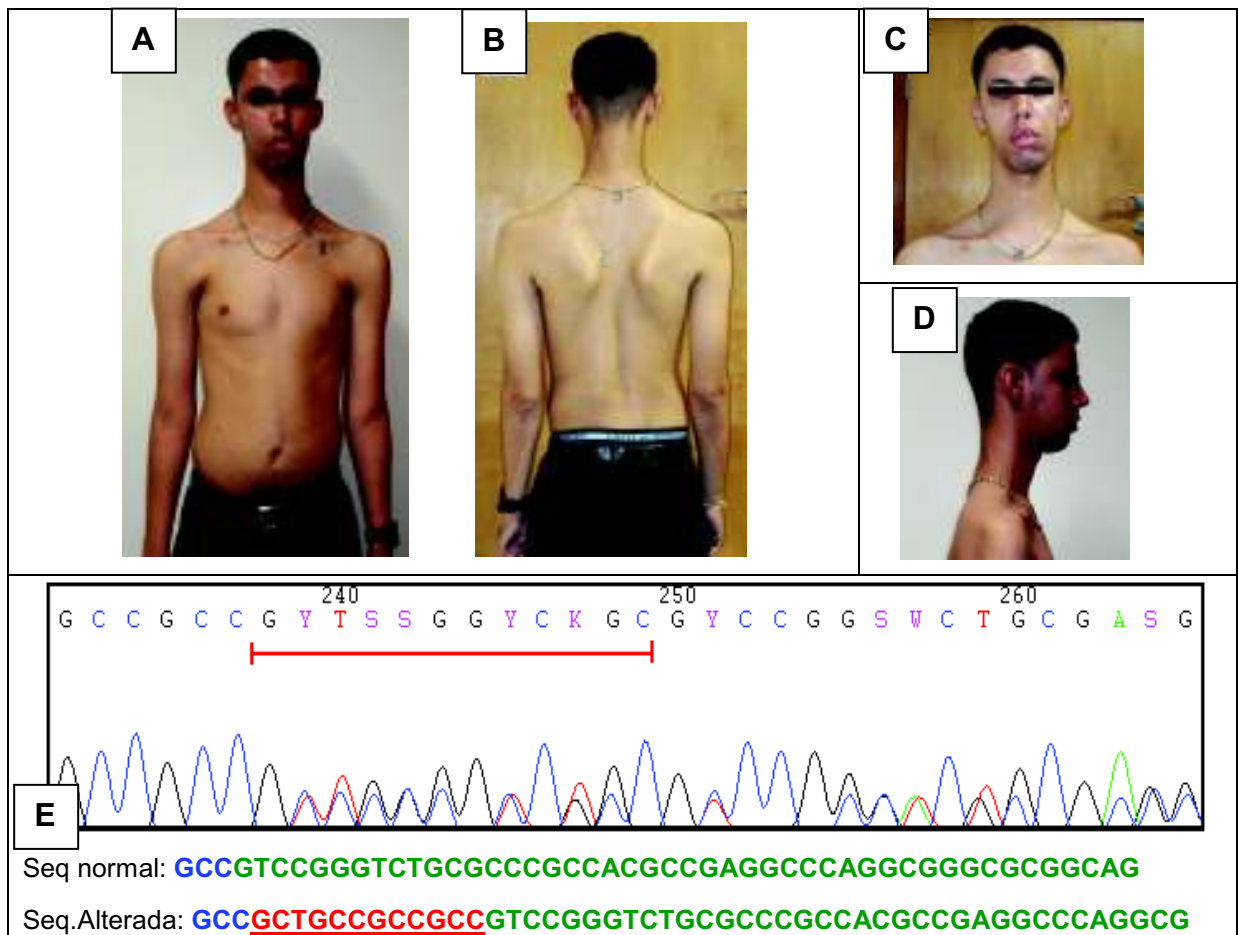


Figura 7 - Paciente aos 30 anos de idade portador de MDCF, com escoliose, rigidez cervical, comprometimento ventilatório e face alongada (A, B, C e D). Cromatograma demonstrando a mutação c316-317Ins.12bp em heterozigose no éxon 1 (E).

5.4.2 Estudo das mutações encontradas em controles normais

Todas as alterações encontradas neste estudo que ainda não haviam sido relatadas na literatura como patogênicas, variantes ou polimorfismos foram analisadas em amostras de um banco de controles normais do Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo. Foram analisadas 100 amostras de indivíduos relacionados como normais para cada mutação encontrada (APÊNDICE B). A síntese dos resultados segue descrita na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados de controles normais

Éxon	Alteração	Frequência em controles normais (100 amostras)
1	C316-317 Ins12bp	0%
4	Inserção de GAG	2%
5	c582 G→A (pA195T)	0%
7	c1010 G→T (pR337M)	0%

5.4.3 Relação de polimorfismos encontrados

Além das alterações patogênicas encontradas e já descritas anteriormente neste trabalho, algumas sequências variantes também foram identificadas nos estudos dos 18 pacientes incluídos nesta pesquisa (Tabela 2) (SEPN1-OMIN: 606210; GenBank Accession number: AJ306399) (SEPN1 cDNA Sequence), AJ 306398 (SEPN1 *genomic sequence*).

TABELA 2 - Descrição de variantes identificadas

Éxon	Alteração	Classificação	Quantidade de pacientes com tal alteração (dos 18 pacientes estudados)			
4	c425 G→A (pC143Y)	Polimorfismo	17	8	9*	94,44%
5	c729 G→A pP243P)	Polimorfismo	1	----	1*	5,55%
8	C1015 T→C pL339L)	Polimorfismo	1	----	1*	5,55%
9	c1173 T→C (pP341P)	Polimorfismo	15	9	6*	83,33%
12	c1506 C→A (pN503K)	Polimorfismo	14	8	6*	77,77%

* = Heterozigose

5.5 Discussão

O presente estudo incluiu 18 pacientes com quadro clínico e histopatológico de miopatias relacionadas ao gene *SEPN1*. Entre eles, 10 tinham diagnóstico de distrofia muscular congênita tipo espinha rígida, sete com miopatia congênita tipo multiminicore e um com miopatia congênita com desproporção congênita de fibras. Na literatura não há estudos relacionando a frequência destas formas de miopatias, que são, de forma geral, consideradas raras.

As miopatias relacionadas à selenoproteína apresentam herança autossômica recessiva ou podem configurar casos esporádicos^{22,23}. Todos os pacientes incluídos no estudo, exceto o caso 15, tinham pais assintomáticos compatíveis com o tipo de herança associada ao gene *SEPN1*.

Todos os pacientes foram submetidos ao estudo molecular e oito deles apresentaram mutações no gene da *SEPN1*, sendo cinco portadores de distrofia congênita com espinha rígida, dois com miopatia multiminicore (um com a forma clássica - caso 4 - e outro com a forma pré-natal com artrogripose múltipla - caso 5) e um paciente com desproporção congênita de fibras. Tais achados estão de acordo com os dados da literatura, que demonstram que mutações no gene *SEPN1* estão associadas a diferentes formas de miopatias^{1,8}. No entanto, não há estudos que indiquem qual forma de miopatia relacionada à selenoproteína N é a mais frequente. Além disso, ressalta-se que o número de mutações patogênicas encontradas foi superior ao da maioria dos trabalhos descritos, que utilizaram critérios de inclusão semelhantes para a seleção dos pacientes. Há registro de um estudo no qual foram incluídos 11 pacientes e apenas em um encontrou-se mutação no gene *SEPN1*²⁴. Isto pode refletir uma incidência mais alta dessas miopatias em nosso meio ou um viés do nosso centro de referência.

Entre as mutações do gene *SEPN1* encontradas na presente amostra descreve-se a inserção de uma adenina do éxon 5 do gene (c713-714insA). Essa alteração é considerada patogênica e foi descrita inicialmente em 2002 em dois pacientes franceses com miopatia multiminicore não aparentados, sendo que em um deles apresentava-se homozigose e no outro heterozigose composta⁷. Posteriormente, foi detectada essa mesma mutação em heterozigose composta em um garoto cujo fenótipo clínico não pôde ser diferenciado entre DMER e

multiminicore²⁴. Também em 2008 foi constatada essa mesma alteração em quatro pacientes com DMER, dos quais dois a apresentaram em heterozigose composta, enquanto em outros dois pacientes não foi possível identificar a mutação complementar no outro alelo²⁵. Em nossa amostra, esta mutação foi encontrada em dois pacientes com fenótipo de distrofia tipo espinha rígida, em heterozigose, sem identificação da segunda mutação. Nota-se que tal mutação foi referenciada na literatura tanto em pacientes com miopatia multiminicore como com DMER e que em um dos casos houve sobreposição dos dois fenótipos. Uma vez que essa mutação é considerada patogênica, nossos pacientes exibiram fenótipo clínico e histopatológico compatível com miopatias relacionadas ao gene *SEPN1*, podendo-se associá-la a provável defeito genético nesses pacientes. Deve-se, ainda, considerar a possibilidade de que o outro alelo tenha alterações em regiões intrônicas não avaliadas neste trabalho, mas sabidamente importantes para a função da proteína, como a região SECIS, local onde já foi reportada uma mutação patogênica²⁶.

No caso 04, foram identificadas mutações em heterozigose composta. Uma das mutações encontradas é a c1384 T→G (pU426G), localizada no éxon 10, que havia sido referida previamente em dois pacientes de uma família portuguesa com miopatia multiminicore, em homozigose⁷. Esta mutação transforma o códon da selenocisteína em uma glicina, na região 462 da proteína. Esta região tem importante função na proteína, pois carrega o códon da selenocisteína (TGA), que é o sítio catalítico da selenoproteína. A segunda mutação encontrada em nosso paciente foi a c1010 G→T*, no éxon 7, não registrada anteriormente na literatura. Tal alteração leva à troca de uma arginina por uma metionina na posição 337 da proteína, região altamente conservada entre as espécies. Além disso, a arginina é um aminoácido básico e hidrófilo, enquanto a metionina é um aminoácido apolar e hidrofóbico. A troca desses aminoácidos pode trazer alteração na estrutura da proteína e, conseqüentemente, em sua função. Ressalta-se, ainda, que essa mutação não foi identificada em 100 controles normais avaliados. Portanto, pode-se sugerir que o paciente 04 é portador de miopatia multiminicore causada pelas mutações c1010 G→T / c1384 T→G*, em heterozigose composta, no gene *SEPN1*.

Outra alteração encontrada no presente estudo consiste de uma inserção de 12 bases no éxon 1 (c317-318ins12bp) do gene *SEPN1*, identificada no paciente

08. Essa inserção encontra-se em fase e não possui um códon de parada de leitura. No outro alelo do paciente não foram encontradas anormalidades ao longo dos éxons investigados. A possível consequência dessa inserção seria a produção de uma proteína contendo elevado número de aminoácidos, o que poderia ou não alterar a sua função. Essa inserção não foi descrita previamente na literatura e não foi identificada em 100 controles normais analisados. O éxon 1 do gene *SEPN1* pode ser considerado um *hot spot* para mutações, uma vez que já foram detectadas aproximadamente 15 mutações nessa região tanto em heterozigose quanto em homozigose^{1,6,7,21,25,27,28}. Um paciente foi identificado com mutação em heterozigose composta caracterizada por uma mutação nova no éxon 1 e outra na região do elemento de redefinição da selenocisteína (ERS)²⁹. O paciente 08 da presente amostra apresentou diagnóstico clínico e histopatológico compatível com MDCF. Clinicamente manifestou fraqueza muscular apendicular discreta, com significativo comprometimento da função ventilatória (CV= 47% do previsto). O estudo da alteração encontrada está sendo feito nos pais do paciente para melhor esclarecimento quanto à sua patogenicidade.

O paciente 05, classificado como portador de miopatia multiminicore forma pré-natal com artrogripose múltipla distal, apresentou uma mutação *missense*, em heterozigose, no éxon 5 caracterizada pela troca de uma guanina por uma adenina no nucleotídeo 583 do cDNA, levando à substituição de uma alanina por uma treonina no aminoácido 195 da proteína. Deve-se ressaltar que a alanina e a treonina são aminoácidos com características estruturais diferentes classificados como aminoácido apolar e polar neutro, respectivamente. Tal alteração não foi descrita previamente na literatura e também não foi encontrada em 100 controles normais. No entanto, ao testar os pais do paciente identificou-se a mesma mutação em heterozigose no pai, o qual é assintomático. Não foi identificada outra mutação no segundo alelo do paciente e, conseqüentemente, não pôde ser confirmada heterozigose composta. Por outro lado, não se pode excluir a possibilidade de mutações intrônicas no outro alelo. Desta forma, estudos funcionais ou de RNAm serão necessários para melhor compreensão deste caso.

Foi encontrada a inserção de um códon extra GAG, (c438-439 Ins.GAG) em fase e em heterozigose numa família de três irmãos, sendo uma paciente do sexo feminino e dois do sexo masculino. Tal alteração não havia sido documentada

ainda na literatura. O estudo dos pais desses pacientes revelou que a mãe não tinha tal alteração, porém a mesma inserção foi encontrada no pai, em homozigose. O pai foi avaliado clinicamente e não havia indícios de fraqueza ou hipotrofia muscular, sendo observado somente leve escoliose. O estudo realizado em 100 controles normais revelou essa inserção em dois indivíduos, o que sugere que este é um polimorfismo. Analisando mais detalhadamente o fenótipo clínico e os exames dos pacientes, observa-se que o comprometimento ventilatório é leve e os níveis de CPK muito elevados, achados raramente observados em pacientes com miopatia relacionada à selenoproteína N.

Os pacientes da presente amostra que não apresentaram mutações no gene *SEPN1* eram portadores das formas DMER e miopatia multiminicore. Em relação à DMER, deve-se considerar que a rigidez cervical, achado clínico importante no seu diagnóstico, pode ser observado em outras doenças musculares, uma vez que ela é consequência da substituição dos músculos extensores da coluna vertebral por tecido fibroso e gorduroso levando ao seu encurtamento³⁰. Desta forma, destaca-se que a rigidez cervical é um achado inespecífico e na presente casuística foi observado em 16 dos 18 pacientes. Considerando-se a miopatia multiminicore, ressalta-se que esta é uma condição que apresenta heterogeneidade fenotípica e genética. Entre os sete pacientes com essa miopatia, dois casos (6 e 13) não apresentavam rigidez cervical e tinham um fenótipo semelhante caracterizado por fraqueza distal em membros superiores, configurando a forma moderada da miopatia multiminicore, com envolvimento de mãos. De acordo com dados da literatura, essa forma associa-se a mutações no gene *RYR1* e, portanto, não era esperado o encontro de mutações no gene *SEPN1*^{10,31}.

Quanto aos dados da anamnese, nota-se que, de forma geral, a idade de início dos sintomas variou do nascimento até os sete anos de vida, porém, a maioria manifestou os primeiros sintomas nos primeiros anos de vida. Tal achado é consequência dos critérios de inclusão utilizados, uma vez que as miopatias relacionadas à seleproteína N são formas de miopatias ou distrofias congênitas e, assim, o início dos sintomas ocorre nos primeiros anos de vida³². Por outro lado, fica evidente a diferença em relação à idade do diagnóstico, que variou de um a 18 anos. Tais dados revelam a dificuldade de se estabelecer o diagnóstico dessas condições, que possivelmente está relacionada à escassez de centros de

referência que disponibilizem avaliação clínica especializada associada ao estudo histopatológico muscular com técnicas de histoquímica e imuno-histoquímica.

A avaliação respiratória foi feita na maioria dos pacientes. Entre os pacientes do presente estudo com mutação no gene *SEPN1*, todos apresentavam comprometimento ventilatório restritivo com CV entre 27 e 47% do volume previsto. Já naqueles com ausência de mutações no gene *SEPN1*, a CV mostrou valores mais altos, variando de 43 a 107%. Nesse grupo destaca-se o caso 7, o único indivíduo da amostra com avaliação da função pulmonar normal. De forma semelhante, os irmãos com o polimorfismo c438-439InsGAG também apresentaram menos comprometimento da CV. Tal dado clínico apontava para uma menor associação ao gene *SEPN1*, uma vez que, de acordo com dados da literatura, as miopatias associadas à *SEPN1* cursam com comprometimento ventilatório precoce e grave^{10,32}.

Em relação à investigação cardiológica, todos os pacientes avaliados, portadores ou não de mutações no gene *SEPN1*, apresentaram fração de ejeção normal. Tal achado era esperado nas diferentes formas de miopatias incluídas no estudo. Por outro lado, destaca-se que as formas de miopatia multiminicore relacionada aos genes *TITIN* e *SCAD* cursam com miocardiopatia. Portanto, entre os pacientes com miopatia multiminicore da presente amostra, que não mostraram alterações no gene *SEPN1*, a associação com o gene *TITIN* ou *SCAD* é menos provável devido à ausência de envolvimento cardíaco¹¹⁻¹³.

Quanto aos exames complementares avaliados, nota-se a variabilidade nos níveis séricos da CPK. Entre os pacientes com mutações patogênicas no gene *SEPN1* (casos 04, 05, 08, 14 e 17), observa-se que os valores de CPK encontravam-se normais ou discretamente aumentados. Por outro lado, os maiores aumentos de CPK foram detectados em pacientes sem mutações patogênicas no gene *SEPN1* (casos 1, 2, 3 e 16). Tais achados vão ao encontro dos dados da literatura, que mostram que as miopatias relacionadas à selenoproteína frequentemente apresentam níveis de CPK normal ou com aumentos discretos^{14,33}.

A análise histopatológica muscular do presente estudo mostrou achados compatíveis com os dados da literatura^{23,32}. Os pacientes 14 e 17, com DMER e mutação patogênica c713-714Ins.A no éxon 5 do gene *SEPN1*, apresentavam à biópsia muscular um padrão distrófico. Os pacientes 4 e 5 portadores de miopatia

multiminicore, formas clássica e pré-natal com artrogripose, exibiram à biópsia muscular um padrão miopático com predomínio de fibras tipo I e presença de minicores. O caso 8, portador de miopatia com desproporção congênita de fibras, também mostrou padrão miopático, predomínio de fibras tipo I, porém sem minicores, conforme o que é classicamente descrito nessa forma de miopatia⁸. Já entre os três irmãos com o polimorfismo c438-439InsGAG, apenas o irmão com fenótipo mais grave foi submetido à biópsia muscular no nosso centro de pesquisa e neste foi observado padrão miopático, sem minicores, com *moth eaten*, que é um achado inespecífico. Entre os pacientes sem mutações no gene *SEPN1*, destacam-se os casos 12 e 13, cuja biópsia muscular revelou padrão miopático com minicores associados a *cores*, o que pode ser um indício de mutações no gene *RYR1*¹⁰.

5.6 Conclusão

A presente pesquisa realizou o estudo de mutações do gene *SEPN1* em um grupo de pacientes brasileiros portadores de miopatias relacionadas à selenoproteína N, provenientes de diferentes regiões do país. Foram identificadas seis mutações em oito pacientes dos 18 incluídos na amostra, sendo cinco portadores de distrofia congênita com espinha rígida, dois com miopatia multiminicore (um com a forma clássica - caso 4 e outro com a forma pré-natal com artrogripose múltipla - caso 5) e um paciente com desproporção congênita de fibras.

Entre as seis mutações encontradas, duas (c1384 T→G e c713-714InsA) já haviam sido previamente descritas na literatura como patogênicas, em pacientes com DMER e miopatia multiminicore^{7,24,25}. Em relação às outras quatro alterações, não foram encontrados registros na literatura. A mutação c1010G→T foi encontrada em heterozigose composta com a mutação patogênica c1384T→G em um paciente com miopatia multiminicore, sendo considerada, devido às suas características e ausência em controles normais, uma mutação nova patogênica. A inserção GAG no éxon 4 pode ser considerada um polimorfismo, uma vez que foi encontrada em homozigose em um dos pais assintomáticos e em 2% dos controles

normais. As outras duas mutações c583 G→A e c316-317Ins12bp necessitam de outros estudos para melhor esclarecimento quanto à sua patogenicidade.

Algumas características clínicas devem ser ressaltadas. A rigidez cervical mostrou-se um sinal inespecífico, pois foi identificado na maioria dos pacientes, com e sem mutações no gene da *SEPN1*. O comprometimento da função ventilatória mostrou-se mais acentuado, enquanto que os níveis de CPK estavam normais ou discretamente aumentados entre os pacientes com mutações no gene da *SEPN1*.

Em conclusão, o presente estudo identificou pacientes brasileiros com mutações no gene da *SEPN1* que apresentam fenótipo semelhante aos casos descritos na literatura. Ressalta-se que o estudo molecular em pacientes com as diferentes formas de miopatias relacionadas à selenoproteína N é essencial para a identificação do defeito genético e consequente aconselhamento genético. A avaliação clínica e histopatológica, apesar de fundamental, não é suficiente devido à grande variabilidade fenotípica e genética que cerca tais formas de miopatias.

Referências

1. Moghadazadeh B, Petit N, Jaillard C, Brockington M, Roy SQ, Merlini L, *et al.* Mutations in *SEPN1* cause congenital muscular dystrophy with spinal rigidity and restrictive respiratory syndrome. *Nat Genet* 2001; 29:17-18.
2. Moghadaszadeh B, Beggs AH. Selenoproteins and their impact on human health through diverse physiological pathways. *Physiology (Bethesda)* 2006 Oct; 21:307-15.
3. Arbogast S, Beuvin M, Fraysse B, Zhou H, Muntoni F, Ferreiro A. Oxidative stress in *SEPN1*-related myopathy: from pathophysiology to treatment. *Ann Neurol* 2009 Jun; 65(6):677-86.
4. Arbogast S, Ferreiro A. Selenoprotein and protection against oxidative stress: selenoprotein N as a novel player at the crossroads of redox signaling and calcium homeostasis. *Antioxid Redox Signal* 2010; 12(7):893-904.
5. Moghadaszadeh B, Desguerre I, Topaloglu H, Muntoni F, Pavsek S, Sewry C, *et al.* Identification of a new *locus* for a peculiar form of congenital muscular dystrophy with early rigidity of the spine, on chromosome 1p35-36. *Am J Hum Genet* 1998 Jun; 62(6):1439-45.

6. Ferreira A, Ceuterick de Groote C, Marks JJ, Goemans N, Schreiber G, Hanefeld F, *et al.* Desmin-related myopathy with Mallory body-like inclusions is caused by mutations of the selenoprotein N gene. *Ann Neurol* 2004; 55 (5):676-86.
7. Ferreira A, Quijano Roy S, Pichereau C, Moghadazadeh B, Goemans N, Bonnemann C, *et al.* Mutations of the selenoprotein N gene, which is implicated in rigid spine muscular dystrophy, cause the classical phenotype of multiminicore disease: reassessing the nosology of early-onset myopathies. *Am J Hum Genet* 2002, 71: 739-749.
8. Clarke NF, Kidson W, Quijano-Roy S, Estounet B, Ferreira A, Guicheney P, *et al.* SEP1: associated with congenital fiber-type disproportion and insulin resistance. *Ann Neurol* 2006 Mar; 59 (3):546-52.
9. Dubowitz V. Rigid spine syndrome: a muscle syndrome in search of a name. *Proc R Soc Med* 1973; 66(3):219-20.
10. Sewry CA, Jimenez-Mallebrera C, Muntoni F. Congenital myopathies. *Current Opinion in Neurology* 2008; 21(5):569-575.
11. Carmignac V, Salih MA, Quijano-Roy S, Marchand S, Al Rayess MM, Mukhtar MM, *et al.* C-terminal titin deletions cause a novel early-onset myopathy with fatal cardiomyopathy. *Ann Neurol* 2007 Apr; 61(4):340-51.
12. Tein I, Elpeleg O, Ben-Zeev B, Korman SH, Lossos A, Lev D, *et al.* Short-chain acyl-CoA dehydrogenase gene mutation (c.319C>T) presents with clinical heterogeneity and is candidate founder mutation in individuals of Ashkenazi Jewish origin. *Mol Genet Metab* 2008 Feb; 93(2):179-89.
13. Tein I, Haslam RH, Rhead WJ, Bennett MJ, Becker LE, Vockley J. Short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: a cause of ophthalmoplegia and multicore myopathy. *Neurology* 1999 Jan 15; 52(2):366-72.
14. PubMed. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: abril de 2011.
15. Engel AG, Gomez MR, Groover RV. Multicore disease. A recently recognized congenital myopathy associated with multifocal degeneration of muscle fibers. *Mayo Clin Proc* 1971 Oct; 46(10):666-81.
16. Brooke MH. Congenital fiber type disproportion. *In*: Kakulas BA (ed) *Clinical studies in myology. Proceedings of the 2nd International Congress on Muscle Diseases, held in Perth, Australia, Nov. 22-29, 1971.* *Experta Medica* 147-59, 1973.
17. Cavanagh NP, Lake BD, McMeniman P. Congenital fibre type disproportion myopathy. A histological diagnosis with an uncertain clinical outlook. *Arch Dis Child*.1979 Oct; 54(10):735-43.
18. Clarke NF, North KN. Congenital fiber type disproportion--30 years on. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003 Oct; 62(10):977-89.

19. Laing NG, Clarke NF, Dye DE, Liyanage K, Walker KR, Kobayashi Y, *et al.* Actin mutations are one cause of congenital fibre type disproportion. *Ann Neurol* 2004 Nov; 56(5):689-94.
20. Clarke NF, Kolski H, Dye DE, Lim E, Smith RL, Patel R, *et al.* Mutations in TPM3 are a common cause of congenital fiber type disproportion. *Ann Neurol* 2008, 63(3):329-37.
21. Lescure A, Rederstorff M, Krol A, Guicheney P, Allamand V. Selenoprotein function and muscle disease. *Biochim Biophys Acta* 2009 Nov; 1790(11):1569-74.
22. Carvalho AA. Myopathies. *Revista de Neurociências* 2005 jul/set; 13(3 supl-versão eletrônica),
23. Reed UC. Congenital muscular dystrophy. Part I: a review of phenotypical and diagnostic aspects. *Arquivos de Neuropsiquiatria* 2009; 67(1):144-168.
24. Tajsharghi H, Darin N, Tulinius M, Oldfors A. Early onset myopathy with a novel mutation in the Selenoprotein N gene (*SEPN1*). *Neuromuscul Disord* 2005 Apr; 15(4):299-302.
25. Schara U, Kress W, Bönnemann CG, Breitbach-Faller N, Korenke CG, Schreiber G, *et al.* The phenotype and long-term follow-up in 11 patients with juvenile selenoprotein N1-related myopathy. *Eur J Paediatr Neurol* 2008 May; 12(3):224-30.
26. Allamand V, Richard P, Lescure A, Ledeuil C, Desjardin D, Petit N, *et al.* A single homozygous point mutation in a 3'untranslated region motif of selenoprotein N mRNA causes *SEPN1*-related myopathy. *EMBO Reports* 2006; 7(4):450-4.
27. Okamoto Y, Takashima H, Higuchi I, Matsuyama W, Suehara M, Nishihira Y, *et al.* Molecular mechanism of rigid spine with muscular dystrophy type 1 caused by novel mutations of selenoprotein N gene. *Neurogenetics* 2006 Jul; 7(3):175-83.
28. Cagliani R, Fruguglietti ME, Berardinelli A, D'Angelo MG, Prella A, Riva S, *et al.* New molecular findings in congenital myopathies due to selenoprotein N gene mutations. *J Neurol Sci* 2011 Jan 15; 300(1-2):107-13.
29. Maiti B, Arbogast S, Allamand V, Moyle MW, Anderson CB, Richard P, *et al.* A mutation in the *SEPN1* selenocysteine redefinition element (SRE) reduces selenocysteine incorporation and leads to *SEPN1*-related myopathy. *Hum Mutat* 2009 Mar; 30(3):411-6.
30. Merlini L, Granata C, Ballestrazzi A, Marini ML, 1989 *apud* Moghadaszadeh B, Desguerre I, Topaloglu H, Muntoni F, Pavsek S, Sewry C, *et al.* Identification of a new *locus* for a peculiar form of congenital muscular dystrophy with early rigidity of the spine, on chromosome 1p35-36. *Am J Hum Genet* 1998 Jun; 62(6).
31. Jungbluth H. Multi-minicore disease. *Orphanet J Rare Dis* 2007 Jul; 13(2):31.

32. Laing NG. Congenital myopathies. *Current Opinion in Neurology* 2007; 20(5):583-589.
33. Muntoni F, Voit T. The congenital muscular dystrophies in 2004: a century of exciting progress. *Neuromuscul Disord* 2004 Oct; 14(10):635-49.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente pesquisa envolveu o estudo clínico, histopatológico e genético molecular de pacientes brasileiros com miopatias e distrofias musculares congênitas causadas por mutações no gene *SEPN1*.

Tal estudo foi possível devido à criação de um serviço de Doenças Neuromusculares do Hospital das Clínicas da UFMG, desde 1999, que conta com um ambulatório onde é feita a avaliação clínica e o acompanhamento a esses pacientes. Além disso, foi implantado um laboratório de investigação histopatológica muscular no qual são desenvolvidas reações histoquímicas e imuno-histoquímica e mais recentemente estudos moleculares de pacientes com tais doenças.

A avaliação clínica e o acompanhamento aos pacientes são feitos por uma equipe multidisciplinar que conta com médica neuropediatra, pneumologista, cardiologista, fisioterapeuta motora e respiratória, fonoaudiólogo, terapeuta ocupacional, neuropsicólogo e nutricionista. Além da avaliação clínica, os estudos laboratoriais constituem práticas fundamentais para um diagnóstico mais específico das doenças neuromusculares.

Como biomédica e integrante do Grupo Multidisciplinar de Doenças Neuromusculares, desde 2007 desenvolvo as atividades laboratoriais desse serviço, o que permitiu a realização deste estudo.

Esta é a primeira dissertação de mestrado desenvolvida nesse grupo que envolveu a realização de estudos moleculares em doenças neuromusculares. A pesquisa foi feita em colaboração com o Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo, através de colaboração com a Prof^a. Dr^a. Mariz Vainzof, cujo apoio e suporte para as pesquisas do grupo têm sido fundamentais e vêm permitindo a consolidação do grupo no cenário nacional.

Tal experiência permitiu o aprimoramento das técnicas moleculares, além de abrir possibilidades para novas pesquisas nesta área. Este estudo trouxe benefício também para os pacientes e seus familiares, uma vez que foi feito um laudo com os dados do estudo molecular para cada participante, assim como o aconselhamento genético familiar.

APÊNDICES E ANEXOS

APÊNDICE A - PROTOCOLO AVALIATIVO DE PACIENTES COM DOENÇAS MUSCULARES

Projeto: “ESTUDO DE MUTAÇÕES NO GENE *SEPN1* EM PACIENTES BRASILEIROS PORTADORES DE MIOPATIAS E DISTROFIAS MUSCULARES CONGÊNITAS”

Mestrado em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da UFMG
 Área de Concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Pesquisadores: Eralda Luíza Castro Concentino
 Prof^a. Dr^a. Juliana Gurgel Giannetti

Nome:	RG:
Data de nascimento/Idade:	Sexo
Data da 1º consulta:	
Nome dos pais:	Idade dos pais:
Endereço:	Estado:
Tels:	Cep:

Diagnóstico provável: _____

Diagnóstico definitivo: _____

Queixa principal: _____

Dados relevantes do quadro clínico:

DNPM: () normal () atrasado

Sustento cefálico:

Em pé sem apoio:

Sentar com apoio:

Andar com apoio:

Sentar sem apoio:

Andar sem apoio:

Em pé com apoio:

Primeiras palavras:

História gestacional:

História pregressa:

História familiar:

consanguinidade: () sim () não

Parentes acometidos:

Heredograma:

*** Exame Físico:**

Peso: _____ (**Pc:** _____)

Estatura: _____ (**Pc:** _____)

- Dismorfismos faciais: _____

- Deformidades da coluna: _____

- Deformidades do tórax: _____

- Deformidades de extremidades:

	Direito	Esquerdo
Mãos		
Dedos		
Pés		
Artelhos		
Outros		

- Alterações cardíacas: _____

Alterações oculares: _____

- Outras alterações: _____

* Exame neurológico: _____ Pc: _____ (Percentil: _____)

- **Psiquismo:** : _____

- **Fácies:** : _____

- **Atitude:** : _____

- **Equilíbrio estático:** _____ **Romberg:** _____

- **Equilíbrio dinâmico** _____

- Marcha

- Marcha na ponta dos pés: () sim () não

- Marcha no calcanhar: () sim () não

* **Força muscular:**

- **Cintura escapular:** levanta MMSS ao nível cotovelo (), ombros (), acima da cabeça () escápula alada: () sim () não

- **Cintura pélvica:** corre () salta ()

sobe escadas: () sem apoio () com apoio

levanta da cadeira: () sem apoio () com apoio

levanta do chão: () sem apoio () com apoio

Músculo	Direito	Esquerdo
Trapézio		
Esternocleidomastoide		
Deltoide		
Bíceps		
Tríceps		
Estiloradial		
Flexor dos dedos		
Glúteo máximo		
Íleopectores		

Quadríceps		
Bíceps femoral		
Tibial anterior		
Gastrocnêmico		
Extensor dos dedos		

Legenda: 0 – sem esboço de contração; 1 – Fraca contração sem movimento; 2 – movimento no plano horizontal; 3 – movimento contra a gravidade; 4 – movimento vencendo pequena resistência; 5 – normal.

*** Miotonia:**

- Ativa: () sim () não

- De percussão: () sim () não

- Músculos: _____

*** Reflexos profundos**

	Direito	Esquerdo
Bíceps		
Tríceps		
Estilradial		
Adutor da coxa		
Patelar		
Aquileu		

nl: normal; - : hipo; + : vivos; e: exaltado.

***Reflexo cutâneo plantar:** _____

*** Tônus e trofismo:**

Tônus	Difusa	Proximal	Distal
Hipotonia			
Hipertonia			
Trofismo	Difuso	Proximal	Distal
Hipotonia			
Hipertonia			

+: leve; ++ : moderada; +++ : acentuada

*** Sensibilidade:** _____

*** Nervos cranianos:**

- alterações MOE:

- ptose palpebral:

- paresia facial:

- paresia *orbicular oris*:

- outros:

*** Retrações fibrotendíneas:**

Aquileu	Poplítea	Coxofemoral	Ombros	Cotovelos	Punhos	Dedos

Exames complementares:

Exames:	Valores de Referência:	Data: <u> </u> / <u> </u> / <u> </u>	Data: <u> </u> / <u> </u> / <u> </u>	Data: <u> </u> / <u> </u> / <u> </u>	Data: <u> </u> / <u> </u> / <u> </u>
CPK					
DHL					
Aldolase					
TGO					
TGP					
Lactato					
pH					
Bic					
BE					
pO ₂					
pCO ₂					
SatO ₂					

DHL = Desidrogenase láctica;

ENMG: (Data: / /)

T. Crânio : (Data: / /)

RM de crânio: (Data: / /)

Avaliação cardiológica: (Data: / /)

ECG: _____

Rx de tórax: _____

Eco: _____

Avaliação da função pulmonar: (Data: / /)

Espirometria:

Avaliação oftalmológica: (Data: __/__/__)

Biópsia muscular: (Data: __/__/__)

Estudo histoquímico:

Estudo imuno-histoquímico:

Estudos moleculares - DNA:(Data: __/__/__)





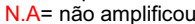
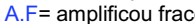
Demais exames:

_____ : (Data: __/__/__)

**APÊNDICE B - Controles Normais: Pesquisa *SEPN1* - Éxon 4
(Genoma Humano – USP)**

Nº	Nº da alicota e raça	Conc. alicota mãe	Conc. pós-diluição	Data do PCR	Resultado do PCR	Análise Seq.	Mutação c438-439insGAG:	Mutação c425G→A: (Polimorfismo)
01	N062-C	517,43	17,02	15 e 16/10/2010	N.A/A.B	OK	Ausente	Presente
02	N065-C	1022,05	18,85	15/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
03	N066-C	1600,87	33,08	15 e 16/10/2010	N.A/A.B	OK	Ausente	Presente
04	N069-C	159,75	10,70	15/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
05	N079-C	1576,49	24,29	15 e 16/10/2010	N.A/A.B	OK	Ausente	Presente
06	N086-C	936,83	18,30	16/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
07	N091-C	1608,29	24,59	16/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
08	N127-C	851,75	11,90	17/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
09	N142-C	573,93	17,75	17/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
10	N165-N	1515,69	25,19	14/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
11	N167-N	1204,69	23,99	14/10/2010	A.F	RUIM	Ausente	Presente
12	N168-C	931,58	8,11	17/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
13	N170-N	540,91	21,69	17/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
14	N254-N	819,13	9,30	17/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
15	N256-N	903,96	13,66	17/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
16	N265-N	1385,91	28,17	14/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
17	N274-N	193,13	11,38	17/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
18	N292-C	225,74	17,56	17/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
19	N301-C	419,58	12,82	17/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
20	N304-C	737,36	54,25	14/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
21	N306-C	674,89	27,71	17/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
22	N307-N	922,02	27,61	14/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
23	N311-N	2054,54	27,34	17/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
24	N313-N	784,09	18,67	17/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
25	N333-O	2743,82	30,96	14/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
26	N335-O	1025,16	24,05	17/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
27	N402-C	2149,84	35,30	14/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
28	N411-C	1276,71	21,67	17/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
29	N427-C	423,15	45,53	17/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
30	N446-C	500,01	17,79	14/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
31	N448-O	456,33	16,17	14/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
32	N452-C	3361,53	30,38	14/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
33	N603-N	358,65	50,04	17/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
34	N771-N	107,58	4,74	17/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
35	N773-C	1681,22	16,18	17/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
36	N774-C	147,12	8,49	17/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
37	N781-N	112,75	5,66	17/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
38	N782-N	235,76	17,38	17/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
39	N785-C	154,58	18,85	17/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
40	N830-C	477,18	33,08	17/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
41	N832-C	30,95	30,95	17/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
42	N839-C	793,44	10,70	17/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
43	N840-C	337,49	8,80	17/10/2010	A.B	OK	Ausente	Presente
44	N332-O	132,08	-----	18/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
45	N385-C	1001,35	-----	18/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
46	N386-C	657,87	-----	18/10/2010	AB	OK	Presente	Presente
47	N387-C	183,47	-----	18/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
48	N388-C	521,63	-----	18/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
49	N390-N	355,20	-----	18/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
50	N391-C	669,36	-----	18/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
51	N393-C	449,97	-----	18/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
52	N395-N	457,01	-----	18/10/2010	AB	OK	Presente	Presente
53	N396-C	447,45	-----	18/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
54	N407-C	742,38	-----	18/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
55	N408-C	763,06	-----	18/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
56	N410-C	915,75	-----	18/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
57	N412-C	563,16	-----	18/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
58	N414-C	495,75	-----	18/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
59	N422-C	759,02	-----	18/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
60	N423-C	464,31	-----	18/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
61	N424-C	1209,74	-----	18/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
62	N426-C	627,26	-----	18/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
63	N428-N	663,08	-----	18/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente

64	N429-O	507,21	-----	18/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
65	N430-C	529,41	-----	18/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
66	N431-C	526,40	-----	18/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
67	N435-C	436,71	-----	18/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
68	N436-C	2019,45	-----	18/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
69	N444-C	749,41	-----	18/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
70	N445-C	835,02	-----	19/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
71	N446-C	500,01	-----	19/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
72	N448-O	529,66	-----	19/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
73	N453-C	593,74	-----	19/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
74	N454-C	568,06	-----	19/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
75	N455-C	1015,75	-----	19/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
76	N456-C	863,96	-----	19/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
77	N457-C	495,75	-----	19/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
78	N458-C	759,02	-----	19/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
79	N461-N	457,36	-----	19/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
80	N462-C	1209,74	-----	19/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
81	N463-C	627,26	-----	19/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
82	N464-C	665,08	-----	19/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
83	N465-N	482,38	-----	19/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
84	N467-C	686,16	-----	19/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
85	N468-C	456,93	-----	19/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
86	N469-C	1003,48	-----	19/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
87	N470-C	309,68	-----	19/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
88	N472-C	1081,23	-----	19/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
89	N474-C	437,72	-----	19/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
90	N475-C	836,58	-----	19/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
91	N476-C	477,18	-----	19/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
92	N477-N	637,52	-----	19/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
93	N478-C	793,44	-----	19/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
94	N479-N	337,49	-----	19/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
95	N481-N	1139,11	-----	19/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
96	N494-N	826,20	-----	19/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
97	N515-N	483,12	-----	19/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
98	N605-N	447,14	-----	19/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
99	N843-N	837,51	-----	19/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente
100	N844-N	536,62	-----	19/10/2010	AB	OK	Ausente	Presente


Legenda:	
	Negroide: 27 = 27%
	Caucasoide: 67 = 67%
	Oriental: 6 = 6%
	AB= amplificou bem
	N.A= não amplificou
	A.F= amplificou fraco


**Controles Normais: Pesquisa SEP1 - Éxon 1
(Genoma Humano – USP)**

Nº	Nº da alicota e raça	Conc. alicota mãe	Conc. pós-diluição	Data do PCR	Resultado do PCR	Análise - Seq.	Mutação c316-31712bp:
01	N062-C	517,43	17,02	08/04/2011	N.A/A.B	OK	Ausente
02	N065-C	1022,05	18,85	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
03	N066-C	1600,87	33,08	08/04/2011	N.A/A.B	OK	Ausente
04	N069-C	159,75	10,70	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
05	N079-C	1576,49	24,29	08/04/2011	N.A/A.B	OK	Ausente
06	N086-C	936,83	18,30	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
07	N091-C	1608,29	24,59	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
08	N127-C	851,75	11,90	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
09	N142-C	573,93	17,75	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
10	N158-C	586,54	-----	08/04/2011	AB	OK	Ausente
11	N159-C	423,58	-----	08/04/2011	AB	OK	Ausente
12	N165-N	1515,69	25,19	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
13	N167-N	1204,69	23,99	08/04/2011	A.F	RUIM	Ausente
14	N168-C	931,58	8,11	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
15	N170-N	540,91	21,69	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
16	N254-N	819,13	9,30	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
17	N256-N	903,96	13,66	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
18	N265-N	1385,91	28,17	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
19	N274-N	193,13	11,38	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
20	N292-C	225,74	17,56	08/04/2011	A.F	OK	Ausente
21	N301-C	419,58	12,82	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
22	N304-C	737,36	54,25	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
23	N306-C	674,89	27,71	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
24	N307-N	922,02	27,61	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
25	N311-N	2054,54	27,34	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
26	N313-N	784,09	18,67	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
27	N333-O	2070,98	30,96	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
28	N335-O	1025,16	24,05	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
29	N402-C	2149,84	35,30	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
30	N411-C	1276,71	21,67	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
31	N427-C	423,15	45,53	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
32	N446-C	500,01	17,79	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
33	N448-O	456,33	16,17	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
34	N452-C	3361,53	30,38	08/04/2011	A.F	OK	Ausente
35	N771-N	107,58	4,74	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
36	N773-C	1681,22	16,18	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
37	N774-C	147,12	8,49	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
38	N781-N	112,75	5,66	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
39	N782-N	235,76	17,38	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
40	N785-C	154,58	18,85	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
41	N830-C	477,18	33,08	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
42	N832-C	30,95	30,95	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
43	N839-C	793,44	10,70	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
44	N840-C	337,49	8,80	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
45	N841-O	1139,11	30,24	08/04/2011	A.B	OK	Ausente
46	N332-O	132,08	-----	08/04/2011	AB	OK	Ausente
47	N385-C	1001,35	-----	08/04/2011	AB	OK	Ausente
48	N386-C	657,87	-----	08/04/2011	AB	OK	Ausente
49	N387-C	183,47	-----	08/04/2011	AB	OK	Ausente
50	N388-C	521,63	-----	08/04/2011	AB	OK	Ausente
51	N390-N	355,20	-----	08/04/2011	AB	OK	Ausente
52	N391-C	669,36	-----	08/04/2011	AB	OK	Ausente
53	N393-C	449,97	-----	08/04/2011	AB	OK	Ausente
54	N395-N	457,01	-----	08/04/2011	AB	OK	Ausente
55	N396-C	447,45	-----	08/04/2011	AB	OK	Ausente
56	N407-C	463,51	-----	08/04/2011	AB	OK	Ausente
57	N408-C	742,38	-----	08/04/2011	AB	OK	Ausente
58	N410-C	763,06	-----	08/04/2011	AB	OK	Ausente
59	N412-C	915,75	-----	08/04/2011	AB	OK	Ausente
60	N414-C	563,16	-----	08/04/2011	AB	OK	Ausente
61	N422-C	495,75	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
62	N423-C	759,02	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
63	N424-C	464,31	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
64	N426-C	1209,74	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente

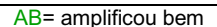
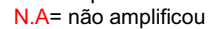

65	N428-N	627,26	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
66	N429-O	663,08	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
67	N430-C	507,21	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
68	N431-C	529,41	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
69	N435-C	526,40	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
70	N436-C	436,71	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
71	N444-C	2019,45	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
72	N445-C	1658,39	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
73	N448-O	749,41	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
74	N453-C	835,02	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
75	N454-C	500,01	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
76	N455-C	529,66	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
77	N456-C	593,74	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
78	N457-C	568,06	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
79	N458-C	1015,75	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
80	N461-N	863,96	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
81	N462-C	495,75	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
81	N463-C	759,02	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
82	N464-C	457,36	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
83	N465-N	1209,74	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
84	N467-C	627,26	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
85	N468-C	665,08	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
86	N469-C	482,38	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
87	N470-C	529,41	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
88	N472-C	686,16	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
89	N474-C	456,93	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
90	N475-C	1003,48	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
91	N476-C	309,68	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
92	N477-N	1081,23	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
93	N478-C	347,14	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
94	N479-N	437,72	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
95	N481-N	268,76	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
96	N494-N	836,58	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
97	N515-N	477,18	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
98	N605-N	637,52	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
99	N843-N	793,44	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente
100	N844-N	337,49	-----	09/04/2011	AB	OK	Ausente

Legenda:

 Negroide - 25%

 Caucasoide - 68%

 Oriental - 7%


 AB= amplificou bem
 N.A= não amplificou
 A.F= amplificou fraco


**Controles Normais: Pesquisa SEP1 - Éxons 5 e 7
(Genoma Humano – USP)**


Nº	Nº da alicota e raça	Conc. alicota mãe	Conc. pós-diluição	Data do PCR	Resultado do PCR	Análise - Seq.	Mutação c1010G→T:	Mutação c583G→A:
01	N062-C	517,43	17,02	20/10/2010	N.A/A.B	OK	Ausente	Ausente
02	N065-C	1022,05	18,85	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
03	N066-C	1600,87	33,08	20/10/2010	N.A/A.B	OK	Ausente	Ausente
04	N069-C	159,75	10,70	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
05	N079-C	1576,49	24,29	20/10/2010	N.A/A.B	OK	Ausente	Ausente
06	N086-C	936,83	18,30	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
07	N091-C	1608,29	24,59	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
08	N127-C	851,75	11,90	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
09	N142-C	573,93	17,75	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
10	N158-C	586,54	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
11	N159-C	423,58	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
12	N165-N	1515,69	25,19	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
13	N167-N	1204,69	23,99	20/10/2010	A.F	RUIM	Ausente	Ausente
14	N168-C	931,58	8,11	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
15	N170-N	540,91	21,69	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
16	N254-N	819,13	9,30	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
17	N256-N	903,96	13,66	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
18	N265-N	1385,91	28,17	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
19	N274-N	193,13	11,38	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
20	N292-C	225,74	17,56	20/10/2010	A.F	OK	Ausente	Ausente
21	N301-C	419,58	12,82	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
22	N304-C	737,36	54,25	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
23	N306-C	674,89	27,71	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
24	N307-N	922,02	27,61	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
25	N311-N	2054,54	27,34	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
26	N313-N	784,09	18,67	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
27	N333-O	2070,98	30,96	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
28	N335-O	1025,16	24,05	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
29	N402-C	2149,84	35,30	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
30	N411-C	1276,71	21,67	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
31	N427-C	423,15	45,53	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
32	N446-C	500,01	17,79	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
33	N448-O	456,33	16,17	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
34	N452-C	3361,53	30,38	20/10/2010	A.F	OK	Ausente	Ausente
35	N771-N	107,58	4,74	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
36	N773-C	1681,22	16,18	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
37	N774-C	147,12	8,49	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
38	N781-N	112,75	5,66	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
39	N782-N	235,76	17,38	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
40	N785-C	154,58	18,85	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
41	N830-C	477,18	33,08	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
42	N832-C	30,95	30,95	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
43	N839-C	793,44	10,70	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
44	N840-C	337,49	8,80	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
45	N841-O	1139,11	30,24	20/10/2010	A.B	OK	Ausente	Ausente
46	N332-O	132,08	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
47	N385-C	1001,35	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
48	N386-C	657,87	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
49	N387-C	183,47	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
50	N388-C	521,63	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
51	N390-N	355,20	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
52	N391-C	669,36	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
53	N393-C	449,97	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
54	N395-N	457,01	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
55	N396-C	447,45	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
56	N407-C	463,51	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
57	N408-C	742,38	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
58	N410-C	763,06	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
59	N412-C	915,75	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
60	N414-C	563,16	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
61	N422-C	495,75	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
62	N423-C	759,02	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
63	N424-C	464,31	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
64	N426-C	1209,74	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente

65	N428-N	627,26	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
66	N429-O	663,08	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
67	N430-C	507,21	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
68	N431-C	529,41	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
69	N435-C	526,40	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
70	N436-C	436,71	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
71	N444-C	2019,45	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
72	N445-C	1658,39	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
73	N448-O	749,41	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
74	N453-C	835,02	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
75	N454-C	500,01	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
76	N455-C	529,66	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
77	N456-C	593,74	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
78	N457-C	568,06	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
79	N458-C	1015,75	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
80	N461-N	863,96	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
81	N462-C	495,75	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
81	N463-C	759,02	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
82	N464-C	457,36	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
83	N465-N	1209,74	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
84	N467-C	627,26	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
85	N468-C	665,08	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
86	N469-C	482,38	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
87	N470-C	529,41	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
88	N472-C	686,16	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
89	N474-C	456,93	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
90	N475-C	1003,48	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
91	N476-C	309,68	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
92	N477-N	1081,23	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
93	N478-C	347,14	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
94	N479-N	437,72	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
95	N481-N	268,76	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
96	N494-N	836,58	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
97	N515-N	477,18	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
98	N605-N	637,52	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
99	N843-N	793,44	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente
100	N844-N	337,49	-----	20/10/2010	AB	OK	Ausente	Ausente

Legenda:


Negroide - 25%


Caucasoide - 68%


Oriental - 7%

AB= amplificou bem
N.A= não amplificou
A.F= amplificou fraco

APÊNDICE C - Termo de consentimento livre e esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO****(pais de adolescentes)**

Projeto de Pesquisa: “ESTUDO DE MUTAÇÕES NO GENE *SEPN1* EM PACIENTES BRASILEIROS PORTADORES DE MIOPATIAS E DISTROFIAS MUSCULARES CONGÊNITAS”

***Investigadores responsáveis: Prof^ª. Dr^ª. Juliana Gurgel Giannetti
Eralda Luiza Castro Concentino***

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que meu(minha) filho(a) foi convidado(a) a participar de um projeto de pesquisa envolvendo pacientes e famílias de indivíduos com diagnóstico confirmado de miopatias e distrofias musculares congênitas. O objetivo geral da pesquisa é realizar detalhado estudo clínico, histopatológico e molecular de pacientes brasileiros com tais diagnósticos. Esses estudos poderão trazer mais conhecimentos sobre tais doenças. A pesquisa será mantida em segredo em todos os estudos colaborativos a partir da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que se concordar em participar deste estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos antecedentes médicos e familiares de meu(minha) filho(a). Meu(minha) filho(a) será submetido(a) a exame físico neurológico para confirmar o seu estado clínico e à documentação por meio de imagens (foto e vídeo). Uma amostra de sangue venoso será colhida (10 a 20 mL). Os pais também deverão ser submetidos à coleta de sangue. Entendo também que os fragmentos musculares de meu(minha) filho(a), retirados e estocados na ocasião do seu diagnóstico, serão utilizados na pesquisa.

RISCO E DESCONFORTO:

Exame de sangue: coleta de 10 a 20 mL de sangue venoso será efetuada. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço, que será realizada por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento.

VANTAGENS:

Eu entendo que, com a minha participação neste estudo, meu diagnóstico será mais preciso, apesar disto, meu tratamento provavelmente não será modificado. Os resultados dos testes moleculares obtidos serão entregues em consulta no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, tel. (31) 3248-9540.

SIGILO:

Eu entendo que toda informação médica, assim como os resultados dos testes genéticos decorrentes deste projeto de pesquisa, farão parte do meu prontuário médico.

Se os resultados, informações ou as imagens obtidos forem utilizados para fins de publicação científica, minha identidade será mantida em sigilo, sendo utilizadas apenas as iniciais do meu nome.

Entendo também que em todas as imagens (foto e vídeo) serão utilizadas tarjas sobre os olhos. Tais informações serão divulgadas em Congressos e reuniões científicas, bem como em revistas científicas sobre o assunto.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar do estudo a qualquer momento sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no HC-UFMG. Eu reconheço também que Eralda Luiza Castro Concentino ou a Dr^a. Juliana Gurgel Giannetti podem interromper a minha participação neste estudo a qualquer momento que julgarem apropriado.

Eu confirmo que Eralda Luiza Castro Concentino / Dr^a. Juliana Gurgel Giannetti explicaram-me o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido(a) e as possíveis vantagens advindas deste projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi, este formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar deste estudo.

Nome do responsável

Assinatura do responsável

Data: _____ / _____ / _____

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____ o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia deste formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome do pesquisador ou associado

Assinatura do pesquisador ou associado

Data: _____ / _____ / _____

Comitê de Ética em Pesquisa-UFMG:
Prof^a. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Unidade Administrativa II-2 andar-sala 2.005
Av. Antônio Carlos,6.627-Pampulha
Fone:31-3499-4592

Pesquisadores Responsáveis:
Eralda Luiza Castro Concentino
Prof^a. Dr^a. Juliana Gurgel Giannetti
Departamento de Pediatria-FM/UFMG
Av. Alfredo Balena,190- 4º andar
Fone:31-3248 3773

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO
(para criança até 6 anos)

Projeto de Pesquisa: “ESTUDO DE MUTAÇÕES NO GENE SEPN1 EM PACIENTES BRASILEIROS PORTADORES DE MIOPATIAS E DISTROFIAS MUSCULARES CONGÊNITAS”

Investigadores responsáveis: *Por^ª. Dr^ª. Juliana Gurgel Giannetti*
Eralda Luiza Castro Concentino

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que meu(minha) filho(a) foi convidado(a) a participar de um projeto de pesquisa envolvendo pacientes e famílias de indivíduos com diagnóstico confirmado de miopatias e distrofias musculares congênitas. O objetivo geral do projeto é realizar detalhado estudo clínico, histopatológico e molecular de pacientes brasileiros com tais diagnósticos. Esses estudos poderão trazer mais conhecimentos sobre tais doenças. A pesquisa será mantida em segredo em todos os estudos colaborativos a partir da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que se concordar em participar deste estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas ao(a) meu(minha) filho(a) a respeito dos seus antecedentes médicos e familiares. Meu(minha) filho(a) será submetido(a) a exame físico neurológico para confirmar o estado clínico e à documentação por meio de imagens (foto e vídeo). Amostra de sangue venoso será colhida (10 a 20 mL). Os pais também deverão ser submetidos à coleta de sangue.

Entendo também que os fragmentos musculares de meu(minha) filho(a), retirados e estocados na ocasião do seu diagnóstico, serão utilizados na pesquisa.

RISCO E DESCONFORTO:

Exame de sangue: coleta de 10 a 20 mL de sangue venoso será efetuada. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e

manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço, que será realizada por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento.

VANTAGENS:

Eu entendo que ao aceitar que meu(minha) filho(a) participe desta pesquisa, o seu diagnóstico será mais preciso, apesar disto, o seu tratamento provavelmente não será modificado. Os resultados dos testes moleculares obtidos serão entregues em consulta no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, tel. (31) 3248-9540.

SIGILO:

Eu entendo que toda informação médica, assim como os resultados dos testes genéticos decorrentes deste projeto de pesquisa, farão parte do meu prontuário médico.

Se os resultados, informações ou as imagens obtidos forem utilizados para fins de publicação científica, minha identidade será mantida em sigilo, sendo utilizadas apenas as iniciais do meu nome.

Entendo também que em todas as imagens (foto e vídeo) serão utilizadas tarjas sobre os olhos. Tais informações serão divulgadas em Congressos e reuniões científicas, bem como em revistas científicas sobre o assunto.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Eu entendo que a participação de meu(minha) filho(a) é voluntária e que eu posso recusar sua participação no estudo a qualquer momento sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no HC-UFMG. Eu reconheço também que Eralda Luiza Castro Concentino ou a Dr^a. Juliana Gurgel Giannetti podem interromper a minha participação nesse estudo a qualquer momento que julgarem apropriado.

Eu confirmo que Eralda Luiza Castro Concentino/Dr^a.Juliana Gurgel Giannetti explicaram-me o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido(a) e as possíveis vantagens advindas deste projeto de pesquisa. Eu li

e/ou me foi explicado, assim como compreendi, este formulário de consentimento e estou de pleno acordo com a participação de meu(minha) filho(a) neste estudo.

Nome do responsável

Assinatura do responsável

Data: ____ / ____ / ____

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____
o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia deste formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome do pesquisador ou associado

Assinatura do pesquisador ou associado

Data: ____ / ____ / ____

Comitê de Ética em Pesquisa-UFMG:
Prof^a. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Unidade Administrativa II-2 andar-sala 2.005
Av. Antônio Carlos,6.627-Pampulha
Fone:31-3499-4592

Pesquisadores Responsáveis:
Eralda Luiza Castro Concentino
Prof^a. Dr^a. Juliana Gurgel Giannetti
Departamento de Pediatria-FM/UFMG
Av. Alfredo Balena,190- 4^o andar
Fone:31-3248 3773

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO
(crianças entre 7-12 anos)

Projeto de Pesquisa: “ESTUDO DE MUTAÇÕES NO GENE *SEPN1* EM PACIENTES BRASILEIROS PORTADORES DE MIOPATIAS E DISTROFIAS MUSCULARES CONGÊNITAS”

Investigadores responsáveis: Prof^ª. Dr^ª. Juliana Gurgel Giannetti
Eralda Luiza Castro Concentino

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que meu(minha) filho(a) foi convidado(a) a participar de um projeto de pesquisa envolvendo pacientes e famílias de indivíduos portadores de miopatias e distrofias musculares congênitas. O objetivo geral da pesquisa é realizar detalhado estudo clínico, histopatológico e molecular de pacientes brasileiros com tais diagnósticos. Esses estudos poderão trazer mais conhecimentos sobre tais doenças. A pesquisa será mantida em segredo em todos os estudos colaborativos a partir da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que se concordar em participar deste estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas ao(a) meu(minha) filho(a) a respeito dos seus antecedentes médicos e familiares. Meu(minha) filho(a) será submetido(a) a exame físico neurológico para confirmar o estado clínico e à documentação por meio de imagens (foto e vídeo). Amostra de sangue venoso será colhida (10 a 20 mL). Os pais também deverão ser submetidos à coleta de sangue.

Entendo também que os fragmentos musculares de meu(minha) filho(a), retirados e estocados na ocasião do seu diagnóstico, serão utilizados na pesquisa.

RISCO E DESCONFORTO:

Exame de sangue: coleta de 10 a 20 mL de sangue venoso será efetuada. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e

manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço, que será realizada por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento.

VANTAGENS:

Eu entendo que ao aceitar que meu(minha) filho(a) participe desta pesquisa, o seu diagnóstico será mais preciso, apesar disto, o seu tratamento provavelmente não será modificado. Os resultados dos testes moleculares obtidos serão entregues em consulta no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, tel. (31) 3248-9540.

SIGILO:

Eu entendo que toda informação médica, assim como os resultados dos testes genéticos decorrentes deste projeto de pesquisa, farão parte do meu prontuário médico.

Se os resultados, informações ou as imagens obtidas forem utilizadas para fins de publicação científica, minha identidade será mantida em sigilo, sendo utilizadas apenas as iniciais do meu nome.

Entendo também que em todas as imagens (foto e vídeo) serão utilizadas tarjas sobre os olhos. Tais informações serão divulgadas em Congressos e reuniões científicas, bem como em revistas científicas sobre o assunto.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Eu entendo que a participação de meu(minha) filho(a) é voluntária e que eu posso recusar sua participação no estudo a qualquer momento sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no HC-UFMG. Eu reconheço também que Eralda Luiza Castro Concentino ou a Dr^a. Juliana Gurgel Giannetti podem interromper a minha participação neste estudo a qualquer momento que julgarem apropriado.

Eu confirmo que Eralda Luiza Castro Concentino / Dr^a. Juliana Gurgel Giannetti explicaram-me o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais meu(minha) filho(a) será submetido(a) e as possíveis vantagens advindas deste

projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi, este formulário de consentimento e estou de pleno acordo com a participação de meu(minha) filho(a) neste estudo.

Nome do responsável

Assinatura do responsável

Nome da criança

Assinatura da criança

Data: ____ / ____ / ____

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____
o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia deste formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome do pesquisador ou associado

Assinatura do pesquisador ou associado

Data: ____ / ____ / ____

Comitê de Ética em Pesquisa-UFMG:
Prof^a. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Unidade Administrativa II-2 andar-sala 2.005
Av. Antônio Carlos,6.627-Pampulha
Fone:31-3499-4592

Pesquisadores Responsáveis:
Eralda Luiza Castro Concentino
Prof^a. Dr^a. Juliana Gurgel Giannetti
Departamento de Pediatria-FM/UFMG
Av. Alfredo Balena,190- 4º andar
Fone: 31-3248 3773

APÊNDICE D - Autorização para foto e vídeo**DECLARAÇÃO**

Eu,,
 declaro que autorizo a realização de fotos e vídeos durante o meu atendimento no Ambulatório São Vicente do Hospital das Clínicas-UFMG. Fui informado(a) de que minha identidade será mantida em sigilo. Estou ciente e concordo com a utilização do material fotográfico e vídeos em Congressos e Simpósios Médicos, bem como em revistas científicas e especializadas.

Belo Horizonte, de de

Assinatura do responsável

DECLARAÇÃO

Eu,, como responsável pelo(a) paciente....., declaro que autorizo a realização de fotos e vídeos durante o atendimento no Ambulatório São Vicente do Hospital das Clínicas-UFMG. Fui informado(a) de que a identidade de meu(minha) filho(a) será mantida em sigilo. Estou ciente e concordo com a utilização do material fotográfico e vídeos em Congressos e Simpósios Médicos, bem como em revistas científicas e especializadas.

Belo Horizonte, de de

Assinatura do responsável

APÊNDICE E - Achados moleculares dos pacientes e familiares envolvidos no presente estudo

Caso	Mutações Encontradas (Patogênicas ou polimorfismo)		Mutações patogênicas e/ou provavelmente patogênicas		Mutação no pai		Mutação na mãe		Mutação em irmãos
					Éxon 4:	c438-439Ins.GAG* (pE143Y)	Éxon 4:	Ausente	
01	Éxon 4:	c438-439Ins.GAG* (pE143Y)			Éxon 4:	c438-439Ins.GAG* (pE143Y)	Éxon 4:	Ausente	Presente
	Éxon 4:	c425 G→A* (pC143Y)							
	Éxon 9:	c1173 T→C* (pP391P)							
	Éxon 12:	c1506 C→A* (pN503K)							
02	Éxon 4:	c438-439Ins.GAG* (pE143Y)			Éxon 4:	c438-439Ins.GAG* (pE143Y)	Éxon 4:	Ausente	Presente
	Éxon 4:	c425 G→A* (pC143Y)							
	Éxon 9:	c1173 T→C* (pP391P)							
	Éxon 12:	c1506 C→A* (pN503K)							
03	Éxon 4:	c438-439Ins.GAG* (pE143Y)			Éxon 4:	c438-439Ins.GAG* (pE143Y)	Éxon 4:	Ausente	Presente
	Éxon 4:	c425 G→A* (pC143Y)							
	Éxon 9:	c1173 T→C* (pP391P)							
	Éxon 12:	c1506 C→A* (pN503K)							
04	Éxon 4:	c425 G→A (pC143Y)							
	Éxon 7:	c1010 G→T* (pR337M)	Éxon 7:	c1010 G→T* (pR337M)	Éxon 7:	c1010 G→T* (pR337M)	Éxon 7:	Ausente	Ausente
	Éxon 9:	c1173 T→C (pP391P)							
	Éxon 10:	c1384 T→G* (pU462G)	Éxon 10:	c1384 T→G* (pU462G)	Éxon 10:	Ausente	Éxon 10:	Ausente	Ausente
	Éxon 12:	c1506 C→A (pN503K)							
05	Éxon 4:	c425 G→A (pC143Y)							
	Éxon 5:	c583 G→A* (pA195T)	Éxon 5:	c583 G→A* (pA195T)	Éxon 5:	c583 G→A* (pA195T)	Éxon 5:	Ausente	
	Éxon 9:	c1173 T→C (pP391P)							
	Éxon 12:	c1506 C→A (pN503K)							
06	N.M								
07	Éxon 4:	c425 G→A* (pC143Y)							
08	Éxon 1:	c136-137Ins12bp*	Éxon 1:	c136-137Ins12bp*					
	Éxon 4:	c425 G→A* (pC143Y)							
	Éxon 5:	c729 G→A* (pP243P)							
	Éxon 9:	c1173 T→C (pP391P)							
09	Éxon 4:	c425 G→A* (C143Y)							
	Éxon 8:	c1015 C→T* (pL339L)							
	Éxon 9:	c1173 T→C (pP391P)							
	Éxon 12:	c1506 C→A* (pN503K)							
10	Éxon 4:	c425 G→A (C143Y)							
	Éxon 9:	c1173 T→C (pP391P)							
	Éxon 12:	c1506 C→A (pN503K)							

11	Éxon 4:	c425 G→A* (pC143Y)						
	Éxon 9:	c1173 T→C* (pP391P)						
	Éxon 12:	c1506 C→A* (pN503K)						
12	Éxon 4:	c425 G→A (pC143Y)						
	Éxon 9:	c1173 T→C (pP391P)						
13	Éxon 4:	c425 G→A (pC143Y)						
14	Éxon 4:	c425 G→A (pC143Y)						
	Éxon 5:	c713-714InsA* (pN238K)	Éxon 5:	c713-714InsA* (pN238K)				
	Éxon 12:	c713-714 InsA (pN238K)						
15	Éxon 4:	c425 G→A (C143Y)						
	Éxon 9:	c1173 T→C (pP391P)						
	Éxon 12:	c1506 C→A* (pN503K)						
16	Éxon 4:	c425 G→A (C143Y)						
	Éxon 9:	c1173 T→C (pP391P)						
	Éxon 12:	c1506 C→A* (pN503K)						
	Éxon 4:	c425 G→A (pC143Y)						
	Éxon 5:	c713-714InsA* (pN238K)	Éxon 5:	c713-714InsA* (pN238K)				
	Éxon 9:	c1173 T→C (pP391P)						
	Éxon 12:	c1506 C→A* (pN503K)						
18	Éxon 4:	c425 G→A (pC143Y)						
	Éxon 9:	c1173 T→C (pP391P)						

* = Heterozigose; NM= nenhuma mutação.

As alterações nos nucleotídeos e na proteína foram numeradas de acordo com referência das sequências NM_020451.2 e NP065184, respectivamente (USCS database) e correspondem à isoforma que contém o transcrito de comprimento total (OMIM 606210).

**ANEXO A - REFERÊNCIA DOS REAGENTES E PLACAS UTILIZADAS PARA
REAÇÃO DE PURIFICAÇÃO DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO**

- Sephadex TM G-50 – 100g – cód: 17-0573-02 / GE Healthcare
- Placas Multiscreen HV – 50/caixa – cód: MAHVN4550 / Millipore
- Multiscreen Column Loader 45MI - cód: MACL09645 / Millipore

ANEXO B - AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 555/08

Interessado(a): Profa. Juliana Gurgel Giannetti
Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 04 de fevereiro de 2009, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Estudos de mutações no gene SEPN1 em pacientes portadores de miopatias e distrofias musculares congênitas acompanhados no ambulatório de doenças neuromusculares do Hospital das Clínicas da UFMG"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO C - AUTORIZAÇÃO DAS UNIDADES FUNCIONAIS:**Departamento de Patologia e Medicina Laboratorial****UNIDADE FUNCIONAL PATOLOGIA E
MEDICINA LABORATORIAL**
Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal

Belo Horizonte, 14 de outubro de 2008.

Ao Sr. Diretor de Ensino, Pesquisa e Extensão do
Hospital das Clínicas UFMG.

Senhor Diretor,

Pela presente, venho informar que o Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal do Hospital das Clínicas da UFMG está ciente e concordante com a utilização do ambiente físico, para o estudo histopatológico e molecular e dos fragmentos de biópsias musculares armazenados nos seus arquivos, para realização do projeto de pesquisa intitulado **“Estudos de mutações no gene SEPN1 em pacientes com distrofia e miopatias musculares congênitas acompanhados pelo ambulatório de doenças neuromusculares do Hospital das Clínicas da UFMG”**, que será desenvolvido no Laboratório de Investigações em Doenças Neuromusculares do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina, como projeto de mestrado da aluna Eralda Luíza Castro Concentino e orientado pela Profa.Dra.Juliana Gurgel Giannetti.

Prof. Mônica Maria Demas Álvares Cabral
Chefe do Departamento de Anatomia Patológica
e Medicina Legal do Hospital das
Clínicas da UFMG

Unidade funcional da Pediatria



*Unidade Funcional Pediatria
Hospital das Clínicas
Universidade Federal de Minas Gerais*

ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA

Título do Projeto:

“Estudo de Mutações no Gene SEPN1 em Pacientes Portadores de Miopatias e Distrofias Musculares Congênitas acompanhados no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do Hospital das Clínicas da UFMG.”

Orientador:

Juliana Gurgel Giannetti

Pesquisador Responsável:

Eralda Luiza Castro Concentino

Recomendações/restrições para o desenvolvimento da pesquisa:

O objetivo do projeto é detectar mutações no gene SEPN1 em pacientes portadores de distrofia muscular congênita e correlacionar o genótipo com o fenótipo clínico e histopatológico dos pacientes. Esse estudo poderá contribuir com o entendimento destas mutações e melhorar o prognóstico dos pacientes. O projeto é bem fundamentado teoricamente, é relevante e não oferece riscos aos pacientes.

O projeto foi aprovado por unanimidade neste Colegiado,
31 de Outubro de 2008


Cláudia Gonçalves Cunha
Gerente da U. F. Pediatria HC-UFMG

ANEXO C - AUTORIZAÇÃO DA DIRETORIA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS-UFMG



Universidade Federal de Minas Gerais: **UFMG**
Hospital das Clínicas
Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão

DECLARAÇÃO

Declaramos para fins de comprovação no Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos – COEP/UFMG que o projeto de pesquisa intitulado, “ **ESTUDOS DE MUTAÇÕES NO GENE SEPN1 EM PACIENTES COM DISTROFIA E MIOPATIAS MUSCULARES CONGÊNIAS ACOMPANHADOS PELO AMBULATÓRIO DE DOENÇAS NEUROMUSCULARES DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFMG**”, de responsabilidade, da Profª Juliana Gurgel Granetti foi recebido na Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão/HC-UFMG para registro e avaliação.

Belo Horizonte, 31 de outubro de 2008.


Elzi do Carmo Cota
Secretária da DEPE/HC-UFMG

ANEXO D – DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO



**FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Av. Prof. Alfredo Balent, 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (011) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
spg@medicina.ufmg.br

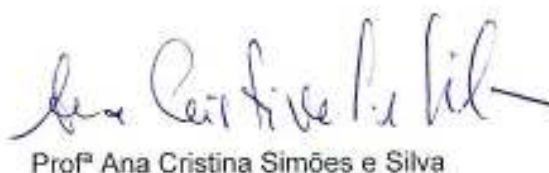


DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores Doutores: Juliana Gurgel Giannetti, Ana Cristina Simões e Silva e Mariz Vainzof, aprovou a defesa de dissertação intitulada: **“ESTUDO DE MUTAÇÕES NO GENE DA SEPN1 EM PACIENTES BRASILEIROS PORTADORES DE MIOPATIAS E DISTROFIAS MUSCULARES CONGÊNITAS”** apresentada pela mestrandia **ERALDA LUÍZA CASTRO CONCENTINO** para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 09 de junho de 2011.


Profª Juliana Gurgel Giannetti

Orientadora


Profª Ana Cristina Simões e Silva


Profª Mariz Vainzof

ANEXO D – ATA DE DEFESA



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 - sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30130-110
Fone: (031) 3409-9641 - FAX: (31) 3409-9640
apq@medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de **ERALDA LUÍZA CASTRO CONCENTINO** nº de registro 2009654808. Às quatorze horas, do dia **nove de junho de dois mil e onze**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de dissertação indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“ESTUDO DE MUTAÇÕES NO GENE DA SEPN1 EM PACIENTES BRASILEIROS PORTADORES DE MIOPATIAS E DISTROFIAS MUSCULARES CONGÊNITAS”**, requisito final para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências da Saúde: Saúde da Criança e do Adolescente, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Saúde da Criança e do Adolescente. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profª Juliana Gurgel Giannetti, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do trabalho final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Profª Juliana Gurgel Giannetti / Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Profª Ana Cristina Simões e Silva	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Profª Mariz Vainzof	Instituição: USP	Indicação: <u>APROVADA</u>

Pelas indicações a candidata foi considerada aprovada

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 09 de junho de 2011.

Profª. Juliana Gurgel Giannetti / Orientador Juliana Gurgel Giannetti

Profª. Ana Cristina Simões e Silva Ana Cristina Simões e Silva

Profª. Mariz Vainzof Mariz Vainzof

Profª. Ana Cristina Simões e Silva/Coordenadora Ana Cristina Simões e Silva

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Profª. Ana Cristina Simões e Silva
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde: Saúde da Criança e do Adolescente
Faculdade de Medicina/UFMG

Juliana
CONFERE COM O ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação