



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS PROFISSIONAL –
MACPro

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-MOLECULAR DE PACIENTES COM DISTROFIA
MUSCULAR DE DUCHENNE EM SERVIÇO ESPECIALIZADO NO ESTADO DO
PARÁ**

RAIMUNDA HELENA FERREIRA FEIO

**Belém – PA
2018**

RAIMUNDA HELENA FERREIRA FEIO

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-MOLECULAR DE PACIENTES COM DISTROFIA
MUSCULAR DE DUCHENNE EM SERVIÇO ESPECIALIZADO NO ESTADO DO
PARÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas Profissional da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de mestre em Análises Clínicas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva

Belém – PA
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F297c Feio, Raimunda Helena Ferreira
Caracterização Clínico-Molecular De Pacientes Com Distrofia Muscular De Duchenne Em Serviço Especializado No Estado Do Pará / Raimunda Helena Ferreira Feio. — 2018
79 f. : il. color

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas (MACPRO), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva

1. Distrofia muscular de Duchenne. 2. Diagnóstico Genético. 3. Mutação. I. Silva, Luiz Carlos Santana da, *orient.* II. Título

CDD 576.5

RAIMUNDA HELENA FERREIRA FEIO

CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-MOLECULAR DE PACIENTES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE EM SERVIÇO ESPECIALIZADO NO ESTADO DO PARÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas Profissional da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de mestre em Análises Clínicas.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Carlos Santana Da Silva (Orientador)

Dra. Antonette Souto El-Husny – Externo à instituição

Prof. Dr. Carlos Eduardo de Melo Amaral - Externo à instituição

Dra. Isabel Cristina Neves de Souza - Externo à instituição

Dra. Maria Bernadete Dutra de Resende - Externo à instituição

Belém – PA
2018

“Se eu falasse todas as línguas da terra, mas o amor não tivesse, seria um bronze que ecoa, um címbalo que soa. E se tivesse a profecia, conhecesse todas as ciências, possuísse a fé que transportasse montanhas, mas o amor não tivesse, seria um nada. Porque o homem nada vale, se não ama”.

A Caridade – Focolares (Coríntios 13).

DEDICATÓRIA

A minha família, principalmente às minhas filhas, Lana e Sophia, pelo apoio e compreensão da importância deste trabalho. A vocês todo meu amor.

Aos pacientes, pela concordância em disponibilizar seus dados genéticos. Esperamos que a partir do conhecimento clínico, genético e epidemiológico de suas famílias, este trabalho possa inspirar os gestores da saúde deste estado, na construção de um centro de referência para doenças neuromusculares no estado do Pará.

A minha amiga, Dra. Isabel Cristina Neves de Souza, que em 2013, usou de seu poder de convencimento, para iniciarmos um ambulatório de neuromuscular, no Serviço Caminhar, do Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza.

Ao meu orientador e incentivador desta conquista, Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva, pela sua dedicação e capacidade de transmitir com paciência e clareza seus conhecimentos. Agradeço pela amizade e incentivo para a conclusão desta pesquisa. Pela disponibilidade e coragem para novas frentes de trabalho, como a distrofia muscular de Duchenne.

A Prof. Dra. Isabel Neves de Souza, por despertar em mim o interesse pela área de Neuromuscular. Pelos sonhos, lutas e conquistas de todos os dias no ambulatório de Neurogenética do Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza.

Aos colegas neuropediatras e geneticistas, que encaminharam pacientes com Distrofia muscular de Duchenne para o ambulatório de Neurogenética do Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza.

A Dra. Maria Bernadete Dutra de Resende, pelo seu exemplo de vida e dedicação aos pacientes com Duchenne.

A Miriam, aos funcionários do SAME e a todos da unidade de atenção à saúde da criança e adolescente do Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza, pela estimada colaboração e ajuda.

As famílias e aos pacientes por nos ajudarem nessa pesquisa.

Ao Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza por abrigar esta pesquisa.

Ao Instituto de Ciências Biológica, por nos receber e acolher tão bem no MACPRO.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a elaboração desta dissertação.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE TABELAS | 10 |
| LISTA DE FIGURAS | 11 |
| LISTA DE GRÁFICOS | 13 |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | 14 |
| RESUMO | 16 |
| ABSTRACT | 17 |
| 1. INTRODUÇÃO | 18 |
| 1.1. DOENÇAS GENÉTICAS RARAS..... | 18 |
| 1.2. DOENÇAS NEUROMUSCULARES: CONCEITO, CLÍNICA E CLASSIFICAÇÃO .. | 18 |
| 1.3. Distrofia Muscular de Duchenne (DMD)..... | 20 |
| 1.3.1. Definição e Histórico..... | 20 |
| 1.3.2. Aspectos Clínicos | 21 |
| 1.3.2.1. A Distrofina | 22 |
| 1.3.3. Aspectos Genético-Moleculares | 25 |
| 1.3.4. Fisiopatologia | 26 |
| 1.3.5 Diagnóstico | 28 |
| 1.3.5.1 Creatinoquinase (Ck)..... | 28 |
| 1.3.5.2 Estudo Molecular..... | 29 |
| 1.3.5.3 Biopsia Muscular | 30 |
| 1.3.6 Tratamento..... | 31 |
| 1.3.6.1 Administração de Corticosteroides..... | 31 |
| 1.3.6.2 Manejo Respiratório | 33 |
| 1.3.6.3 Manejo Cardíaco..... | 34 |
| 1.3.6.4 Manejo Nutricional e Gastrointestinal..... | 36 |
| 1.3.6.5 Manejo Ortopédico..... | 36 |

| | |
|---|-----------|
| 1.3.6.6 Tratamento Medicamentoso: Ataluren e Eteplirsen | 38 |
| 2. JUSTIFICATIVA..... | 41 |
| 3. OBJETIVOS..... | 42 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL..... | 42 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 42 |
| 4. HIPÓTESE/PERGUNTAS NORTEADORAS..... | 43 |
| 5. METODOLOGIA | 44 |
| 6. RESULTADOS..... | 46 |
| 6.1 CARACTERÍSTICA EPIDEMIOLÓGICA E CLÍNICA DOS PACIENTES | 46 |
| 6.2 IDADE DE CHEGADA AO SERVIÇO ESPECIALIZADO E FATORES..... | 50 |
| EPIDEMIOLÓGICOS..... | 50 |
| 6.3 MANEJO TERAPEÚTICO E TRATAMENTO ESPECÍFICO | 50 |
| 6.4 RESULTADO BIOQUÍMICO E BIÓPSIA MUSCULAR..... | 51 |
| 6.5 RESULTADOS MOLECULARES (INDIVIDUAIS E FAMILIAS)..... | 51 |
| 6.6 O TIPO DE MUTAÇÃO E A EVOLUÇÃO CLÍNICA | 55 |
| 7. DISCUSSÃO..... | 61 |
| 7.1 ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS..... | 61 |
| 7.2 ASPECTOS MUTACIONAIS | 63 |
| 8. CONCLUSÃO | 68 |
| BIBLIOGRAFIA | 69 |
| APÊNDICE 1 | 74 |
| APÊNDICE 2 | 75 |
| ANEXO 1..... | 77 |
| ANEXO 2..... | 79 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1. Perda progressiva dos marcos motores. Evolução natural da doença. | 22 |
| Quadro 2. As isoformas da distrofina e suas áreas de expressão..... | 24 |
| Quadro 3. Resumo do banco de dados TREAT-NMD DMD..... | 26 |
| Quadro 4. Principais efeitos colaterais do tratamento com corticoide. Seguimento e medidas terapêuticas. | 32 |
| Quadro 5. Avaliações e intervenções para manejo respiratório de pacientes com DMD de acordo com a fase clínica da doença. | 34 |
| Quadro 6. Diagnóstico e tratamento cardíaco para pacientes com DMD. | 35 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Características clínica e epidemiológica dos pacientes com DMD. | 46 |
| Tabela 2. Idade de admissão no serviço especializado, localização geográfica e histórico familiar. | 50 |
| Tabela 3. Média dos valores de CK (U/L), frequência e idade. NR- Não referido. | 51 |
| Tabela 4. Tipos de mutações e suas frequências | 52 |
| Tabela 5. Grandes mutações..... | 54 |
| Tabela 6. Pequenas mutações e suas trocas de base. | 54 |
| Tabela 7. Pequenas mutações. Em negrito as mutações novas. | 55 |
| Tabela 8. Idade da instalação do distúrbio da marcha. Idade em anos. Mutação proximal (1-44) e distal (>44). NR não referido. | 55 |
| Tabela 9. Atraso do desenvolvimento motor..... | 56 |
| Tabela 10. Idade de perda da Marcha..... | 56 |
| Tabela 11. Dificuldades escolares | 56 |
| Tabela 12 . Avaliação de evolução clínica nos grupos proximal (1-30) e distal (>30). NR não referido..... | 57 |
| Tabela 13. Comparação da evolução clínica da DMD em pacientes com pequenas e grandes mutações. | 58 |
| Tabela 14. Evolução clínica da mesma mutação em famílias relacionadas e não relacionadas. Mutação Nonsense..... | 59 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Desenho esquemático da distrofina e do complexo glicoproteico (DGC)..... | 23 |
| Figura 2. O gene <i>DMD</i> e suas regiões promotoras das isoformas de distrofina..... | 24 |
| Figura 3. Cromossoma X, localização do gene <i>DMD</i> | 25 |
| Figura 4. O novo modelo de interação distrofina-sarcolema no musculo. | 28 |
| Figura 5. Esquema terapêutico com Eteplirsen. | 39 |
| Figura 6. Localização geográfica dos pacientes. | 49 |
| Figura 7. Esquema da localização das 7 mutações distais no gene <i>DMD</i> encontradas no presente estudo. | 53 |
| Figura 8. Algoritmo de diagnóstico de <i>DMD</i> | 66 |
| Figura 9. Algoritmo de diagnóstico precoce de <i>DMD</i> | 67 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 1. Atraso de Desenvolvimento Neuropsicomotor. NR não referido. | 47 |
| Gráfico 2. Fase clínica da DMD | 48 |
| Gráfico 3. Tipo de mutação | 52 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|--|
| ACS | Agentes Comunitários de Saúde |
| ALT | Alanina Aminotransferase |
| AO | Oligonucleótidos Anti-sentido |
| Array-CGH | Array Competitivos de Híbridação Gen mica |
| AST | Transaminases Aspartato Aminotransferase |
| CK | Creatininoquinase |
| CT | C-Terminal |
| CVF | Capacidade Vital Forçada |
| Dbr | Distrobevina |
| DGC | Complexo Distrofina Glicoproteína |
| DI | Deficiência Intelectual |
| DMB | Distrofia Muscular de Becker |
| DMD | Distrofia Muscular de Duchenne |
| DMO | Densidade Mineral  ssea |
| DMOs | Domínios de Ligação de Membrana |
| DNM | Doenç s Neuromusculares |
| DR | Doenç s Raras |
| ECG | Eletrocardiograma |
| ECRs | Estudos Clínicos Randomizados |
| FDA | Food and Drugs Administration |
| HUBFS | Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza |
| MLPA | Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification |
| NDPM | Desenvolvimento Neuropsicomotor |
| nNOS |  xido Nítrico Sintase |
| NSG | Sequenciamento de Nova Geração |
| NT | N-Terminal |
| PEmax | Pressão Respiratória Máxima |
| Pet CO ₂ /PTcCO ₂ | Pressão Transcutanea de CO ₂ e Pressão Parcial Transcutanea CO ₂ |
| PImax | Pressão Inspiratória Máxima |

| | |
|-------|-------------------------------------|
| PKF | Pico de Fluxo |
| QI | Coefficiente de Inteligência |
| RGE | Refluxo Gastresofágico |
| RMC | Ressonância Magnética Cardíaca |
| Sp02 | Saturação de Oxigênio |
| STR | Short Tandem Repeat |
| Syn | Sintrofina |
| XLDCM | Cardiomiopatia Dilatada Ligada ao X |

RESUMO

As doenças neuromusculares (DNM) representam um grupo de doenças raras, que comprometem a unidade motora, como as distrofias. Existem vários tipos de distrofia muscular, dentre elas a distrofia muscular de Duchenne (DMD) é a mais frequente. Esta é geneticamente determinada, com padrão de herança recessiva ligada ao X, a qual se caracteriza por enfraquecimento muscular, progressivo e simétrico, observado clinicamente a partir do terceiro ou quarto ano de vida, constituindo-se como consequência da mutação no gene *DMD*, levando a ausência ou deficiência da proteína distrofina. O diagnóstico é determinado a partir de anamnese, exame neurológico e dosagem das enzimas musculares, principalmente da creatinoquinase (CK), a qual encontra-se bastante elevada. A pesquisa molecular deve ser realizada da forma mais precoce possível, para que a partir da identificação das mutações, o aconselhamento genético possa ser fornecido à família, e possíveis indicações de novas terapêuticas. No presente trabalho, foi realizada a coleta de dados clínicos, laboratoriais e genéticos, com base nos prontuários de 25 pacientes com diagnóstico de DMD, atendidas no ambulatório de Neurogenética, vinculado à unidade de saúde da criança e adolescente do Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza (HUBFS / UFPA), no período de 2012 a 2018, com o objetivo de caracterizar o perfil clinico-molecular. As primeiras manifestações da doença ocorreram em 68% até os quatro anos de vida e a média de idade de acesso ao serviço especializado foi tardia, 9,9 anos. 52% dos casos apresentam recorrência familiar e apenas 24% dos pacientes são da capital. Todos os pacientes realizaram pesquisa molecular, foram encontradas 19 mutações, 57,8% (11/19) grandes mutações, todas deleções, e 42% (8/19) pequenas mutações. Estes resultados são discordantes da literatura mundial, porém semelhantes aos encontrados em um estudo realizado na cidade de Salvador no nordeste do Brasil. Não foi possível estabelecer uma relação entre evolução clínica, gravidade e perfil mutacional, mas houve uma tendência a maior comprometimento cognitivo nas mutações distais. Desta forma, este trabalho vem reiterar que o conhecimento do perfil clinico-molecular nos pacientes com DMD, é fundamental para a tomada de decisões e indicação de terapias específicas, assim como agregar dados na literatura, com o primeiro registro de perfil mutacional de 20 famílias com DMD da Região Norte do Brasil.

Palavras-chave: Distrofia muscular de Duchenne; Diagnóstico Genético; Mutação.

ABSTRACT

Neuromuscular disorders (NMDs) represent a group of rare diseases, which compromise motor drive, as the dystrophies. There are several types of muscular dystrophy and among them, Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most frequent one. It is genetically determined, with an X-linked recessive inheritance pattern characterized by progressive and symmetrical muscle weakness, that are clinically observed from the third or fourth year of life, as a consequence of the mutation in the DMD gene, leading to the absence or deficiency of the dystrophin protein. The diagnosis is determined by anamnesis, neurological examination and dosage of muscle enzymes, mainly CK (creatin kinase), which is found in elevated levels. Molecular research has to be performed as early as possible, because through the identification of the mutations genetic counseling can be provided to the family and also potential indications of new therapies. In this dissertation clinical, laboratory and genetic data were collected based on the medical records of 25 patients diagnosed with DMD, treated at the Neurogenetics ambulatory, linked to the health unit of the child and adolescent of the University Hospital Bettina Ferro de Souza (HUBFS / UFPA), between 2012 and 2018 aiming for the characterization of the clinical-molecular profile. The first evidence of the disease occurred in 68% until the four years of life and the average age of access to the specialized service was late, at the age of 9.9 years. 52% of the cases have family recurrence and only 24% of the patients are from the capital. All patients performed molecular research, 19 mutations were found, 57.8% (11/19) large-scale mutations being all deletions, and 42% (8/19) small-scale mutations. These results are contradictory with world literature, they are found similar in a study made in Salvador, a city that belongs to the northeastern region of Brazil. It was not possible to establish a relationship between clinical evolution, severity and mutational profile, but there was a trend towards major cognitive impairment in the distal mutations. Therefore, this work confirms that the knowledge of the clinical-molecular profile in patients with DMD is essential for the decision making and indication of specific therapies, as well as for the contribution of collected data in the literature, by being the first record of a mutational profile of 20 families with DMD from the Northern Region of Brazil.

Keywords: Duchenne muscular dystrophy; Genetic diagnosis; Mutation.

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇAS GENÉTICAS RARAS

As doenças raras são aquelas que afetam um pequeno número de pessoas quando comparado com a população em geral. A sua estimativa pode variar de um país para outro, mas segundo a OMS, doença rara (DR) é aquela que afeta até 65 pessoas em cada 100.000 indivíduos, ou seja, 1,3 pessoas para cada 2.000 indivíduos. As DR são caracterizadas por uma ampla diversidade de sinais e sintomas e variam não só de doença para doença, mas também de pessoa para pessoa acometida pela mesma condição. As DR são geralmente crônicas, progressivas, degenerativas e até incapacitantes, afetando a qualidade de vida das pessoas e de suas famílias. O número exato de DR não é conhecido. Estima-se que existam entre 6.000 e 8.000 tipos diferentes de DR. Oitenta por cento (80%) delas decorrem de fatores genéticos, as demais advêm de causas ambientais, infecciosas, imunológicas, entre outras. Muito embora sejam individualmente raras, como um grupo elas acometem um percentual significativo da população, o que resulta em um problema de saúde relevante (Ministério da saúde, 2014).

1.2. DOENÇAS NEUROMUSCULARES: CONCEITO, CLÍNICA E CLASSIFICAÇÃO

As doenças neuromusculares (DNM) são DR e representam um grupo de afecções que comprometem a unidade motora, podendo comprometer os neurônios do corno anterior da medula, a raiz nervosa e os nervos periféricos, a junção neuromuscular ou o músculo (TARINI, 2005; DINIZ *et al*, 2010).

A estimativa é de que uma em cada 3.000 pessoas apresente algum tipo de DNM. Nos Estados Unidos, a prevalência estimada de pessoas é de 400.000 pessoas. As DNMs podem ser classificadas em genéticas ou adquiridas (DINIZ *et al* 2010).

Em 2004, Torricelli afirmou que as distintas formas de DNM se diferenciam clinicamente pela idade de início dos sintomas, pela distribuição da fraqueza muscular, sua associação com cardiopatias e o acometimento do sistema nervoso central ou periférico.

Na infância, as DNMs mais comuns são as de origem genética, entre as quais se destacam a distrofia muscular de Duchenne (DMD; *MIM#310200*), que apresenta incidência em torno de 1:3.500 a 1 em 5000 nascidos do sexo masculino, e a amiotrofia espinhal progressiva (*MIM#253300 253400 253550 271150*), cuja incidência é de 1 para 10.000 a 12.000 (DINIZ, GPC *et al*, 2010).

As DNM, como descrito em sua própria definição, acometem a unidade motora. Portanto, manifestam-se clinicamente como a síndrome do neurônio motor inferior. Numa avaliação mais detalhada, observa-se que as manifestações clínicas das DNMs variam de acordo com a topografia da lesão na unidade motora. Os principais sintomas são: fraqueza muscular acentuada, de localização focal ou generalizada, reflexos osteotendíneos diminuídos (hipoativos ou abolidos) em alguns casos a presença de fasciculações, quando acomete o corno anterior da medula, e o tônus muscular pode estar diminuído ou normal. Estes sintomas são mais intensos ou ausentes de acordo com o tipo da DNM (DINIZ, GPC *et al*, 2010).

As DNM, de origem genética, são classificadas de acordo com a localização da lesão na unidade motora: neurônios motores do corno anterior da medula, raiz nervosa, nervo periférico, junção mioneural ou a fibra muscular. Na infância, as principais doenças que acometem o neurônio motor do corno anterior da medula é a atrofia espinhal progressiva (AME: I, II, III). As polineuropatias sensitivo-motoras (doença de Charcot-Marrie-Tooth) são exemplos de doenças que acometem a raiz nervosa e o nervo periférico. O envolvimento da junção mioneural é observado nas síndromes miastênicas congênitas. Nas miopatias e distrofias musculares há acometimento da fibra muscular (distrofia muscular de Duchenne e Becker, distrofia miotônica, miopatias congênitas e miopatias metabólicas). A DMD é a DNM mais comum na infância, já a distrofia tipo Becker (DMB *OMIM#300376*) é cerca de 10 vezes mais rara. Clinicamente a diferença entre essas duas formas está na idade de início e velocidade de progressão da doença (DINIZ, GPC *et al*, 2010).

As distrofinopatias incluem um grupo de patologias musculares, que podem apresentar um espectro clínico bem variável, que vai desde uma forma leve, com aumento de creatinoquinase (CK), presença de câimbras freqüentes e mioglobinúria, até o espectro mais grave que são as distrofias musculares progressivas, a qual a mais frequente é a DMD (DARRAS *et al*, 2014).

As distrofias musculares são um grupo diverso de patologias que se caracterizam por fraqueza muscular progressiva com envolvimento cardíaco ou não. A classificação clinica das distrofias musculares se baseia na idade de início, na sua gravidade, distribuição dos músculos

afetados e modo de herança genética. A classificação clínica está sendo consolidada por aspectos importantes da biologia molecular das DMD, que serão abordados mais adiante (WORTON *et al*, 1994).

1.3. DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE (DMD)

1.3.1. Definição e Histórico

A DMD é uma doença rara, geneticamente determinada, com padrão de herança recessiva ligada ao X. Mutações no gene *DMD* levam a uma ausência ou deficiência da proteína distrofina. A DMD se caracteriza por enfraquecimento muscular, progressivo e simétrico, observado clinicamente a partir do terceiro ou quarto ano de vida.

Em 1851 o médico inglês Edward Meryon descreveu nove casos de distrofia muscular em três famílias. Além de descrever o caráter familiar da doença, informando a presença da doença apenas em meninos, relatou também que esta distrofia afetava os músculos, sem encontrar alterações em nervos da coluna e gânglios. Estudos de microscopia em material necropsiado levou Meryon a concluir: “as fibras primárias elementares estriadas foram completamente destruídas, o elemento sarcático sendo difundido e em muitos lugares convertido em glóbulos de gorduras e matéria granular, enquanto o sarcolema ou túnica da fibra elementar foi quebrada e destruída” (EMERY, 2001).

Em 1858, Duchenne documentou o caso de um menino de nove anos que perdeu a capacidade de andar devido a uma doença muscular e dez anos depois deste relato publicou 13 casos semelhantes. Duchenne foi além do seu diagnóstico, fornecendo em 1869, a descrição mais completa do que, a princípio ele chamava de *distrofia pseudo-hipertrofica*, baseando-se na aparência superdesenvolvida do músculo da panturrilha. Esta patologia atualmente atende pelo nome de *Distrofia Muscular de Duchenne* (DMD). Duchenne fez inúmeras observações importantes em relação a sinais e sintomas, que afetam especialmente os músculos da cintura pélvica e mais tarde, os da cintura escapular, com pseudo-hipertrofia das panturrilhas. Descreveu também que o comprometimento intelectual pode fazer parte da clínica da doença, além de achados de biopsia muscular, demonstrando as alterações de tecido adiposo e um aumento do tecido intersticial na fibra muscular. Ele concluiu que a doença foi

localizada particularmente no tecido intersticial do músculo (Apud - DUCHENNE,1867; SILVA,2013, p. 4).

Até 1980 pouco se sabia sobre as causas genéticas das distrofias. Em 1986, um grupo de pesquisadores,Louis Kunkel (Harvard Medical School, Boston - EUA) e Ronald Worton (Hospital para Niños Enfermos, Toronto – Canadá), identificou um gene, denominado *DMD* e que, mutações neste gene, causariam a DMD. Em 1987 a equipe de Louis Kunkel identificou a proteína associada a este gene e denominada de *distrofina*, cuja função é manter as propriedades físicas da membrana da célula muscular (Apud - DUCHENNE,1867; SILVA,2013 p. 4).

1.3.2. Aspectos Clínicos

A DMD caracteriza-se por fraqueza muscular proximal, progressiva com hipertrofia das panturrilhas, os sintomas iniciais ocorrem na cintura pélvica e posteriormente na cintura escapular. Os indivíduos afetados podem ter marcos motores levemente atrasados e a maioria é incapaz de correr e saltar adequadamente devido à fraqueza muscular proximal. Atrasos na fala também foram relatados (DARRAS *et al*, 2000; BUSHBY *et al*, 2010).

Atualmente, os estudos de história natural da doença demonstram que na DMD, os sintomas iniciais de atraso da marcha, quedas frequentes e dificuldade em correr e subir escadas tendem a ser visto entre as idades de 1 a 3 anos. As Crianças com DMD normalmente necessitam de cadeira de roda com a idade de 8-14 anos, devido ao enfraquecimento muscular levar a perda da deambulação (RYDER *et al*, 2017).

A DMD é uma doença dos músculos com repercussão multisistêmica, levando a disfunção de diversos órgãos como o coração, o sistema respiratório, endócrino e o sistema nervoso central (RAE & O'MALLEY, 2016).

Com a progressão da doença verifica-se o comprometimento dos músculos intercostais, o qual altera a dinâmica respiratória. A escoliose leva a problemas ortopédicos no ombro ou no quadril, tornando-os assimétricos, levando a potenciais problemas respiratórios restritivos, devido à redução da mobilidade da caixa torácica. Os afetados raramente sobrevivem após a terceira década, sem suporte ventilatório. Além disso, nota-se o envolvimento da musculatura cardíaca, em torno de 80% dos pacientes, com manifestação clínica geralmente em fase mais avançada da doença, embora a doença neste órgão tenha,

provavelmente, iniciado o seu desenvolvimento mais cedo. Cerca de 30 a 50% dos pacientes com DMD têm déficit cognitivo de intensidade variável e com característica não progressiva (RYDER *et al*, 2017).

Quadro 1. Perda progressiva dos marcos motores. Evolução natural da doença.

| 1- 4 Anos | 5 –8Anos | 8 – 14 Anos | 14 – 20 Anos |
|---|--|---|---|
| Deambulante precoce | Deambulante tardio | Não deambulante precoce | Não deambulante tardio |
| Manobra de Gowers presente | Marcha muito mais elaborada | É capaz de colocar-se de pé por si só por algum tempo | Acentuação progressiva com comprometimento dos membros superiores |
| Marcha balanceada | Perda da habilidade de subir escadas e levantar-se do chão | Consegue manter a postura | Não consegue manter a postura ereta. |
| Inicia marcha em ponta dos pés (marcha digitígrada) | | Pode desenvolver escoliose | |
| Consegue subir escadas | | | |

Fonte: Ryder (2017).

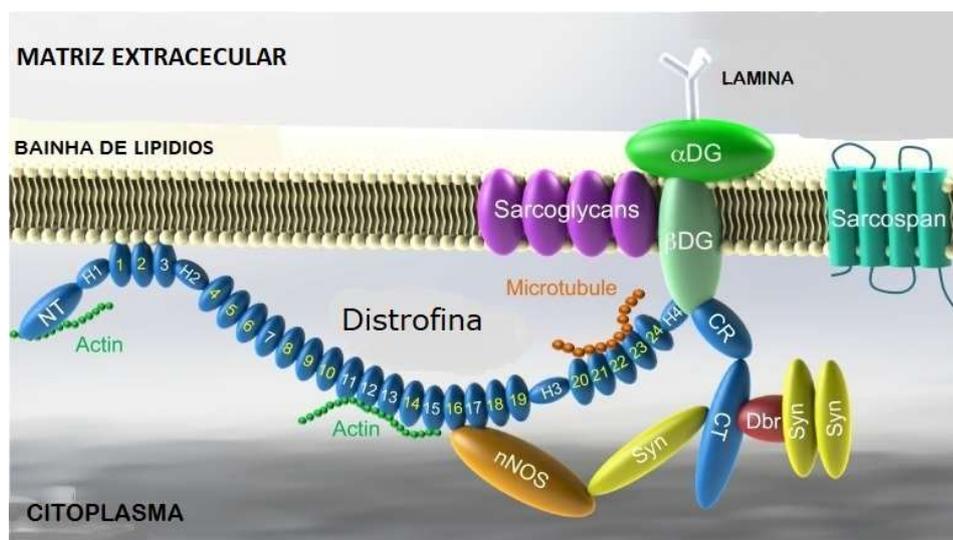
1.3.2.1. A Distrofina

A distrofina é uma proteína codificada pelo gene *DMD* e faz parte de um complexo de glicoproteína (DGC), cuja função é proporcionar uma forte ligação mecânica do citoesqueleto intracelular à matriz extracelular. O DGC é composto por proteínas transmembranar, citoplasmáticas e extracelulares. Com o surgimento de dados sobre os numerosos e diversos componentes do complexo e como eles interagem uns com os outros, tornou-se cada vez mais claro que o DGC possui propriedades estruturais e de transdução de sinal. Essas proteínas são encontradas em diferentes combinações dependendo do tipo muscular (KAREN *Aet al*, 2004).

A distrofina contém os domínios N-terminal (NT) e C-terminal (CT), o qual é rico em cisteína (CR). O domínio da haste do meio é composto por 24 repetições *spectrin-like* e quatro pontos de ligação (H1, H2, H3 e H4). A distrofina possui dois domínios de ligação à

actina localizados em NT e nas repetições 11-15, respectivamente. As repetições 1-3 interagem com a bicamada lipídica carregada negativamente. As repetições 16 e 17 formam o domínio neuronal de óxido nítrico sintase (nNOS). A distrofina interage com o microtúbulo através das repetições 20-23. Parte de H4 e o domínio CR se ligam à subunidade β do distroglicano (β DG). O domínio CT da distrofina interage com a sintrofina (Syn) e a distrobrevina (Dbr). A distrofina liga componentes do citoesqueleto (actina e microtúbulos) à laminina na matriz extracelular. Sarcoglicanos e sarcospan não interagem diretamente com a distrofina, mas fortalecem todo o DGC, que consiste de distrofina, β DG, sarcoglicanos, sarcospan, Syn, Dbr e nNOS (figura 1). A estabilidade da conformação proteica, bem como a forte interação entre as proteínas, depende de seus efeitos hidrofóbicos (MCGREEVY *et al*, 2015; LIANG *et al*, 2015).

Figura 1. Desenho esquemático da distrofina e do complexo glicoproteico (DGC).

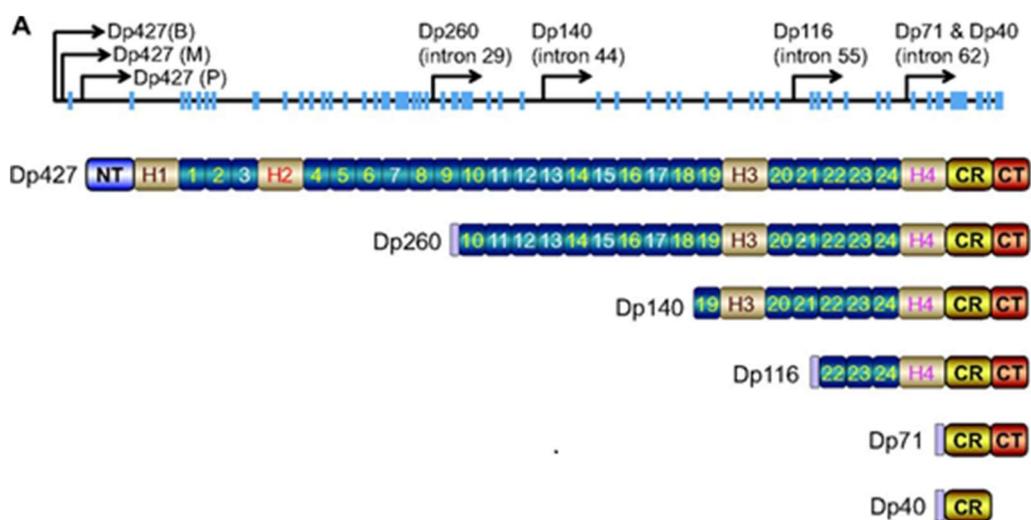


Fonte: Disease Models & Mechanisms (MCGREEVY *et al*, 2015)

O gene *DMD* possui regiões promotoras as quais originam diferentes formas de distrofina, pelo menos sete isoformas de distrofina principais a partir de sete regiões promotoras reconhecidas, as quais conferem especificidade de desenvolvimento regional e celular no sistema nervoso central. Três isoformas de comprimento total são derivadas das principais sequências promotoras proximais, antes e imediatamente após o exon 1, Dp427c (também referido por alguns autores como Dp427B, Dp427M e Dp427P). Pelo menos quatro produtos de mRNA mais curtos Dp260, Dp140, Dp116 e Dp71 são transcritos a partir de

regiões promotoras distais localizados dentro dos íntrons de *DMD* (Figura 2). Entre estes, Dp71 e Dp140 são particularmente abundantes no encéfalo fetal, o que levou à sugestão de que eles podem ter importância particular para os defeitos cognitivos na DMD, como demonstrado na quadro 2 (TAYLOR *et al*, 2010).

Figura 2. O gene *DMD* e suas regiões promotoras das isoformas de distrofina.



Fonte: DiseaseModels & Mechanisms (2015)

Quadro 2. As isoformas da distrofina e suas áreas de expressão.

| Isoformas | Intron | Expressão |
|---------------|---------------------|---|
| Dp427c | Promotoras iniciais | Córtex cerebral, hipocampo, músculo esquelético e cardíaco. |
| Dp427m | Promotoras iniciais | Células gliais e córtex cerebral fetal. Músculo esquelético e cardíaco. |
| Dp427p | Promotoras iniciais | Neurônios cerebelares de Purkinje e musculo esquelético. |
| Dp260 | 29 | Retina, cérebro e musculo cardíaco. |
| Dp140 | 44 | Predominantemente durante o desenvolvimento cerebral do feto. |
| Dp116 | 55 | Células de Schwann. |

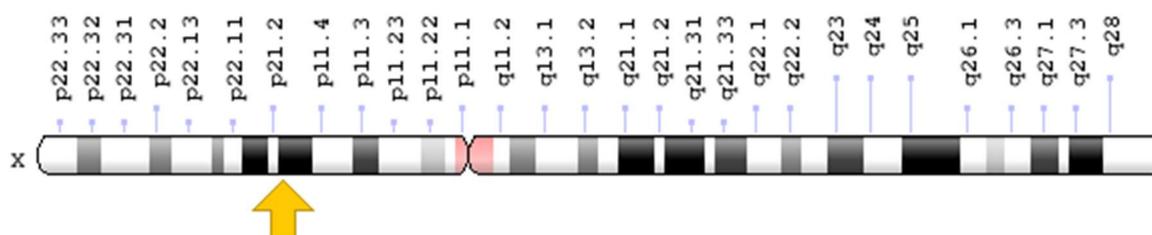
| | | |
|-------------|----|--|
| Dp71 | 62 | SNC (hipocampo e neocórtex), glândula pituitária, bulbo olfatório, retina, rim, pulmão e músculo cardíaco. Ausente no músculo esquelético. |
|-------------|----|--|

Fonte: Adaptado de Silva (2013) e Taylor (2010)

1.3.3. Aspectos Genético-Moleculares

O gene *DMD* foi identificado na década de oitenta, por Greenstein, é o maior gene humano conhecido. O que contribui significativamente para a sua alta taxa de mutação espontânea, devido os 79 exons que codificam 2,4 milhões de nucleotídeos no cromossoma Xp21 (Figura 3). Um em cada três casos de DMD é causada por uma mutação de novo (KAREN *et al*, 2004; AARTSMA-RUS *et al*, 2016).

Figura 3. Cromossoma X, localização do gene *DMD*.



Fonte: [GenomeDecoration Page/NCBI](#)

Nos estudos americanos e europeus aproximadamente 80% dos casos de DMD são devidos a grandes rearranjos mutacionais, deleções ou duplicações, e aproximadamente 20% para pequenas mutações. As mutações pontuais, em torno de 10% alteram o quadro de leitura do gene *DMD* ou introduzem um *códon* de parada prematuro, ambos cessando a produção da proteína distrofina. As mutações sejam deleções ou duplicações podem ocorrer em qualquer lugar no gene, mas estão concentradas entre os exons 45-55 e exons 2-10, respectivamente podendo ser única ou dupla (ALMEIDA *et al*, 2017; AARTSMA-RUSS, 2016). Mutações do gene *DMD* causam a DMD, a distrofia muscular Becker (DMB) e a cardiomiopatia dilatada ligada ao X (XLDCM) (KAREN A *et al*, 2004).

Compreender o tipo e a frequência das mutações específicas que dão origem a fenótipos associados à DMD é uma ferramenta inestimável para diagnóstico genético, pesquisa

científica básica e melhor atendimento clínico, levando potencialmente a novos tratamentos para a doença. Atualmente, o banco de dados TREAT-NMD DMD Global contém mais de 7.000 mutações (7149 até novembro de 2013). Cerca de 5682 mutações (80,0%) causam grandes rearranjos no gene *DMD*: 4894 (86%) são deleções (1 exon ou mais) e 784 (14%) são duplicações (um ou mais exons); 1.445 mutações causam pequenos rearranjos no gene *DMD* representando 20% de todas as mutações (Quadro 3): 358 (25%) são deleções (menor que 1 exon), 132 (9%) são duplicações (menor que um exon) e 199 (14%) são mutações intrônicas; mutações pontuais totalizaram 756 (10% de todas as mutações, 52% das pequenas mutações) com 726 mutações sem sentido (10% de todas as mutações, 50% das pequenas mutações) e três mutações missense (<1% de todas as mutações, 2% de pequenas mutações). Finalmente, foram observadas 22 mutações mid-intrônica (menos de 1% de todas as mutações, 0,3% de pequenas mutações) (BLADEN *et al*, 2015).

Quadro 3: Resumo do banco de dados TREAT-NMD DMD

| % | Tipo de mutação | Deleções | Duplicações | Mutação de Ponto |
|-----|--|----------|-------------|------------------|
| 80% | Grandes rearranjos no gene <i>DMD</i> | 86% | 14% | - |
| 20% | Pequenos rearranjos no gene <i>DMD</i> | 25% | 9% | 52% |

Fonte: BLADEN *et al*, 2015

1.3.4. Fisiopatologia

As mutações presentes no gene *DMD* prejudicam a função da distrofina. Como resultado, a ligação entre o citoesqueleto de actina e o tecido conjuntivo é perdida, e as fibras musculares são facilmente modificadas durante a contração, levando a lesão muscular crônica, inflamação e eventualmente a substituição das fibras musculares por gordura e tecido fibroso, levando assim a perda da função muscular. Em contraste, indivíduos com distrofia muscular de Becker (DMB), geralmente tem mutações que trazem menos prejuízo à estrutura proteica, mantendo a ligação da actina ao tecido conjuntivo e a distrofina parcialmente funcional. Dessa forma, os indivíduos com DMB apresentam frequentemente um início mais tardio e

uma progressão mais lenta da doença. Por outro lado, quase todos os pacientes com DMB desenvolverão cardiomiopatia, independentemente do fenótipo do sistema musculoesquelético (AARTSMA-RUSS *et al*, 2016).

Mônaco *et al* (1988), propuseram que, se a mutação do gene da distrofina interromper o quadro de leitura, a expressão da distrofina é gravemente afetada, resultando em sintomas graves de DMD; se o quadro de leitura não for interrompido pela mutação, a distrofina é parcialmente produzida, tendo como resultado a apresentação clínica da DMB. De acordo com a "regra do quadro de leitura", as mutações fora do quadro causam DMD enquanto as mutações no quadro resultam na DMB. Esta regra é usada para explicar a relação entre genótipo e fenótipo na patogênese de DMD. No entanto, Hassan *et al* (2008) descobriram que 22,1% dos pacientes com uma mutação no quadro foram diagnosticados como tendo DMD, o que é difícil de explicar apenas pela regra de quadros de leitura. Esta descoberta sugere a existência de mecanismos ainda não esclarecidos que poderiam ser importantes para a função da distrofina (LIANG *et al*, 2015).

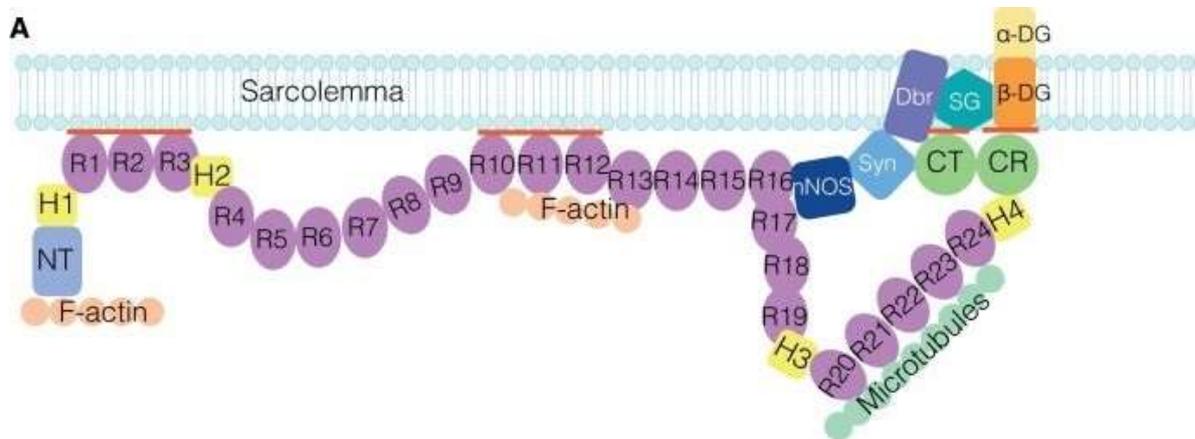
Estudos relataram que o comprometimento mutacional das regiões hidrofóbicas da distrofina, mesmo quando essas mutações estão no quadro, leva à DMD, na maioria dos casos, sugerindo um importante papel das regiões hidrofóbicas da distrofina. Existem quatro regiões hidrofóbicas na distrofina, que são encontradas na porção CH2 do domínio de ligação da actina (ABD) região I, em R16 (região II), no ponto de ligação H3, região III, e em uma mão dupla de hélice (EF), região IV, de domínio rico em cisteína. Essas áreas são importantes áreas funcionais da distrofina. As regiões hidrofóbicas I, II e IV, respectivamente, afetam a ligação da actina, nNOS-sarcolemma e β -dystroglycano, proteínas associadas da DGC. As mutações dessas regiões hidrofóbicas prejudicam diretamente a formação da DGC e o consequente dano mutacional, mesmo quando no quadro (*in-frame*), resulta no desenvolvimento do fenótipo DMD. A região hidrofóbica III contém o ponto de ligação H3 e desempenha um papel importante na estabilidade da estrutura da distrofina. A deleção de H3, em contraste, alonga a ordem de STR (Short Tandem Repeat), causando sintomas clínicos menos graves do que em pacientes com H3 intacta. A hidrofobia da região III é a mais forte e tem relação com o exon 51 e 52 (LIANG *et al*, 2015).

Em 2016 foi identificado R1-3, R10-12 e CT como novos domínios de ligação de membrana (DMOs), alternativos na distrofina, propondo um novo modelo de interação distrofina-sarcolemma (Figura 4). Em suas conclusões apenas o domínio CR e CT são capazes de restaurar o DGC, sugerindo que a interação distrofina-sarcolemma é muito mais complexa.

Este modelo pode explicar melhor a participação dinâmica da distrofina na manutenção da integridade da membrana celular muscular. (ZHAO *et al*, 2016)

Além da função estabilizadora, a distrofina atua no processo de sinalização, interagindo com a função circulatória dos canais iônicos. Isto facilita a ação de um mecanismo para a vazão da membrana plasmática, gerando um acúmulo de cálcio intracelular importante para a realização da contração muscular (KARENet *et al*, 2004).

Figura 4. O novo modelo de interação distrofina-sarcolema no músculo.



Fonte: Hum Mol Genét. (2016)

1.3.5 Diagnóstico

O diagnóstico de DMD deve ser o mais precoce possível, rápido e preciso, a fim de garantir um início imediato das intervenções. Diante da suspeita clínica de DMD, menino com perda de força muscular progressiva, ou quedas frequentes, deve ser determinado o nível sérico de creatinoquinase (CK).

1.3.5.1 Creatinoquinase (CK)

A CK é uma enzima de alta energia; é uma fonte rápida de energia para as células. Durante o processo de degeneração muscular ocorre ruptura da membrana celular e este

conteúdo cai na corrente sanguínea, como há grande quantidade de CK no músculo, o aumento de CK sérico indica dano muscular. (SILVA, MC, 2013)

Os níveis séricos de CK em pacientes com DMD estão elevados de 10 – 100 vezes em relação aos valores de normalidade (NASCIMENTO OSORIO *et al*, 2017). Ao nascimento, os pacientes com DMD apresentam aumento das enzimas musculares, principalmente a creatinoquinase (CK), até 300 U/L, com maior pico entre um e dois anos de vida. Há aumento também das transaminases aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), o que pode, de forma errônea, levar a uma suspeita de enfermidade hepática, em meninos com DMD pré-sintomáticos (BELLO & PEGORARO, 2016; NASCIMENTO OSORIO *et al*, 2017). Os níveis de CK tendem a diminuir com a idade, devido a eliminação progressiva das fibras musculares distróficas (ZATSet *al*,1976). Se existem antecedentes familiares para DMD deve ser realizado um rastreio com a dosagem de CK, antes mesmo das manifestações clínicas (NASCIMENTO OSORIO *et al*, 2017). Cerca de 10% de mulheres portadoras da mutação no gene *DMD*, também apresentam uma elevação dos níveis de CK (HOFFMAN *et al*, 1992). Não há uma correlação significativa entre os níveis de CK, a gravidade e progressão da doença. A determinação da atividade enzimática de CK é uma ferramenta eficaz como triagem, mas não pode ser considerado um método de diagnóstico confirmatório de DMD. Drummond demonstrou que os níveis de CK, em recém-nascidos, são acentuadamente elevados no primeiro dia de vida. Mas a partir do quarto dia, as concentrações séricas de CK reduziram para dentro de 3 vezes o limite superior da faixa normal para adultos. Este achado pode ser um indicativo de mensuração da atividade de CK a ser considerada na triagem neonatal a partir do terceiro dia de vida. (DRUMMOND, 1979).

1.3.5.2 Estudo Molecular

Quando há suspeita de DMD, se recomenda realizar precocemente o estudo genético (NASCIMENTO OSORIO *et al*, 2017). Cerca de 60 a 70% das mutações causadoras de DMD são grandes rearranjos (deleções ou duplicações), incluindo um ou mais exons. Estas mutações são identificadas em homens afetados e mulheres portadoras através de técnicas moleculares, como a amplificação de sonda dependente de ligação multiplex (MLPA). Técnicas quantitativas alternativas incluem multiplex PCR e *array* competitivos de hibridação genômica (Array-CGH). Quando estes procedimentos não forem capazes de identificar os

grandes rearranjos no gene *DMD*, a análise de sequenciamento pode permitir a identificação de mutações pontuais ou pequenas deleções/duplicações (20% dos pacientes têm pequenas mutações). Embora o sequenciamento clássico de Sanger ainda seja utilizado, as análises moleculares usando sequenciamento de nova geração (NGS) estão se tornando cada vez mais acessíveis. Em casos raros em que nenhuma mutação foi identificada por sequenciamento de regiões de codificação de DNA genômico, porém a concentração de CK e os sinais clínicos sugerem fortemente o diagnóstico de DMD, o mRNA do *DMD* pode ser isolado do tecido muscular esquelético, a partir de uma biópsia muscular, diagnóstica, obtida especificamente para esse fim (NASCIMENTO OSORIO *et al*, 2017; BELLO & PEGORARO, 2016).

A identificação de mutações em pacientes com DMD é importante para fornecer medidas de aconselhamento genético à família, podendo ser aplicada também a correlações genótipo-fenótipo, prognóstico, e estratégias de novos tratamentos responsivos a determinadas mutações no gene *DMD* (BELLO & PEGORARO, 2016,A; NASCIMENTO OSORIO *et al*,2017).

1.3.5.3 Biópsia Muscular

O primeiro passo no diagnóstico da DMD por muito tempo era baseado na análise de proteínas em uma biópsia muscular por imuno-histoquímica e/ou análise Western blot. O estudo com microscopia óptica mostra um padrão distrófico com destruição da arquitetura fascicular do músculo, necroses e regeneração de fibras musculares, e incremento de tecido conectivo-adiposo endomesial. Mediante técnicas de imuno-histoquímica se comprova a deficiência de distrofina. O diagnóstico de DMD com o uso de técnicas de biologia molecular apresenta vantagens quando comparado ao diagnóstico por biópsia muscular, uma vez que este último representa um procedimento invasivo. Por isto, tem sido recomendado o diagnóstico molecular para os casos de DMD (NASCIMENTO OSORIO *et al*, 2017).

Para a maioria dos pacientes, biópsias musculares não são necessárias. Em casos excepcionais, a análise de proteínas pode revelar se a distrofina está ausente em pacientes com um fenótipo claro de DMD, mas sem a identificação da mutação do gene *DMD*. Em caso afirmativo, o RNA pode ser isolado do tecido biopsiado e a análise pode revelar um transcrito aberrante de mRNA da distrofina. Biópsias musculares também podem ser úteis em pacientes que apresentam um fenótipo discordante. Por exemplo, se um paciente não tem uma mutação

no quadro de leitura do gene *DMD*, mas se apresenta como DMD, uma biópsia pode revelar a ausência de distrofina e vice-versa. Os baixos níveis de distrofina detectados na biópsia muscular de um paciente com uma mutação fora de quadro, apresentando um fenótipo mais leve, podem explicar essa discrepância. No entanto, a análise da distrofina pode fornecer uma explicação do motivo pelo qual o curso da doença é mais lento ou mais rápido do que o esperado, mas não mudará realmente o curso desta (NASCIMENTO OSORIO *et al*, 2017; AARTSMA-RUS, A, *et al*, 2016)

1.3.6 Tratamento

A história natural da DMD tem se modificado nos últimos anos devido à instauração de um tratamento multidisciplinar precoce, que inclui a administração de corticosteroides e o adequado manejo respiratório, cardíaco, nutricional e ortopédico, levando à diminuição ou estabilização do ritmo de progressão da doença. (SALAS, 2014).

1.3.6.1 Administração De Corticosteroides

O glicocorticoide é a única droga disponível atualmente que diminui a perda da força muscular na DMD, também reduz o risco de escoliose e estabiliza a função pulmonar. A função cardíaca pode também melhorar, mas com limitações. Matthewset *al*(2016), realizaram uma meta-análise de uso de corticoide em DMD e concluíram que evidências de qualidade moderada de estudos clínicos randomizados (ECRs) indicam que a terapia com corticosteroides melhora a força e a função muscular a curto prazo (doze meses) e a força muscular em até dois anos. Recomenda-se iniciar o tratamento quando a motricidade já se encontra estável (4-6 anos de idade). As doses recomendadas para as crianças, cuja função deambulatoria ainda permanece, são de 0,75mg/kg e 0,9mg/kg por dia de prednisona e deflazacort, respectivamente, administradas no turno da manhã e em regime contínuo.

Há controvérsias se deve manter o tratamento com corticoide em regime contínuo, após a perda da deambulação. Estudos recentes mostram a importância do corticoide para preservar a força dos membros superiores, reduzir a progressão das escolioses e retardar a doença cardíaca e pulmonar. De acordo com um amplo estudo longitudinal comparativo de corticosteroides diários ou intermitentes (10 dias sim e 10 dias não) por um período médio de

quatro anos, um regime diário prolonga a deambulação e melhora os escores funcionais acima dos sete anos, mas com maior frequência de efeitos colaterais do que um regime intermitente. É importante o monitoramento e supervisão constantes dos efeitos colaterais. Os efeitos colaterais mais frequentes são o ganho de peso excessivo, anormalidades comportamentais, aparência cushingóide e crescimento excessivo de pelos. A opção por um esquema mais poupador, para os pacientes não deambulantes, se faz necessário em alguns casos, onde os efeitos colaterais são mais exuberantes. Quando os efeitos colaterais não são possíveis de serem manejados, a dose deve ser reduzida em 30% antes da retirada total (BUSHBY *et al*, 2010; MATTHEWS *et al*, 2016, A; NASCIMENTO OSORIO *et al*, 2017). O quadro 4 demonstra os principais efeitos colaterais devido ao uso de glicocorticoides e as recomendações clínicas para a atenuação dos mesmos.

Quadro 4. Principais efeitos colaterais do tratamento com corticoide. Seguimento e medidas terapêuticas.

| Efeitos colaterais do corticoide | Medidas recomendadas |
|---|---|
| Ganho de peso excessivo | Orientação nutricional que permita prevenir o sobrepeso. |
| Anormalidades comportamentais | Manejar o horário e a dose do corticoide, caso não melhore, considerar terapia comportamental |
| Aparência cushingóide | Controle da dieta com restrição da ingesta de açúcar e sal. |
| Crescimento excessivo de pelos e acne | Tratamento tópico, sem necessidade da mudança de dose ou tipo de corticoide. |
| Hipertensão | |
| Catarata | Avaliar a troca do corticoide. É mais frequente com deflazacorte. |

Fonte: Adaptado de A. Nascimento Osorio *et al*(2017)

1.3.6.2 Manejo Respiratório

As complicações respiratórias são uma das principais causas de morbidade e mortalidade na DMD. As complicações incluem fadiga muscular respiratória, obstrução com muco, atelectasia, pneumonia e insuficiência respiratória. Se este quadro clínico não for tratado, os pacientes correm o risco de dispneia grave, internações hospitalares prolongadas devido à atelectasia ou pneumonia e morte por parada respiratória ou arritmias cardíacas induzidas por insuficiência respiratória. (BIRNKRANT, DJ *et al*, 2018)

O manejo respiratório inclui avaliações pulmonares anuais para pacientes mais jovens, no final da primeira década. Assim que o paciente se tornar não deambulante recomenda-se monitoramento pulmonar mais agressivo e intervenções preventivas. De acordo com diretrizes internacionalmente reconhecidas, uma abordagem estruturada para o manejo respiratório da DMD compreende: a incorporação de um pneumologista e um fisioterapeuta respiratório na equipe, e cuidadores domiciliares, para realizar testes de função pulmonar e estudos do sono, iniciar e gerenciar recrutamento de volume pulmonar, tosse assistida mecânica e manualmente, para melhorar a depuração das vias aéreas e reduzir o risco de infecção pulmonar. O uso de ventilação não invasiva previne a hiporventilação noturna, a respiração desordenada no sono e, finalmente, a insuficiência respiratória. De fato, o uso de ventilação mecânica não invasiva, desde o final da adolescência, aumentou a sobrevivência na DMD. É necessário tomar decisões para um gerenciamento respiratório otimizado, com conhecimento dos outros sistemas, especialmente do sistema cardíaco. Os novos critérios pretendem resultar em um uso mais antecipado dessas intervenções, com a possibilidade de que a terapia seja iniciada em pacientes mais jovens (MCDONALD *et al*, 2016; BIRNKRANT, DJ *et al* 2018). Estas condutas do manejo respiratório dos pacientes com DMD estão esquematizadas no quadro 5.

Quadro 5 Avaliações e intervenções para manejo respiratório de pacientes com DMD de acordo com a fase clínica da doença.

| Deambulantes | Não deambulante precoce | Não deambulante tardio |
|---|---|------------------------|
| Avaliação | | |
| Uma vez ao ano: CVF | Duas vezes ao ano: CVF, PEmax/PImax PKF, SpO2, PetCO2/PtcCo2 | |
| Estudo do sono* Para monitoramento de SHAOS ou desordens respiratórias. | | |
| Intervenção | | |
| Imunização para pneumococos e influenza anualmente. | | |
| | Recrutamento de volume pulmonar CVF = ou < 60% do previsto (empilhamento de ar- Ambú) | |
| | Assistência de tosse com valor previsto de CVF < 50%, PKF >270L/min, PEmax<60 cmH2O | |
| | Ventilação assistida noturna (não invasiva) diante de sinais de hipoventilação ou distúrbios respiratórios durante o sono* ou assintomáticos com CVF<50% ou PEmax<60cmH2O ou em vigília com SpO2<95% ou pCO2>45 | |
| | Ventilação diurna com sinais de hipoventilação ou SpO2 <95% ou pCO2>45 ou dispneia em vigília. | |

Fonte: Adaptado de Birnkrant, DJ *et al* (2018)

CVF capacidade vital forçada, PEmax, Pressão expiratória máxima. PImax pressão inspiratória máxima. PKF pico de fluxo, SpO2 saturação de oxigênio, PetCO2/PtcCo2 – pressão transcutânea de CO2 e pressão parcial transcutânea CO2.

1.3.6.3 Manejo Cardíaco

A doença cardíaca é uma das principais causas de mortalidade na DMD. A deficiência de distrofina no coração se manifesta com a cardiomiopatia dilatada. Conforme a doença

progride, o miocárdio falha em atender às demandas fisiológicas e a insuficiência cardíaca clínica se desenvolve. O miocárdio deficiente também está relacionado às arritmias, levando ao risco de vida. O tratamento cardíaco tem sido um desafio nesses pacientes, uma vez que muitos não são encaminhados ao especialista, além da própria manifestação clínica da doença, muitas vezes assintomática devido a imobilidade ou pouca mobilidade dos pacientes com DMD. Os sinais e sintomas de insuficiência cardíaca no indivíduo não deambulante são frequentemente sutis e negligenciados. A avaliação deve incluir eletrocardiograma (ECG) e ecocardiograma ao diagnóstico. A ressonância magnética cardíaca (RMC) é o exame de imagem não invasivo, de escolha, para a detecção de disfunção cardíaca e fibroses, porém pacientes até 7 anos de idade, podem não colaborar para a realização sem anestesia, além da disponibilidade deste exame, principalmente em nosso país. Dessa forma, o ecocardiograma se torna mais acessível. As revisões cardíacas devem ser anuais. Uma estratégia proativa de diagnóstico e tratamento precoce é essencial para maximizar a duração e a qualidade de vida na DMD (BIRNKRANT *et al*, 2018). Abaixo o quadro 6 indica as variáveis envolvidas no manejo cardíaco.

Quadro 6. Diagnóstico e tratamento cardíaco para pacientes com DMD.

| Momento do diagnóstico e até 10 anos de idade | Não deambulante precoce | Não deambulante tardio |
|---|---|---|
| Avaliações: | | |
| ECG e ECOCARDIO basal e anual. | ECG e ECOCARDIO ou RMC anual. ** | |
| RMC* > 7 anos basal e anual. | ECG e ECOCARDIO ou RMC a critério do cardiologista. *** | |
| | | Monitoramento com Holter e MAPA**** |
| Intervenções: | | |
| | Iniciar com ECA ou BRA ** | Maximizar a terapia com ECA ou BRA. Considerar tratamento antiarrítmico medicamentoso ou com dispositivo. |
| | | #Ventilação noturna não invasiva. |

Fonte: Adaptado de Birnkrant *et al*(2018)

* Se disponibilidade. ** Paciente assintomático. *** Paciente sintomático. **** A critério do cardiologista. MAPA mapeamento de pressão arterial. ECA enzima conversora de angiotensina. BRA Bloqueadores de receptores de angiotensina. # Discutir com a equipe os benefícios cardíacos com o suporte ventilatório.

1.3.6.4 Manejo Nutricional E Gastrointestinal

Durante o curso da doença os pacientes com DMD apresentam complicações gastrointestinais ou nutricionais, incluindo ganho ou perda de peso, desequilíbrio nutricional ou hídrico, baixa densidade óssea, disfunção da deglutição e contratura mandibular. Os fatores contribuintes incluem o tratamento com glicocorticoides, o gasto energético diminuído e a imobilidade. Esses desequilíbrios nutricionais podem afetar negativamente o sistema respiratório, musculoesquelético e o sistema cardíaco. O objetivo do cuidado nutricional é prevenir o excesso de peso ou a obesidade e a desnutrição, através da avaliação regular do crescimento e do peso; também visa promover uma dieta saudável e balanceada, com ingestão ideal de calorias, proteínas, líquidos e micronutrientes, especialmente cálcio e vitamina D. Quando a perda de peso ocorre sem mudança na dieta, deve ser avaliada a possibilidade de maior gasto energético, devido ao trabalho respiratório, devendo ser avaliado a necessidade de instalar a ventilação não invasiva. Os pacientes em fase não deambulante são susceptíveis a refluxo gastroesofágico (RGE) e esofagite, que de maneira geral são tratados com antagonistas do receptor H₂ e inibidores da bomba de prótons, isolados ou em combinações com prócinéticos, e antiácidos neutralizantes.

Na falta de uma pesquisa nutricional robusta, baseada em evidências, específica para DMD as recomendações nutricionais aplicáveis são, portanto, adaptadas das recomendações para a população em geral (NASCIMENTO OSORIO *et al*, 2017; BIRNKRANT *et al*, 2018).

1.3.6.5 Manejo Ortopédico

Meninos com DMD tratado com glicocorticoide frequentemente desenvolvem osteoporose, que se manifesta como fraturas vertebrais ou de ossos longos com pequeno trauma. De 20 a 60% dos meninos com DMD têm fraturas de extremidade com pequeno trauma (geralmente o fêmur distal, tíbia ou fíbula), enquanto que até 30% desenvolvem fraturas vertebrais sintomáticas. As fraturas vertebrais são frequentemente assintomáticas e são identificadas em crianças, com doenças tratadas com glicocorticoides, por meio de um programa de monitoramento, que inclui uma radiografia lateral da coluna anualmente. Se não forem tratadas, as fraturas vertebrais podem levar à dor crônica nas costas, e à deformidade da

coluna, enquanto as fraturas nas pernas podem causar perda prematura e permanente da deambulação. Até o momento não há nenhum estudo referente a melhor opção de esteroide para diminuir o impacto nos ossos (fraturas), para os pacientes com DMD. Estudos comparativos de diferentes esquemas de esteroides na DMD estão em andamento, avaliando o efeito na estatura final do adulto, composição corporal e fraturas (BIRNKRANT *et al*, 2018).

Atualmente, foram apresentadas considerações de cuidado para o monitoramento que permitirão o diagnóstico e o tratamento oportuno da osteoporose em meninos e homens com DMD. A diferença da orientação atual em relação as considerações de cuidado de 2010, é que a monitoramento e o diagnóstico da saúde óssea em crianças não focam mais na densidade mineral óssea (DMO). Em vez disso, a DMO serve como um adjuvante em uma abordagem que foca na identificação dos primeiros sinais de fragilidade óssea. As fraturas vertebrais - definidas de acordo com o método Genant como leve (grau 1), moderada (grau 2) ou grave (grau 3) - são agora vistas como uma manifestação frequente de osteoporose em crianças com doenças crônicas, incluindo aquelas com DMD, tratada com glicocorticoide. Portanto, para detectar fraturas vertebrais, a imagem da coluna não deve ser solicitada apenas quando houver dor nas costas ou deformidade; em vez disso, pacientes com fatores de risco conhecidos para fraturas vertebrais, incluindo distúrbios motores ou terapia com glicocorticoides, devem receber exames de imagem da coluna regularmente (BIRNKRANT *et al*, 2018).

Nas atuais considerações sobre cuidados, a radiografia da coluna basal e radiografias anuais para detecção e seguimento de fratura vertebral são recomendadas em todos os pacientes, com fatores de risco para osteoporose. Em geral, as radiografias da coluna devem ser priorizadas sobre a DMO, tendo em vista a necessidade de detectar os primeiros sinais de fragilidade óssea. Além da radiografia de colunas são necessárias dosagens bioquímicas de vitamina D, cálcio, magnésio, fosfato, fosfatase alcalina e hormônio da paratireoide, em uma avaliação inicial e posteriormente, anual. Frente aos resultados, mesmo com o paciente assintomático, com presença de fraturas vertebrais de baixo trauma ou fraturas de ossos longos, está indicado o tratamento com bifosfonato intravenoso. Revisões recentes sobre o manejo de crianças com fraturas, por osteoporose, concordam que os bifosfonato intravenosos, em vez de orais, devem ser usados como terapia de primeira linha (BIRNKRANT *et al*, 2018). As orientações e treino de transferências, para pacientes e familiares, previne as fraturas e é uma parte importante do tratamento (BIRNKRANT *et al*, 2018).

Em relação às cirurgias ortopédicas, o consenso atual é que a cirurgia no pé e no tendão de Aquiles, para melhor posicionamento em varo e para melhorar a amplitude de dorsiflexão, pode ser suficiente para a melhora da marcha, em pacientes com contratura clinicamente significativa do tornozelo, com bom quadríceps e força extensora do quadril. Intervenções relacionadas aos quadris e joelhos não são recomendadas. As fixações de coluna assim como o monitoramento da escoliose para pacientes não deambulantes devem ser consideradas. (BIRNKRANT *et al*, 2018.)

1.3.6.6 Tratamento Medicamentoso: Ataluren e Eteplirsen

O diagnóstico genético específico tornou-se especialmente importante para avaliar e selecionar as opções terapêuticas para cada paciente. Existem muitas terapêuticas em várias fases de pesquisa e com ensaios clínicos abertos. No entanto, há aprovação pelas agências reguladoras de apenas dois medicamentos: Exon Skip (Eteplirsen) e PTC124 (Ataluren). (AARTSMA-RUSS, 2016).

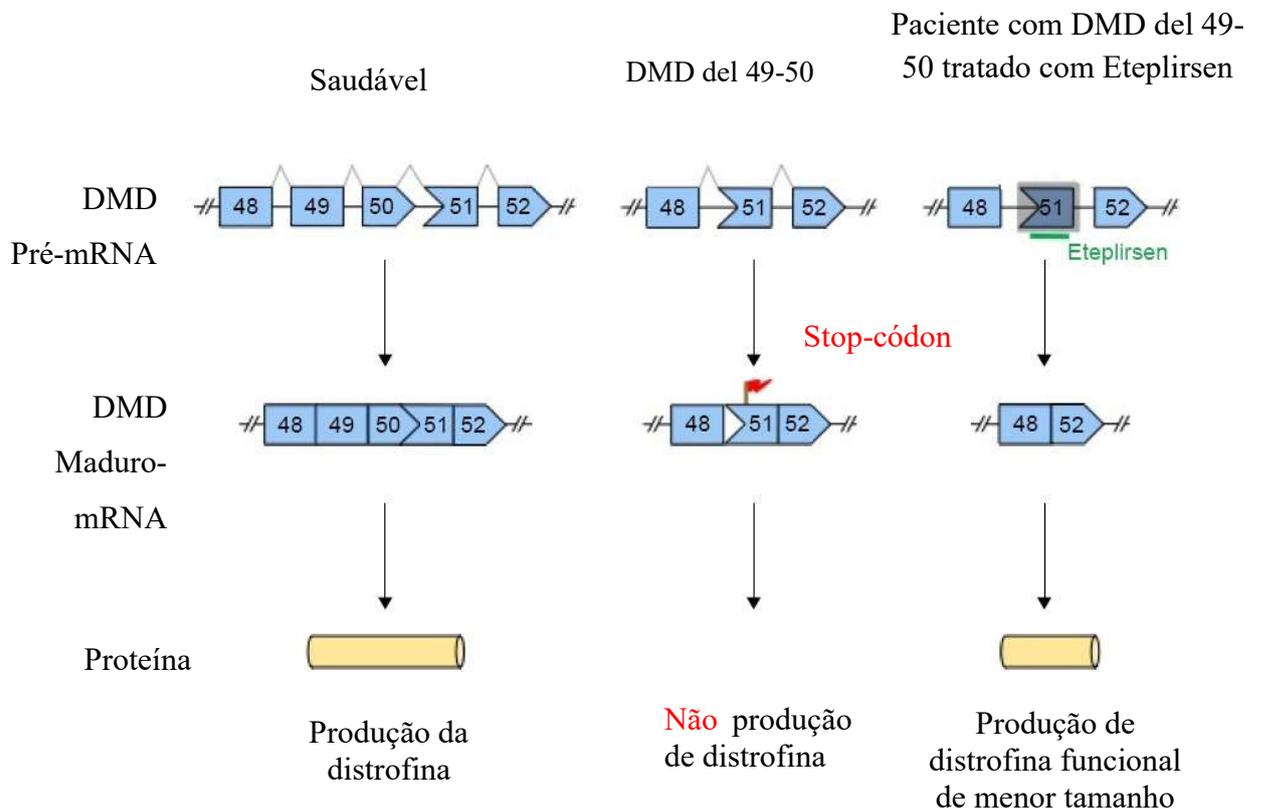
O Exon Skip baseia-se em vários fatores: um deles, que em cerca de dois terços dos casos de DMD são por grandes deleções, envolvendo um ou mais exons. Por causa da estrutura genômica do gene *DMD*, muitas vezes é possível restaurar o quadro de leitura do gene, eliminando apenas um exon, adjacente às bordas de exclusão na extremidade 5'ou 3', do mRNA maduro. Nesta abordagem, o enquadramento de leitura translacional de um gene é restaurado utilizando análogos sintéticos de ácido nucleico chamados oligonucleótidos anti-sentido (AO) para interferir com o processamento de ARNm pré-mensageiro (ARNm). Os AO são utilizados para ligar sequências complementares alvo no pré-mRNA, o que influencia a maquinaria de emenda para excluir um exon (ou exons) do transcrito final. Portanto, ao direcionar e inativar sinais que liguem os exons específicos no pré-mRNA, é possível obter uma transcrição do gene *DMD* que é semelhante aos transcritos selvagens. Esses transcritos podem então ser traduzidos em uma proteína de distrofina viável, embora removida internamente e quantitativamente reduzida, o que poderá ser a mudança do quadro clínico do paciente para o fenótipo mais leve.

O fármaco baseado na técnica Exon Skip é denominado Eteplirsen (Exondys 51®), o qual tem sido benéfico para pacientes com DMD com deleções terminando no exon 50 e

começando no exon 52. Este método está englobando os exons 53 e 45. Isso abrange cerca de 20,5% dos pacientes com DMD com mutações de deleção, ou 14% de todos os pacientes com DMD, demonstrado na figura 7 (LIMet *et al*, 2017).

A medicação é administrada intravenosa e foi aprovada temporariamente pelo *Food and Drugs Administration* (FDA), órgão regulador dos Estados Unidos da América, em setembro de 2016. A dose recomendada de Eteplirsen é de 30 mg/Kg, administrados uma vez por semana como uma infusão intravenosa de 35 a 60 minutos. A eficácia do Eteplirsen no estudo clínico fase 3 foi avaliada por quantidades de distrofina produzidas como resultado do tratamento e pelo efeito do tratamento na deambulação do paciente. Em uma publicação recente os dados da função pulmonar de pacientes com DMD que receberam Eteplirsen se comparam favoravelmente aos dados de história natural publicados na literatura científica. Usando esses dados comparativos, a deterioração da função muscular respiratória com o tratamento com Eteplirsen, medido pela CV% p, foi a metade da observada na história natural. MEP% p e MIP% p também diminuíram mais lentamente em pacientes tratados com Eteplirsen em comparação com a história natural. (LUCA BELLO & ELENA PEGORARO, 2016; LIMet *et al*, 2017; KINANE, T. BERNARD *et al*, 2018).

Figura 5. Esquema terapêutico com Eteplirsen.



Fonte: Adaptado do Drug Design, Development and Therapy 2018.

O Ataluren, anteriormente conhecido como PTC124, é uma molécula bioativa que modula a maquinaria de tradução permitindo a leitura do ribossomo de um códon de parada prematuro para produzir distrofina funcional de comprimento total, sem afetar os códons de parada normais. O estudo demonstrou aumento da produção de distrofina em biópsias musculares pós-tratamento de pacientes com DMD, tratados com Ataluren. Os resultados da Fase 2b demonstraram um efeito de tratamento de Ataluren em 6MWD (testes de função cronometrada da caminhada). Este estudo foi a base para a aprovação temporária de Ataluren na União Europeia em 2014. Os resultados da fase 3 demonstraram um efeito de tratamento de Ataluren em pacientes com DMD particularmente naqueles com 6MWD basal de 300-400m. Esta medicação está indicada para pacientes DMD que apresentam mutação *nonsense*, (cerca de 15% dos pacientes diagnosticados com DMD). É uma medicação oral, administrada três vezes ao dia, sendo bem tolerada pela maioria dos pacientes. Ainda não tem aprovação pelo FDA. Atrasar o declínio ambulatorial fornece o benefício clínico direto de proporcionar aos meninos com DMD um período mais longo de autossuficiência. É importante ressaltar que retardar a perda da capacidade de andar também pode ter efeitos benéficos que não podem ser medidos dentro de um período de 48 semanas. Por exemplo, a manutenção da capacidade de deambular tem sido associada à prevenção ou ao atraso do início e à redução da gravidade da escoliose e à necessidade de cirurgia de grande porte (NADEEM SIDDIQUIA & NAHUM SONENBERGA, 2016).

Os avanços dos tratamentos moleculares descritos acima ressaltam a importância da realização de um diagnóstico genético preciso em DMD. Atualmente, os pacientes com DMD com deleções nos exons 45, 51 ou 53 podem ser elegíveis para recrutamento em um dos ensaios clínicos em curso. Os pacientes elegíveis para o exon 51 podem ser tratados com Eteplirsén comercializado (Exondys 51®, Sarepta Therapeutics, Cambridge, MA, EUA). Os pacientes com mutações *nonsense*, podem ser elegíveis para tratamento com Ataluren, comercializado como Translarna® na União Europeia (PTC Therapeutics, South Plainfield, NJ, EUA). Embora o avanço desses tratamentos tenha sido minuciosamente lento na opinião de pacientes com DMD e suas famílias, que convivem com a progressão desta doença incapacitante, há razões para esperar que a experiência adquirida sirva para a concepção de melhores ensaios clínicos, bem como um número crescente de novas drogas provenientes da pesquisa pré-clínica (LUCA BELLO & ELENA PEGORARO, 2016).

2. JUSTIFICATIVA

Em 2013 foi criado o ambulatório de doenças neuromusculares, como parte do atendimento da Neurogenética, no HUBFS. Desde então capacitações, aperfeiçoamentos e composição da equipe estão acontecendo, para que os pacientes tenham um atendimento mais qualificado.

Conhecer as características clínicas e genéticas de uma população de pacientes com uma doença rara, como a DMD, é de fundamental importância para a compreensão de aspectos próprios da patologia, melhor manejo clínico, possibilitar a inclusão em ensaios clínicos e indicação de novas terapias específicas, além de contribuir com a literatura especializada.

Atualmente não há na literatura relatos de caracterização genética de pacientes com DMD, da região Norte do Brasil. Estima-se que as mutações genéticas não são uniformes no Brasil, portanto é necessário caracterizar o perfil mutacional da nossa população de DMD.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil clínico-molecular de pacientes com DMD atendidos no ambulatório de Neurogenética do HUBFS.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Descrever e classificar o perfil clínico dos pacientes com diagnóstico de DMD.

Descrever as mutações gênicas da população em estudo.

Investigar a associação do genótipo com o fenótipo clínico dos pacientes com DMD.

Estabelecer um algoritmo para a investigação diagnóstica de DMD.

4. HIPÓTESE/PERGUNTAS NORTEADORAS

O perfil mutacional genético, dos pacientes estudados, é semelhante ao encontrado na literatura especializada?

Qual a porcentagem de mutações de novo está presente na população estudada?

O tipo de mutação interfere na gravidade da doença?

Os aspectos clínicos encontrados nos pacientes com DMD, do presente estudo, diferem daqueles relatados na literatura?

5. METODOLOGIA

Esta pesquisa foi um estudo retrospectivo de casos envolvendo todos os pacientes com diagnósticos confirmados de DMD, atendidos no ambulatório de Neurogenética, vinculado a unidade de saúde da criança e adolescente do Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza (HUBFS - UFPA) no período de maio 2012 a abril de 2018, com faixa etária de 3 a 25 anos.

a. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Pacientes com DMD confirmados através de diagnóstico molecular.

b. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Pacientes com DMD que não apresentaram diagnóstico molecular. Outros tipos de distrofias e outras doenças neuromusculares (DNM)

c. COLETA DOS DADOS

A coleta de dados para este estudo foi realizada através de levantamento dos prontuários clínicos (SAME/HUBFS/ICS/UFPA) de pacientes com o perfil de DMD. Foi elaborado um formulário contendo informações sobre: idade de início da doença, idade do diagnóstico, idade da perda da marcha, definição da fase clínica atual da doença, presença de complicações cardíacas, ortopédicas e respiratórias, tipo de mutação, dosagem da enzima muscular creatinoquinase (CK) e padrões de tratamento.

d. AVALIAÇÃO ÉTICA DA PESQUISA

Esta pesquisa não há conflitos de interesse do pesquisador principal.

Os riscos da pesquisa são os riscos morais e psicológicos, pois envolve a identificação de dados genéticos das famílias. Para garantir o sigilo da informação não haverá nenhuma identificação dos nomes das famílias e pacientes envolvidos.

Os benefícios propostos pela pesquisa são para contribuir no conhecimento sobre os pacientes com DMD, sugerir melhoras no manejo clínico dos pacientes e estimular o

aconselhamento genético e processos educacionais das famílias envolvidas, dentro dos princípios da bioética de beneficência e não maleficência.

Todas as famílias envolvidas assinaram o termo de livre consentimento e os pacientes o termo de assentimento, quando menores de idades.

Este projeto foi elaborado com bases na resolução 466/2012 e foi aprovado pelo CEP do ICS da UFPA (anexo 01).

e. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O processo de avaliação dos resultados foi analisado confrontando com a literatura. Os dados quantitativos foram inseridos na planilha eletrônica do programa Microsoft Excel 2007 e representado através de tabelas e gráficos. A análise estatística utilizada para avaliação das características da mutação em relação aos aspectos clínicos dos pacientes, foram aplicados os testes do Qui-Quadrado, Teste Exato de Fisher, Teste G, Teste t-student e Teste de Mann-Whitney, de acordo com os critérios específicos de cada um. Em todo trabalho foi utilizado o nível de significância de 5% através do pacote estatístico BioEstat 5.0 (AYRES *et al*, 2007)

6. RESULTADOS

6.1 CARACTERISTICA EPIDEMIOLOGICA E CLINICA DOS PACIENTES

Neste estudo foram incluídos inicialmente 27 pacientes, do sexo masculino, todos com fenótipo clínico de distrofia muscular de Duchenne (DMD), porém dois pacientes foram excluídos devido à ausência dos resultados de exames moleculares. 25 foi o total de pacientes estudados, todos com fenótipo clínico de DMD e confirmados com exames moleculares. Os 25 pacientes fazem parte de 20 famílias, 52% (13) apresentam recorrência familiar e 48% (12) são casos únicos na família. A média de idade, na admissão do paciente no serviço especializado, foi de 9,9 anos. Em 56% dos pacientes a primeira manifestação clínica ocorreu até três anos de idade. Em 68% (17) dos pacientes a alteração da marcha já estava instalada até o quarto ano de vida. Apenas 32% (8) apresentaram alteração da marcha depois dos 4 anos de idade e 77.7% foram para a cadeira de roda até os 10 anos de vida. Estes achados estão resumidos na tabela 06..

Tabela 1. Características clínica e epidemiológica dos pacientes com DMD. Idade em anos.

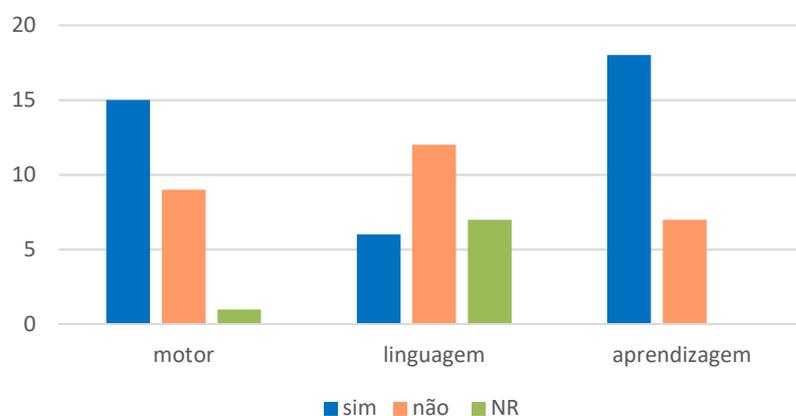
| | Freq. | % |
|---|-------|------|
| Idade na admissão | | |
| Média e DP | 9.9 | 3.8 |
| Histórico Familiar | | |
| Sim | 13 | 52.0 |
| Não | 12 | 48.0 |
| Idade 1^{as} Manifestações | | |
| 1 a 2 anos | 9 | 36.0 |
| 2 a 3 anos | 5 | 20.0 |
| 3 a 4 anos | 3 | 12.0 |
| 4 a 5 anos | 3 | 12.0 |
| 5 a 6 anos | 4 | 16.0 |
| 6 a 7 anos | 1 | 4.0 |
| Alteração de marcha | | |
| 1 a 4 | 18 | 72.0 |
| > 4 | 7 | 28.0 |

| ADNPM | | | |
|-------|------------------|----|------|
| | Motor | 15 | 60.0 |
| | Linguagem | 6 | 24.0 |
| | Não | 9 | 36.0 |
| | NR | 1 | 4.0 |

Fonte: Dados da Pesquisa.

De acordo com os prontuários clínicos dos pacientes, o desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM) foi alterado em 60%. Foram observadas alterações na área motora em 15 pacientes (60%) e 9 com alteração na linguagem (24%). Em 20% (5) dos pacientes foi referida alteração tanto no desenvolvimento motor como na linguagem. 36% (9) não apresentaram atraso do DNPM e 4% (1) não havia referência. 72% (18) tem queixa referida de dificuldades na aprendizagem e 7 pacientes (28%) não apresentaram dificuldades escolares, conforme demonstrado no gráfico 01 abaixo.

Gráfico 1. Atraso de Desenvolvimento Neuropsicomotor. NR não referido.

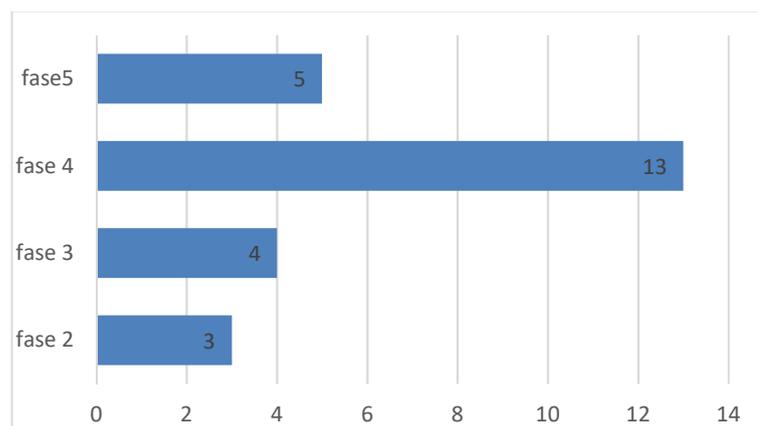


Fonte: Dados da Pesquisa.

A DMD pode ser classificada clinicamente como Fase 1 (pré-sintomática), Fase 2 e 3 deambulantes e fase 4 e 5 não deambulante. As fases 2, 3, 4 e 5 são ainda subdivididas em precoce e tardio. Neste estudo, de acordo com a evolução clínica da DMD e até a coleta dos dados dos pacientes, a classificação apresentou a seguinte distribuição: 52% (13) na fase 4, não deambulante precoce, 20% (5) estão nas fases 5, não deambulante tardio; 16% (4) na fase 3, deambulante tardio e 12% (3) na fase 2 deambulante precoce. Nenhum paciente foi

identificado em fase 1, pré-sintomática (gráfico 2). 72% dos pacientes fazem uso de cadeira de roda.

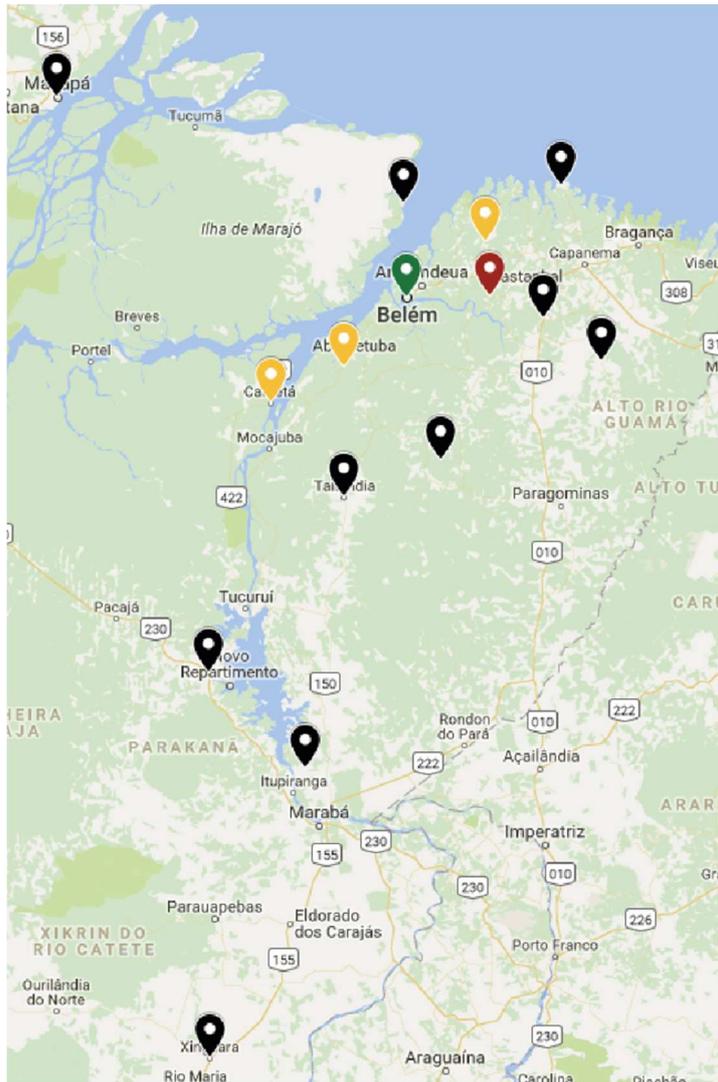
Gráfico 2. Fase clínica da DMD



Fonte: Dados da Pesquisa.

Nesta amostra os pacientes estão distribuídos geograficamente da seguinte forma: 6 pacientes (24%) são procedentes da capital, região Metropolitana de Belém, 1 paciente (4%) é de outro estado da região Norte do Brasil (Amapá/Macapá), e 72% (18) estão distribuídos por treze municípios do estado do Pará conforme representado na figura 06.

Figura 6. Localização geográfica dos pacientes.



06 famílias, com 01 paciente em cada, no Município de Belém.

01 família com 03 pacientes no Município de Inhangapi.

03 famílias, com 02 pacientes cada, nos Municípios de Terra Alta, Igarapé-Miri e Cametá.

09 famílias, cada uma com 01 paciente, nos demais Municípios do estado do Pará e 01 família no estado do Amapá.



Fonte: Dados da Pesquisa.

As famílias dos pacientes residentes na região metropolitana de Belém não são relacionadas. Enquanto que nove dos dezoito pacientes que residem nos outros municípios do Estado do Pará: Inhangapi, Igarapé-Miri, Cametá e Terra Alta estão distribuídos em quatro famílias distintas, com a seguinte composição: dois tios e um sobrinho, dois primos, dois primos e dois irmãos, respectivamente.

6.2 IDADE DE CHEGADA AO SERVIÇO ESPECIALIZADO E FATORES EPIDEMIOLOGICOS

Considerando a expressiva extensão territorial da Região Norte do Brasil, foi comparada a idade de chegada dos pacientes no serviço especializado com a sua localização e a recorrência de DMD na família. A tabela 7 demonstra que houve associação entre a recorrência familiar e a idade de chegada apenas naqueles pacientes procedentes do interior do estado ($p=0,0052$).

Tabela 2. Idade de admissão no serviço especializado, localização geográfica e histórico familiar.

| | Capital | % | Interior | % | Valor de p |
|-----------------------------|------------|-------|------------|------|---------------------|
| Histórico Familiar | | | | | |
| Sim | 0 | 0.0 | 13 | 68.4 | 0.0052 ^a |
| Não | 6 | 100.0 | 6 | 31.6 | |
| Idade de Admissão | | | | | |
| Mediana e Desvio quartílico | 11.5 ± 6.0 | | 10.0 ± 6.5 | | 0.1433 ^b |

^aTeste Exato de Fisher. ^b Teste de Mann-Whitney.

Fonte:Dados da Pesquisa.

6.3 MANEJO TERAPEUTICO E TRATAMENTO ESPECIFICO

Os pacientes receberam corticoterapia em 96% (24) dos casos. Apenas 1 paciente não estava em uso de corticoide, três pacientes receberam tratamento específico com Ataluren. 80% (20/25) passaram por avaliação cardíaca e 48% (12/25) estavam em uso de medicação cardioprotetora. Nenhum paciente estava em uso de ventilação assistida. A avaliação respiratória não foi referida com regularidade na maioria dos pacientes. A avaliação ortopédica não foi referida, porém 44% (11/25) apresentavam escoliose, 36% (9/25) não apresentavam e 20%(5/25) não havia relato.

6.4 RESULTADO BIOQUÍMICO E BIOPSIA MUSCULAR

Foi possível observar uma diminuição da média dos valores de creatinoquinase (CK) com o aumento da idade. Foram selecionados dois grandes grupos na faixa etária de 3 a 10 anos e acima de 10 anos com limite máximo de 15 anos. Não haviam relatos de valores de CK para 04 pacientes (Tabela 8).

Tabela 3. Média dos valores de CK (U/L), frequência e idade. NR- Não referido.

| | Freq. | Mediana NK | Desvio Quartílico | Valor de p |
|----------------|-------|------------|-------------------|------------|
| 3 a 10 | 17 | 3982 | 2051.5 | 0.0600 |
| > 10 | 4 | 6900 | 3532 | |
| NR | 4 | - | - | |
| Total | 25 | | | |

Fonte:Dados da Pesquisa.

A biopsia muscular foi um recurso diagnóstico utilizado em 16% (4) dos pacientes, dos quais três destes realizaram antes do ano de 2013. Apenas um paciente utilizou este recurso no ano de 2014. Após 2014 não houve mais realização da biopsia como recurso diagnóstico.

6.5 RESULTADOS MOLECULARES (INDIVIDUAIS E FAMILIAS)

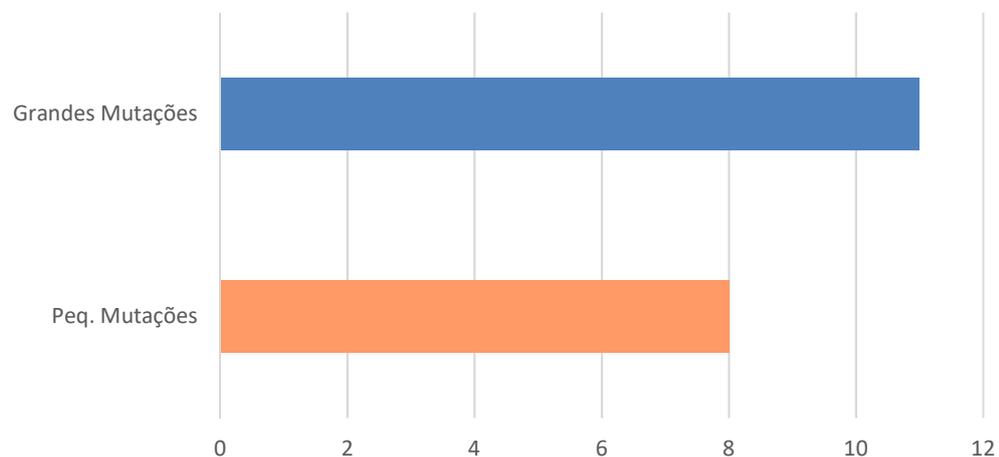
As análises moleculares foram realizadas através de três laboratórios do Brasil, sendo um do setor público e dois do setor privado. Em todos os laboratórios as técnicas utilizadas foram semelhantes. O DNA genômico foi extraído a partir de sangue periférico ou saliva e foi submetido à análise combinada de técnicas de MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*), PCR multiplex e sequenciamento de nova geração (NGS).

Foram encontradas 19 mutações distintas: 57,8% (11/19) grandes mutações: deleções e 42% (8/19) pequenas mutações como demonstrado na tabela 9 e gráfico 3.

Tabela 4. Tipos de mutações e suas frequências

| Tipo de mutações | Freq. | % |
|---------------------------|-------|-------|
| GRANDES MUTAÇÕES | 11 | 57.8 |
| Deleções | 11 | 100.0 |
| PEQUENAS MUTAÇÕES | 08 | 42.0 |
| Nonsense | 5 | 62.5 |
| Pequena deleção | 1 | |
| Pequena duplicação | 1 | |
| Splice site | 1 | |
| Total | 19 | 100.0 |

Fonte:Dados da Pesquisa.

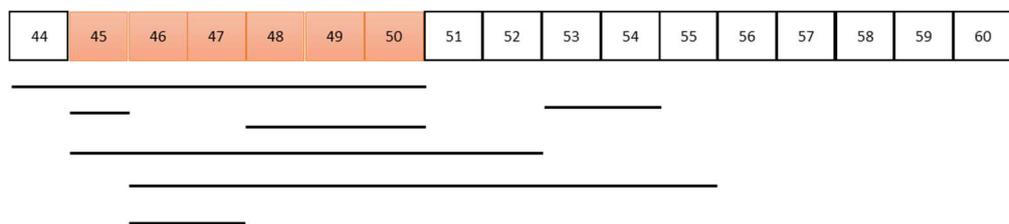
Gráfico 3. Tipo de mutação

Fonte:Dados da Pesquisa.

Das 11 grandes mutações (deleção) apenas uma comprometeu um único exon, o 45. As 10 deleções restantes foram de mais de um exon. Dois dos pacientes tiveram deleção total dos 79 exons do gene *DMD*. Todas as deleções foram classificadas como *frameshift*, com fenótipo clínico concordante para DMD. Não foi encontrada nenhuma duplicação (Tabela 10). A região de maior comprometimento foi a região distal: 63% (7/11) envolveram os exons

localizados a partir do 44, sendo a zona mais afetada a do 45 ao 50, onde 6 (85%) das mutações distais estão localizadas (figura 7). Com relação as mutações proximais (1 ao 44 exons), apenas 3 (27%) foram classificadas como grandes mutações. A deleção total de 79 exons e a região promotora do gene *DMD* não pode ser classificada nem como proximal, nem como distal.

Figura 7. Esquema da localização das 7 mutações distais no gene DMD encontradas no presente estudo.



Fonte: Dados da Pesquisa.

Tabela 5. Grandes mutações

| MUTAÇÃO | EXON | No. | FENOTIPO |
|------------------------------|------------------|-----|----------|
| del. 1 a 44 | Exon 1 - 44 + RP | 1 | DMD |
| chX31135345-33359726 | Exon 1 - 79 + RP | 2 | DMD |
| c.94-? _2803+? | Exon 3 -21 | 1 | DMD |
| ChrX32380905-32536.248 | Exon 18 - 37 | 1 | DMD |
| c.6439-? _6614+? | Exon 45 | 1 | DMD |
| ChrX31.838.092-31986631 | Exon 45 - 50 | 1 | DMD |
| c.6439-? _7660+? del. | Exon 45 - 52 | 1 | DMD |
| chrX:31.947.713-31.950.344 | Exon 46 - 47 | 1 | DMD |
| chrX:31.645.790 - 31.950.344 | Exon 46 - 55 | 1 | DMD |
| del. 48-50 | Exon 48 - 50 | 1 | DMD |
| chrX31676107-31697703 | Exon 53 - 54 | 1 | DMD |

Fonte: Dados da Pesquisa.

As pequenas mutações, também denominadas de mutação de ponto, totalizaram 42% (8/19) da amostra total: 5 mutações *nonsense* (62,5%); 1 pequena deleção (12,5%); 1 pequena duplicação (12,5%) e 1 splice site (12,5%). Neste tipo de mutação a troca de uma citosina por timina foi a mais frequente, ocorreu em 87,5% (7/8) dos casos (tabela 11). Foram encontradas três pequenas mutações não descritas anteriormente sendo duas mutações intrônicas (19i e 50i) e uma mutação no exon 3 (pequena duplicação), exemplificado na tabela 12.

Tabela 6. Pequenas mutações e suas trocas de base.

| Bases | Freq. | % |
|--------------|-----------|--------------|
| C>T | 7 | 53.8 |
| G>A | 2 | 15.3 |
| G>T | 1 | 7.6 |
| c.131dup | 1 | 7.6 |
| Intrônica | 2 | 15.3 |
| Total | 13 | 100.0 |

Fonte:Dados da Pesquisa.

Tabela 7. Pequenas mutações. Em negrito as mutações novas.

| Posição | Tipo da mutação | Troca de Nucleotídeo | Troca de Aminoácido | No.de casos |
|------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------|
| Exon 3 | Pequena duplicação | c.131dup | p. Gln45Thrfs*44 | 1 |
| Exon 6 | Nonsense | c.488G>A | p. Trp163* | 2 |
| Intron 19 | Pequena deleção | c.2380+3_2380+5del | ? | 2 |
| Exon 34 | Nonsense | c.4729C>T | p. Arg1577* | 4 |
| Exon 39 | Nonsense | c.5551C>T | p. Gln1851* | 1 |
| Exon 65 | Nonsense | c.9403C>T | p. Gln3135* | 1 |
| Exon 66 | Nonsense | c.9568C> T | p. Arg3190* | 1 |
| Intron 50 | Splice site | c.7309+1G>T | p.? | 1 |
| Total | | | | 13 |

Fonte:Dados da Pesquisa.

6.6 O TIPO DE MUTAÇÃO E A EVOLUÇÃO CLÍNICA

Com o objetivo de avaliar se o tipo da mutação interfere na evolução clínica, com base em mutações que comprometam as regiões promotoras das isoformas da distrofina, principalmente a isoforma 140 que é produzida no Intron 44 que apresenta envolvimento cerebral, os pacientes foram divididos em dois grupos, a saber: mutações proximais (exon 1 ao 44) e distal (exon 44 a 79). Dois pacientes não puderam ser classificados devido a mutação de todo o gene *DMD*. O marcos clínicos analisado foram idade da primeira manifestação, atraso do DNPM, idade da perda da marcha e dificuldades na escola.

Quanto ao início dos sintomas, idade de perda da marcha, atraso no DNPM e dificuldade na escola não houve diferença estatística entre os pacientes com mutações distais e proximais ($p > 0,05$). Estes dados são demonstrados nas tabelas 13, 14, 15 e 16.

Tabela 8. Idade da instalação do distúrbio da marcha. Idade em anos. Mutação proximal (1-44) e distal (>44). NR não referido.

| | < 4 a | % | > 4 a | % | Valor de p |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|------------|
| Proximal | 9 | 52.9 | 4 | 50.0 | 0.685 |
| Distal | 6 | 35.3 | 4 | 50.0 | |
| NR | 2 | 11.8 | 0 | 0.0 | |
| Total | 17 | 100.0 | 8 | 100.0 | |

Fonte: Dados da Pesquisa.

Tabela 9. Atraso do desenvolvimento motor

| | SIM | % | NÃO | % | Valor de p |
|-----------------|------------|----------|------------|----------|-------------------|
| Proximal | 7 | 46.7 | 6 | 66.7 | 0.674 |
| Distal | 6 | 40.0 | 3 | 33.3 | |
| NR | 2 | 13.3 | 0 | 0.0 | |
| Total | 15 | 100.0 | 9 | 100.0 | |

Mutação proximal (1-44) e distal (>44). NR não referido.

Fonte: Dados da Pesquisa.

Tabela 10. Idade de perda da Marcha.

| | < =10 a | % | > 10 a | % | Valor de p |
|-----------------|-------------------|----------|------------------|----------|-------------------|
| Proximal | 7 | 50.0 | 2 | 50.0 | 1.000 |
| Distal | 5 | 35.7 | 2 | 50.0 | |
| NR | 2 | 14.3 | 0 | 0.0 | |
| Total | 14 | 100.0 | 4 | 100.0 | |

a. Idade em anos. Mutação proximal (1-44) e distal (>44). NR não referido.

Fonte: Dados da Pesquisa.

Tabela 11. Dificuldades escolares

| | SIM | % | NÃO | % | Valor de p |
|-----------------|------------|----------|------------|----------|-------------------|
| Proximal | 7 | 38.9 | 6 | 85.7 | 0.089 |
| Distal | 9 | 50.0 | 1 | 14.3 | |
| NR | 2 | 11.1 | 0 | 0.0 | |
| Total | 18 | 100.0 | 7 | 100.0 | |

NR não referido. Mutação proximal (1-44) e distal (>44).

Fonte: Dados da Pesquisa.

Quando foram agrupados em mutações proximais e distais, que envolva mutação do Exon 1 a 30 e a partir do Exon 30 respectivamente, e comparados com os parâmetros clínicos, também não foram encontradas diferenças significantes (Tabela 17).

Tabela 12. Avaliação de evolução clínica nos grupos proximal (1-30) e distal (>30). NR não referido. a Mann-Whitney. b Teste Exato de Fisher

| | Proximal (1-30) | % | Distal (>30) | % | Valor de p |
|----------------------------------|-----------------|------|--------------|------|---------------------|
| Idade na Admissão | | | | | |
| Mediana e Desvio quartílico | 10.0 ± 6.5 | | 9.5 ± 5.7 | | 0.6207 ^a |
| Idade alteração da marcha | | | | | |
| 1 a 4 anos | 5 | 83.3 | 13 | 68.4 | 0.6372 ^b |
| > 4 anos | 1 | 16.7 | 6 | 31.6 | |
| Cadeirante | | | | | |
| Sim | 4 | 66.7 | 14 | 73.7 | 0.9978 ^b |
| Não | 2 | 33.3 | 5 | 26.3 | |
| Idade de PERDA DA MARCHA | | | | | |
| Mediana e Desvio quartílico | 9.0 ± 2.5 | | 10.0 ± 2.0 | | 0.8477 ^a |
| Dif. Na escola | | | | | |
| Sim | 5 | 83.3 | 17 | 89.5 | 0.9913 ^b |
| Não | 1 | 16.7 | 2 | 10.5 | |
| Linguagem | | | | | |
| Sim | 1 | 16.7 | 5 | 26.3 | 0.6148 ^b |
| Não | 4 | 66.7 | 8 | 42.1 | |
| NR | 1 | 16.7 | 6 | 31.6 | |
| Motor | | | | | |
| Sim | 2 | 33.3 | 13 | 68.4 | 0.1501 ^b |
| Não | 4 | 66.7 | 5 | 26.3 | |
| NR | 0 | 0.0 | 1 | 5.3 | |

Fonte: Dados da Pesquisa.

Uma nova divisão dos grupos foi realizada, com pequenas e grandes mutações. As variáveis clínicas foram idade da primeira manifestação, perda da marcha, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM), e dificuldades na escola.

A idade da primeira manifestação até os 4 anos foi de 76,9% e 66,7% para as pequenas e grandes mutações respectivamente. A média de idade da perda da marcha foi de 10 e 9.5 ± 2 para pequenas mutações e grandes mutações respectivamente. O atraso de DNPM, marco

motor, ocorreu em 61,1% para as pequenas e 58,3% para as grandes mutações. A dificuldade na escola ocorre em 53,8% para as pequenas mutações e 91,7% para as grandes mutações ($p=0,073$), são demonstrados na tabela 18.

Tabela 13. Comparação da evolução clínica da DMD em pacientes com pequenas e grandes mutações.a Teste t student. b Teste Exato de Fisher. c Teste de Mann-Whitney

| | Pequena Mutação | % | Grande Mutação | % | Valor de p |
|----------------------------------|-----------------|------|----------------|------|---------------------|
| Idade na Admissão | | | | | |
| Média e desvio-padrão | 10.7 ± 3.8 | | 9.0 ± 3.8 | | 0.2792 ^a |
| Idade alteração da marcha | | | | | |
| 1 a 4 anos | 10 | 76.9 | 8 | 66.7 | 0.6728 ^b |
| > 4 anos | 3 | 23.1 | 4 | 33.3 | |
| Cadeirante | | | | | |
| Sim | 10 | 76.9 | 8 | 66.7 | 0.6728 ^b |
| Não | 3 | 23.1 | 4 | 33.3 | |
| Idade cadeirante | | | | | |
| Mediana e Desvio Quartílico | 10.0 ± 2.2 | | 9.5 ± 2.03.8 | | 0.6914 ^c |
| Dif. na escola | | | | | |
| Sim | 7 | 53.8 | 11 | 91.7 | 0.073 ^b |
| Não | 6 | 46.2 | 1 | 8.3 | |
| Linguagem | | | | | |
| Sim | 3 | 23.1 | 3 | 25.0 | 1.000 ^b |
| Não | 6 | 46.2 | 6 | 50.0 | |
| NR | 4 | 30.8 | 3 | 25.0 | |
| Motor | | | | | |
| Sim | 8 | 61.5 | 7 | 58.3 | 1.000 ^b |
| Não | 4 | 30.8 | 5 | 41.7 | |
| NR | 1 | 7.7 | 0 | 0.0 | |

Fonte: Dados da Pesquisa.

Para avaliar o efeito do genótipo na gravidade da DMD foram analisadas quatro grupos de mutações distintas (3 proximais e uma não classificada) em 5 famílias: 4 com mais de um caso e 1 família com apenas um caso relatado. No primeiro grupo foi analisado a

mutação no exon 34 (pequena mutação nonsense) que ocorreu em 4 pacientes: 3 de uma mesma família e 1 caso em uma família. Foram utilizados os mesmos parâmetros clínicos para avaliar a evolução clínica ou gravidade. A idade da primeira manifestação ocorreu em 75% até o os 4 anos, 100% (4) tiveram atraso motor, a média de idade de perda da marcha foi de 10 anos. Porém o paciente com menor idade teve a perda de marcha mais precoce, aos 8 anos; 75% (3) referiram dificuldades na aprendizagem e apenas um paciente não referiu dificuldades (Tabela 19).

Tabela 14. Evolução clínica da mesma mutação em famílias relacionadas e não relacionadas. Mutação Nonsense.

| MARCOS CLÍNICOS | Paciente 1* | Paciente 2** | Paciente 3** | Paciente 4** |
|---|-------------|--------------|--------------|--------------|
| 1ª. Manifestação até 4 Anos | SIM | SIM | SIM | NÃO |
| Atraso Motor | SIM | SIM | SIM | SIM |
| Idade Perda da Marcha > 10 Anos | SIM | NÃO | NÃO | NÃO |
| Dificuldades na Aprendizagem | NÃO | SIM | SIM | SIM |

Fonte: Dados da Pesquisa.

*paciente de família não relacionada. **mesma família.

No segundo grupo formado por dois irmãos com mutação *nonsense*, no *Exon 6*, a manifestação clínica ocorreu até o quarto ano de vida. Ambos apresentaram atraso motor, a idade de perda da marcha foi semelhante, com média de 10,5 anos e um apresentou dificuldades na aprendizagem e outro não. Um dos pacientes foi a óbito aos 18 anos com complicações respiratórias.

O terceiro grupo foi representado por dois primos com pequena mutação proximal no intron 19 do gene *DMD*. O distúrbio da marcha foi referido até os 4 anos de idade. Nenhum apresentou atraso motor, nem dificuldades na escola. A idade da perda da marcha foi precoce em um, aos 7 anos e o outro está deambulando, fase 2, aos 6 anos de idade. Um dos pacientes foi a óbito aos 12 anos com complicações respiratórias.

O quarto grupo formado por dois primos, com deleção total do gene *DMD* (1-79 exon), apresentou distúrbio da marcha precocemente até os dois anos de idade. Ambos

apresentaram atraso motor e dificuldades escolares. A idade de perda da marcha ocorreu em um aos 8 anos e em outro aos 10 anos.

7. DISCUSSÃO

7.1 ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLOGICOS

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é um distúrbio neuromuscular recessivo ligado ao X, devido a mutação do gene *DMD*, gerando homens afetados e mulheres portadoras. Os meninos apresentam fraqueza muscular progressiva, levando a perda da marcha até a adolescência.

Os aspectos clínicos e epidemiológicos observados no presente estudo foram: a idade de chegada ao serviço especializado, idade da primeira manifestação clínica, ADNPM, idade da perda da marcha e dificuldades na escola, correlacionando estes com a localização geográfica, histórico familiar conhecido e tipo da mutação.

Foi realizado a análise clínica e molecular de 25 pacientes com DMD, a partir de coleta de dados de prontuários, dos pacientes assistidos no ambulatório de Neurogenética do Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza nos últimos 6 anos. A DMD apresenta incidência em torno de 1:3.500 a 1:5000 nascidos do sexo masculino. No estado do Pará nascem 140.000 crianças por ano, em torno de 70.000 meninos. É esperado 14 casos de DMD/ano neste estado. Nossa amostra compreendeu 32% dos casos esperados. Esta baixa amostragem pode ser justificada pela falta de um serviço de referência no estado e consequentemente o não encaminhamento ao serviço especializado pelos profissionais de saúde da rede básica. Muitos pacientes podem ter o diagnóstico, mas não serem referenciados, devido ao baixo conhecimento dos profissionais, sobre novas possibilidades terapêuticas e manejos adequados para a DMD. Outra hipótese é de que a região Norte não apresente a mesma incidência de DMD que a descrita na literatura. Esta hipótese pode ser comprovada com um estudo epidemiológico e a criação de um banco de dados da região, além da capacitação dos profissionais da rede básica, incluindo os agentes comunitários de saúde (ACS), para aumentar a acurácia diagnóstica e referenciamento ao serviço especializado.

A idade de chegada ao serviço especializado ocorreu em média aos 9.9 anos. Uma vez que aos quatro anos de idade 72% dos pacientes já estavam com o quadro de alteração da marcha instalados, houve um atraso de cinco anos. Uma idade tardia comparada com outros estudos como o de HUFTON *et al* 2017. No Brasil estudos epidemiológicos são raros, mas um estudo no Rio de Janeiro, mostrou que a idade média dos primeiros sintomas foi de 2 anos e 11 meses de idade e a média do diagnóstico definitivo de 6 anos e 10 meses, mostrou ainda

que casos com recorrência familiar chegam mais cedo no serviço especializado (MOREIRA *et al*, 2009).

Com a hipótese de que a distância do serviço especializado seria um fator determinante no retardo do diagnóstico ou de dificuldade no acesso ao serviço especializado em nossa região, foi analisado a localização geográfica do paciente e recorrência familiar. Foi demonstrado que houve associação entre a recorrência familiar e a idade de chegada ao serviço especializado, apenas naqueles pacientes procedentes do interior do estado ($p=0,0052$), ou seja, o fator determinante para o diagnóstico mais cedo foi a recorrência familiar, concordando com o estudo de Moreira *et al*(2009). Em países desenvolvidos como o Reino Unido, mesmo com populações em condições socioeconômicas diferentes, a média de idade do acesso ao diagnóstico é de 3,5 a 4 anos. (HUFTON *et al*, 2017). Na Itália um estudo mostrou que o diagnóstico ocorre em média aos 5 anos. (RYDER *et al*, 2017).

O atraso do DNPM foi observado em 60% dos pacientes, este dado pode ser um sinal de alerta para a identificação precoce de pacientes, mesmo sem histórico familiar conhecido. As alterações de linguagem também foram encontradas em 24% dados concordantes com a literatura. Krajewska (1997) realizou um estudo na Polônia, em 129 crianças com DMD e foi demonstrado que o desenvolvimento motor foi atrasado em 58% dos casos. Pascual *et al*.(1982) revisou 37 pacientes com DMD na Espanha e comprovou que o atraso do DNPM é muitas vezes o primeiro sinal da doença, em sua amostra 86% dos pacientes andaram após os 14 meses. Em um estudo brasileiro na região Nordeste do Brasil 35.6% dos pacientes apresentaram atraso motor. (ROCHA, 2011). Esses dados reforçam a importância da vigilância do desenvolvimento infantil e a necessidade de capacitação periódica dos pediatras e médicos generalistas.

A maioria dos pacientes analisados estão classificados como não deambulantes, 72%, com idade média de 9.5 anos, dados divergentes da literatura como em um estudo global onde a mediana de perda de marcha é de 10 anos para o grupo sem corticoide KOEKS *et al* 2017. Alguns fatores podem estar relacionados com este resultado: a mediana de idade dos pacientes, que é de 10.0 a 11.5 ± 6.5 , outro fator que pode estar influenciando este resultado é o acesso tardio ao serviço especializado, e conseqüentemente o atraso no início dos manejos terapêuticos adequados, como o uso de glicocorticoide. Apesar do uso de corticoide ser uma prática realizada em 96% dos pacientes. Este manejo terapêutico não demonstra um impacto na mudança do curso de perda da marcha na população estudada. Na literatura mundial é

comprovado que a perda de deambulação em pacientes tratados com corticosteroides foi de 13 anos (KOEKSet *al*,2017)

A DMD apresenta uma alta taxa de incapacidade cognitiva e de aprendizado, bem como distúrbios neurocomportamentais, alguns dos quais foram associados a ruptura das isoformas da distrofina (BANIHANI *et al*, 2015). Em nossa casuística não foi realizada avaliação formal de coeficiente de inteligência (QI), nem avaliação neurocomportamental, porém era referido no prontuário, se as dificuldades escolares estavam presentes ou ausentes, a partir da observação clínica e informação dos familiares. Em 72% (18) pacientes havia queixa de dificuldades na aprendizagem, bem acima das encontradas na literatura. Estudos referem em torno de 30%. Banihaniet *al* 2015 encontrou 44% e 26% por Ricottiet *al* 2016. Em um estudo brasileiro Rocha em 2011 encontrou 54.2%. Este fato pode ser justificado, em nossa amostra, pela não realização de testes neuropsicológicos para a identificação exata de deficiência de QI e outros transtornos neurocomportamentais, que possam influenciar na aprendizagem, como o déficit de atenção.

7.2 ASPECTOS MUTACIONAIS

A realização do diagnóstico molecular ocorreu em 100% dos pacientes estudados. Foram encontradas 19 mutações distintas: 57.8% (11/19) grandes mutações, todas deleções, e 42% (8/19) pequenas mutações, entre as pequenas mutações, as mutações *nonsense* foram a de maior frequência (26.3%), dados que comparados com a literatura mundial são divergentes. Bladen *et al* 2015 no maior banco de dados mundial TREAT-NMD encontrou 79% de grandes mutações e 11% pequenas mutações, desse total 10% foram as mutações *nonsense*. Vieitez *et al* 2017 em um estudo espanhol encontrou 46.1% de grandes mutações e 34.2% de pequenas mutações, 17.3% foram as *nonsense*. Em um estudo brasileiro em 2017, já foi sugerido a possibilidade da região Nordeste do Brasil apresentar uma maior incidência de mutações *nonsense*. Foi encontrado 27.7%, dado que é concordante com nossa amostra, sugerindo fortemente, que há possibilidades de um perfil mutacional diferente, para as mutações *nonsense*, na região Norte e Nordeste do Brasil, em relação ao restante do país. Este aspecto mutacional diferente pode estar associado ao fluxo migratório (ALMEIDA *et al* 2017).

As mutações novas compreendem um percentual muito elevado 57.8% (11/19) quando comparados a outros estudos e, deste total 27,2% (3/11) são pequenas mutações. Vieitez *et al*

2017, por exemplo, encontraram somente 10% de mutações novas. Essa porcentagem elevada em nossa casuística, provavelmente se deve pelo número amostral pequeno.

Em relação a localização das mutações no gene *DMD*, a porção distal abrigou o maior número de mutações. A maioria destas mutações ocorreu na região compreendida entre os exons 45 e 50, sendo considerado pela literatura um *Hotspot* para a ocorrência de mutações. Em relação ao número de exons envolvidos apenas um paciente apresentou a deleção de um único exon, o 45. Neste paciente observa-se que a idade da primeira manifestação foi precoce, até os dois anos de idade e não apresentou atraso motor, nem de linguagem. O paciente tem 12 anos, está deambulando, sugerindo um fenótipo menos grave. Dados concordante com a literatura. Pacientes com uma única deleção, do exon 45, mostraram um aumento da sobrevida em contraste com outras deleções de exons únicos (KOEKS, 2017).

Neste estudo foi verificada localização da mutação (proximal e distal) e o tamanho (grande ou pequena) se podem ou não estar relacionada com a gravidade da DMD. Foram avaliados quatro critérios, a idade de perda da marcha, idade da primeira manifestação clínica, presença de ADNPM e dificuldades escolares. A idade de perda da marcha até os 10 anos foi de 50% para o grupo proximal e 35% para distal, já a perda de marcha após os 10 anos de idade foi semelhante para os dois grupos 50% em cada, mantendo a média de idade de 9 anos para as proximais e 10 anos para distais. Não foram encontrados valores estatisticamente significativos. O tamanho reduzido da amostra pode ter interferido nesta análise. A literatura relaciona a mutação distal, com o desempenho cognitivo ruim, devido a destruição das isoformas da distrofina Dp140 e Dp71 (WINGEIER *et al*, 2009).

Para verificar se a heterogeneidade de mutações do gene *DMD* pode ser comparada com a heterogeneidade clínica da DMD, foram analisadas quatro grupos de mutações distintas (três proximais e uma não classificada) em 5 famílias: 4 com mais de um caso e uma família com apenas um caso relatado. No primeiro grupo foi analisado a mutação do Exon 34 (pequena mutação *nonsense*), que ocorreu em 4 pacientes: 3 de uma mesma família e 1 caso em uma família distinta. Dois destes pacientes com acesso ao tratamento em fase tardia, depois de 12 anos, e um com acesso ao tratamento aos 6 anos. O paciente com acesso ao tratamento com idade mais precoce perdeu a marcha mais cedo, aos 8 anos, enquanto que os demais mantiveram a perda da marcha com média de idade de 10.6 anos, sinalizando que outras causas podem estar associadas com a idade da perda da marcha, fato este já referido na

literatura. É provável que fatores genéticos estejam implicados na evolução da doença, mas fatores sociais e culturais influenciam no acesso ao tratamento (HUFTON & ROPER,2017).

A taxa de pacientes com dificuldades na aprendizagem foi elevada, mesmo sendo apenas uma referência dos pais e a observação clínica. Este dado deve ser melhor esclarecido com a ampliação desta investigação com uso de instrumentos para avaliação neurocognitiva/comportamental. Entre estes pacientes encontra-se 01 pacientes com a mutação distal (Exon 66), c.9568C>T, promovendo a substituição do aminoácido arginina na posição 3190 e gerando um códon de parada (*nonsense*). Esta variante já foi descrita previamente e associada a DMD e deficiência intelectual (DI) grave, por estar relacionada a mutação da Dp71. O paciente relatado apresenta clínica compatível com DI grave, pois aos nove anos apresentava atraso importante na fala e alterações comportamentais, além disso apresentou atraso motor, iniciando a marcha após os 3 anos de idade, estes dados são concordantes com a literatura (MOIZARD *et al*, 2000).

A análise mutacional dos pacientes é fundamental para o aconselhamento genético das famílias, correlacionar com a heterogeneidade clínica, podendo em alguns casos, prever maior ou menor gravidade e auxiliar na tomada de decisões para o melhor manejo terapêutico. Em nossa amostra foram identificados três pacientes (12%), com indicação para a nova terapia com Ataluren. Atualmente a literatura é unânime em concordar que o diagnóstico molecular é imprescindível para a DMD, e deva ser realizado precocemente. Baseado neste conhecimento, é proposto um novo algoritmo diagnóstico para DMD.(Figura 8). O diagnóstico precoce se faz necessário para um melhor manejo clínico e possíveis propostas terapêuticas, dessa forma propomos um algoritmo para diagnóstico precoce de DMD. (Figura 9).

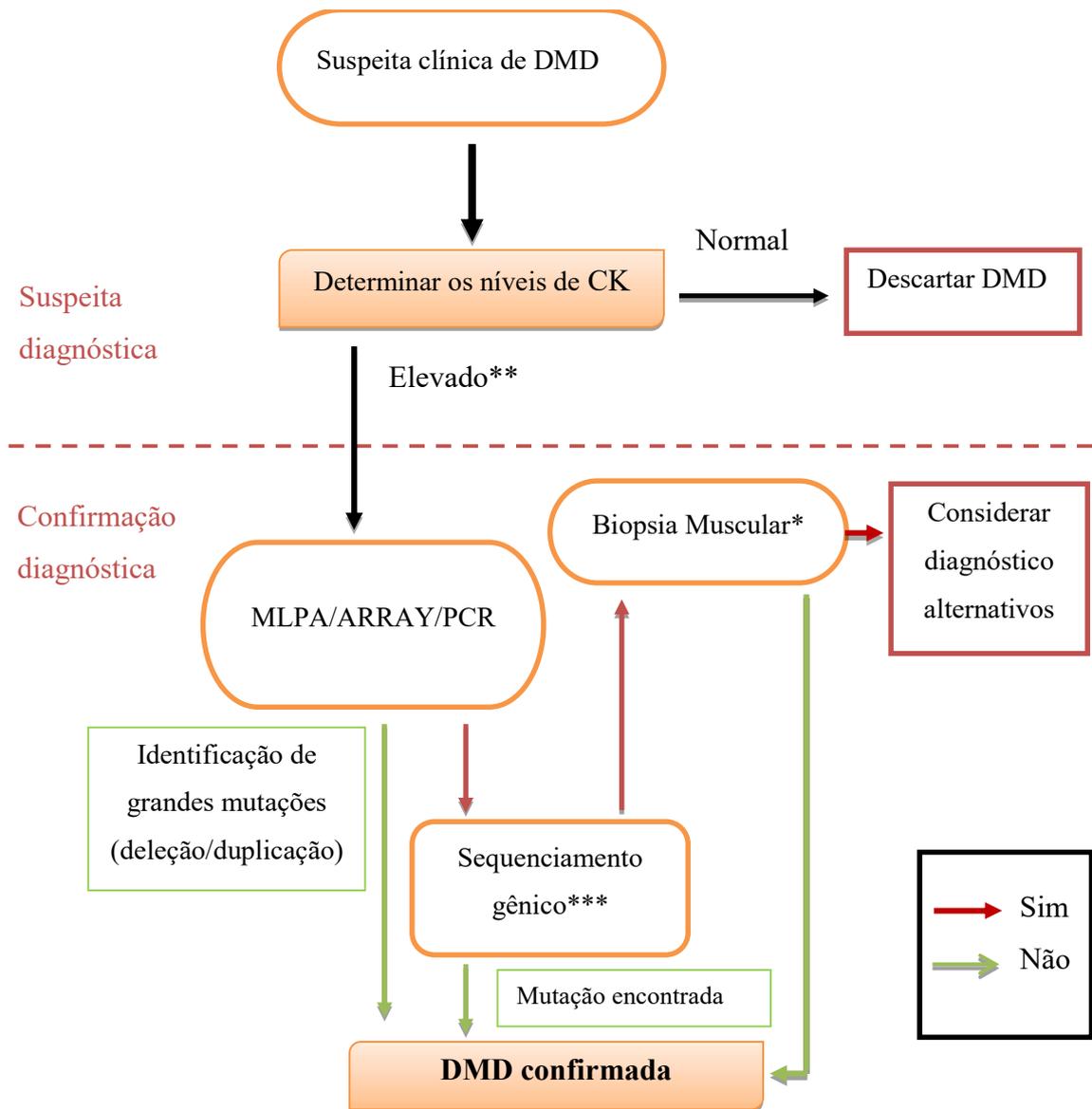
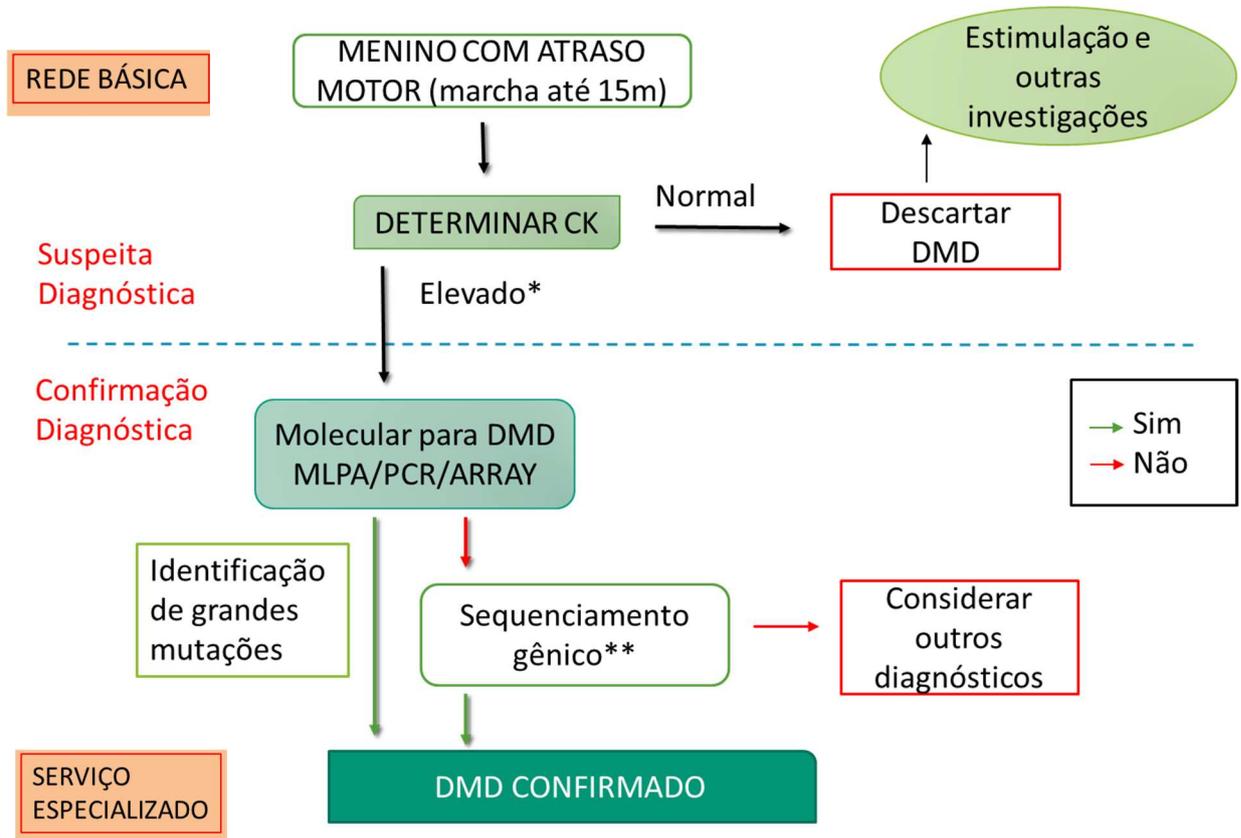
Figura 8. Algoritmo de diagnóstico de DMD

Figura 2. Proposta de Algoritmo para diagnóstico precoce de DMD



8. CONCLUSÃO

É necessário diminuir o atraso no diagnóstico e o tempo de chegada dos pacientes ao serviço especializado, para diminuir complicações clínicas, promover mudanças na evolução natural da doença, com o acesso a novas terapias e manejos adequados, promovendo uma maior e melhor qualidade de vida.

A distrofia Muscular de Duchenne, trata-se de doença rara, grave e com grande heterogeneidade clínica, por isso é necessário a atuação de equipe multidisciplinar com treinamento específico.

O diagnóstico molecular é hoje indispensável para oportunizar os pacientes as novas terapias e para possíveis ensaios clínicos, bem como para promover o aconselhamento genético familiar. Neste grupo de pacientes, três (12%) dos pacientes tem indicação para uso de Ataluren, uma das novas terapias.

Este estudo é de grande importância para os pacientes, pois serão beneficiados com melhor manejo clínico, a partir do conhecimento que foi adquirido e a promoção de ações para a melhoria do atendimento especializado.

O registro do perfil mutacional deste grupo de pacientes é inédito na Região Norte do Brasil, contribuindo com dados epidemiológicos de grande valor para a literatura brasileira.

BIBLIOGRAFIA

Artigos e Periódicos

AARTSMA-RUS, A., Ginjaar, I. B., & Bushby, K. (2016). The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Medical Genetics*, 53(3), 145–151. <http://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103387>

ARAUJO, Alexandra P. Q. C. *et al*. Brazilian consensus on Duchenne muscular dystrophy. Part 1: diagnosis, steroid therapy and perspectives. *Arq. Neuro-Psiquiatr.* São Paulo, v. 75, n. 8, p. 104-113, Aug. 2017. Available from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004282X2017000800104&lng=en&nrm=iso accessed on 23 May 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/0004-282x20170112>.

ALMEIDA *et al* 2017 Genetic profile of Brazilian patients with dystrophinopathies. *Clinical Genetics* 2017; 1–5

BANIHANI R, *et al* (2015). Cognitive and Neurobehavioral Profile in Boys with Duchenne Muscular Dystrophy. *J. Child. Neurol.* 2015 Oct; 30(11):1472-82. doi: 10.1177/0883073815570154. Epub 2015 Feb 6.

BUSHBY, K. *et al* (2010). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, y manejo farmacológico y psicosocial. *Lancet Neurol*, 177-189.

BLADEN CL *et al* (2015) The TREAT-NMD DMD Global Database: análise de mais de 7.000 mutações de distrofia muscular de Duchenne. *Hum Mutat.* 2015 Abr; 36 (4): 395-402. doi: 10.1002 / humu.22758. Epub 2015 17 de março.

BUSHBY, K. *et al* (2010). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. *Lancet Neurol*, 177-189.

BELLO, L., & PEGORARO, E. (2016). Genetic diagnosis as a tool for personalized treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myologica*, 35(3), 122–127.

BIRNKRANT, DJ *et al*. (2018). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management *The Lancet. Neurology* 17.3 (2018): 251- 267. PMC. Rede. 22 de abril de 2018.

BIRNKRANT DJ *et al* Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: respiratory, cardiac, bone health, and orthopaedic management. *Lancet Neurol.* 2018 Apr; 17(4):347-361. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30025-5. Epub 2018 Feb 3.

BIRNKRANT DJ, Bushby K, Bann CM, Apkon SD, Blackwell A, Colvin MK, Cripe L, Herron AR, Kennedy A, Kinnett K, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 3: primary care, emergency management, psychosocial care, and transition of care across the lifespan. *Lancet Neurol*. 2018 May; 17(5):445-455. Epub. 2 Feb 2018.

DRUMMOND L. M. (1979). *Archives of Disease in Childhood*, 54, 362-366
Creatine phosphokinase levels in the newborn and their use in screening for Duchenne muscular dystrophy

HUFTON M, Roper H (2017) *Dev Med Child Neurol*. Aug; 59(8):837-842. doi: 10.1111/dmcn.13460. Epub 2017 May 16. Variations in Duchenne muscular dystrophy course in a multi-ethnic UK population: potential influence of socio-economic factors.

HOFFMAN ERIC P, Robert H. Brown Jr., Louis M. Kunkel Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* Volume 51, Issue 6, p919-928, 24 December 1987

DARRAS BT, Urion DK, Ghosh PS. Dystrophinopathies. 2000 Sep 5 [Updated 2018 Apr 26]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2018. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1119/>

DINIZ, GPC *ET AL* (2010). Doenças neuromusculares e instrumentos úteis na avaliação motora em crianças e adolescentes. *RevMed Minas Gerais* 20(4 Supl 3): S12-S19

EMERY, A (2001) Duchenne muscular dystrophy or Meryon's disease *THE LANCET* Volume 357, No. 9267, p1529, 12 May 2001

HUFTON M, ROPER H. (16 de maio de 2017). Variations in Duchenne muscular dystrophy diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol*, 77-93.

HASSAN MJ, Mahmood S, Ali G, Bibi N, Waheed I, Rafiq MA, et al. Intragenic deletions in the dystrophin gene in 211 Pakistani Duchenne muscular dystrophy patients. *Pediatr Int* 2008; 50(2):162-166. DOI: 10.1111/j.1442-200X.2008.02538.x.

KAREN A. *ET AL* (2004). The Dystrophin Glycoprotein Complex Signaling Strength and Integrity for the Sarcolemma. *Circ Res*. 94(8):1023-31.

KRAJEWSKA G. Motor development in children with muscular dystrophy of the Duchenne type. *Neurol Neurochir Pol*. 1977 Nov-Dec.

KOEKS, Z., Bladen, C. L., Salgado, D., van Zwet, E., Pogoryelova, O., McMacken, G., ... Lochmüller, H. (2017). Clinical Outcomes in Duchenne Muscular Dystrophy: A Study of 5345 Patients from the TREAT-NMD DMD Global Database. *Journal of Neuromuscular Diseases*, 4(4), 293–306. <http://doi.org/10.3233/JND-170280>

LAVANCHY, J. (2011). Perfil clínico de patologia neuromuscular hereditaria en el Instituto de Rehabilitación Infantil Teletón. *Revista Chilena de Psiquiatría y Neurología de la infancia y adolescencia.*, 134-139.

LIANG, Y., Chen, S., Zhu, J., Zhou, X., Yang, C., Yao, L., & Zhang, C. (2015). Dystrophin hydrophobic regions in the pathogenesis of Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 15(2), 42–49. <http://doi.org/10.17305/bjbms.2015.300>

LIM KRQ, Maruyama R, Yokota T. (2017) Eteplirsén in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Drug Design, Development and Therapy*. 11:533-545. doi:10.2147/DDDT.S97635.

MATTHEWS *et al* (2016) Corticosteróides para o tratamento da distrofia muscular de Duchenne. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016 5 de maio; (5): CD003725. doi: 10.1002 / 14651858.CD003725.pub4.

MCGREEVY, J. W., Hakim, C. H., McIntosh, M. A., & Duan, D. (2015). Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. *Disease Models & Mechanisms*, 8(3), 195–213. <http://doi.org/10.1242/dmm.018424>

MONACO AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. A explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 1988; 2(1):90-95. DOI: 10.1016/0888-7543(88)90113-9

MOREIRA, A.S.S., ARAÚJO, A.P.Q.C. Não reconhecimento dos sintomas iniciais na atenção primária e a demora do diagnóstico da Distrofia Muscular de Duchenne. *Revista Brasileira de Neurologia*, v.45, n. 3, 2009.

NASCIMENTO OSORIO A, et al. Consenso para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento del paciente con distrofia muscular de Duchenne. *Neurología*. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2018.01.001>

PASCUAL et al. (1982) Duchenne muscular dystrophy. Review of 37 cases *An Esp Pediatr*.

RYDER, S., Leadley, R. M., Armstrong, N., Westwood, M., de Kock, S., Butt, T., ... Kleijnen, J. (2017). The burden, epidemiology, costs and treatment for Duchenne muscular dystrophy: a evidence review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 12, 79. <http://doi.org/10.1186/s13023-017-0631-3>

RAE, M. G., & O'MALLEY, D. (2016). Cognitive dysfunction in Duchenne muscular dystrophy: a possible role for neuromodulatory immunemolecules. *Journal of Neurophysiology*, 116(3), 1304–1315. <http://doi.org/10.1152/jn.00248.2016>

SALAS, A. (2014). Distrofia muscular de Duchenne. *Anales Pediatría Continuada*, 47-54.

SARLO LG; *et al* (2009) Diagnóstico molecular da distrofia muscular Duchenne Revista Científica da FMC - Vol. 4, nº 1.

SCARVONE-MAURO, C. e. (2013). Distrofias Musculares Congénitas en el niño. *Revista Neurología*, 47-52.

STEPHEN, A. *et al* (2010). Best Practice Guidelines on molecular diagnostics in Duchenne/Becker muscular dystrophies. *Neuromuscular Disorders*, 422-427.

STREHLE, E. (2009). Long-term management of children with neuromuscular disorders. *J Pediatr (Rio J)*, 379-384.

TAYLOR, P. J., Betts, G. A., Maroulis, S., Gilissen, C., Pedersen, R. L., Mowat, D. R., ... Buckley, M. F. (2010). Dystrophin Gene Mutation Location and the Risk of Cognitive Impairment in Duchenne Muscular Dystrophy. *PLoS ONE*, 5(1), e8803. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0008803>

TARINI, V. (2005). The exercise in neuromuscular diseases. *Rev Neurociencias*, 067-073.

TORRICELLI, R. (2004). Actualización en distrofias musculares. *Revista de Neurología*, 860-871.

VIEITEZ, I, P. Gallano, L. González-Quereda, S. Borrego, I. Marcos, J.M. Millán, T. Jairo, C. Prior, J. Molano, M.J. Trujillo-Tiebas, J. Gallego-Merlo, M. García-Barcina, M. Fenollar, C. Navarro. (2017) Espectro mutacional de la distrofia muscular de Duchenne en España: estudio de 284 casos *Neurología*, Volume 32, Issue 6, July–August 2017, Pages 377-385

ZHAO, J., Kodippili, K., Yue, Y., Hakim, C. H., Wasala, L., Pan, X., ... Lai, Y. (2016). Dystrophin contains multiple independent membrane-binding domains. *Human Molecular Genetics*, 25(17), 3647–3653. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddw210>

ZATS M, Frota-pessoa Creatine-phosphokinase (CPK) activity in relatives of patients with X-linked muscular dystrophies: a Brazilian study. *Sendto J Genet Hum*. 1976 Jun;24(2):153-68.

WELCH, E. M. (2007). PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature Publishing Group*, 1-5.

Sites

História e investigação de Duchenne <https://www.duchenne-spain.org/investigacion/historia-investigacion-de-duchenne/>).

Histórico de Duchenne (<http://www.whonamedit.com/doctor.cfm/950.html/>)

Manual do Ministério da saúde:

DIRETRIZES PARA ATENÇÃO INTEGRAL ÀS PESSOAS COM DOENÇAS RARAS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE – SUS Portaria GM/MS nº 199 de 30/01/2014(*).MINISTÉRIO DA SAÚDE Secretaria de Atenção à Saúde Departamento de Atenção Especializada e Temática Coordenação Geral de Média e Alta Complexidade - Brasília _DF 2014 A coleção institucional do Ministério da Saúde pode ser acessada na íntegra na Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde: <http://www.saude.gov.br/bvs>

Teses

ROCHA, VERA LÚCIA DOS SANTOS. **Avaliação clínica e da qualidade de vida de indivíduos com distrofia muscular progressiva** Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, 2011.

SILVA, MARLY CONCEIÇÃO **Diagnóstico de cardiomiopatia na distrofia muscular progressiva por ressonância magnética cardiovascular: correlação com tratamento, prognóstico e preditores genéticos** /Marly Conceição Silva – São Paulo, 2013. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Cardiologia

APÊNDICE 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE BASEADO NAS DIRETRIZES DA RESOLUÇÃO CNS Nº466/2012, MS.

Prezado (a) Senhor (a)

Esta pesquisa é sobre CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-MOLECULAR DE PACIENTES COM Distrofia Muscular de Duchenne em um Serviço Especializado no Estado do Pará e está sendo desenvolvida por mestranda RAIMUNDA HELENA FERREIRA FEIO, do programa de pós-graduação em análises clínicas da Universidade Federal da Pará, sob a orientação do (a) Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva.

Os objetivos do estudo são caracterizar o perfil clínico-molecular de pacientes com DMD atendidos no ambulatório de neurogenética do HUBFS. A finalidade deste trabalho é para identificarmos os pacientes com distrofia de Duchenne que podem beneficiar-se de novos tratamentos. Serão coletados dados clínicos e resultados de exames laboratoriais e genéticos que já tenham sido realizados pelo paciente.

Informamos que essa pesquisa leva a risco morais e psicológicos, tais como a identificação algumas mulheres com a condição *portadores da mutação*, ou seja, que possui a mutação sem manifestação, as quais são as responsáveis pela transmissão da patologia para seus filhos, assim como a identificação do tipo da mutação nos pacientes e a indicação de tratamento específico. Mas para garantir o sigilo da informação, não haverá nenhuma identificação dos nomes das famílias nem dos pacientes envolvidos na mesma, estando desta forma protegida a individualidade de cada um.

O comitê de ética em pesquisa em seres humanos, ao qual analisa esta pesquisa é do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (CEP- ICS/UFPA) – complexo de sala de aula/ICS – sala 13 – Campus Universitário. 01 Guamá. CEP 66.075-110 Belém-Pará. Tel.: 3201-7735. E-mail: cepcs@ufpa.br

Solicito sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica nacional e/ou internacional.

Esclarecemos que a participação de seu filho no estudo é voluntária e, portanto, o(a) senhor(a) não é obrigado(a) a fornecer as informações ou colaborar com as atividades solicitadas. Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que vem recebendo na Instituição. A pesquisadora estará a sua disposição (91 988770137; helenafeio@gmail.com) para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.

Assinatura do (a) pesquisador (a) responsável

Considerando, que fui informado(a) dos objetivos e da relevância do estudo proposto, de como será minha participação, dos procedimentos e riscos decorrentes deste estudo, declaro o meu consentimento para que meu filho _____ participe da pesquisa, como também concordo que os dados obtidos na investigação sejam utilizados para fins científicos (divulgação em eventos e publicações). Estou ciente que receberei uma via desse documento.

Belém, ____ de _____ de _____

Assinatura do participante ou responsável legal

APÊNDICE 2

PROTOCOLO DE PESQUISA

DATA: ____/____/____ ID: ----- Prontuário: -----

DN: ____/____/____ ID DE ADMISSÃO SERVIÇO: _____

DATA DA ADMISSÃO: ____/____/____

LOCALIZACAO: (procedência) -----

CLINICO/ EPIDEMIOLOGICO:

IDADE DA 1A. MANIFESTAÇÃO CLÍNICA: _____

IDADE DA ALTERAÇÃO DA MARCHA: _____

ADNPM () MOTOR () LINGUAGEM

HISTÓRICO FAMILIAR: () Não () Sim -----

MEDICAÇÃO: () Não () Sim -----

CARDIOLOGIA:

ÚLTIMA AVALIAÇÃO: -----/-----/----- Local: -----

Medicação: () Não () Sim

VENTILAÇÃO NÃO INVASIVA: () Não () Sim

DIAGNÓSTICO:

CK / IDADE -----

BIOPSIA MUSCULAR/ANO: () Não () Sim-----

DIAGNÓSTICO MOLECULAR:

| MUTAÇÃO | POSIÇÃO | PEQUENA OU GRANDE MUTAÇÃO | SUBTIPO DE MUTAÇÃO | TROCA DO NUCLEOTIDEO | TROCA DO AMINOACIDO | DATA DO EXAME MOLECULAR |
|---------|---------|------------------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------------|
| | | | | | | |

EVOLUÇÃO CLINICA

CADEIRANTE: () Não () Sim qual idade? (ANOS) -----

ESCOLIOSE: () Não () Sim qual idade? (ANOS) -----

VENTILAÇÃO ASSISTIDA: () Não () Sim -----

DIF. ESCOLAR: () Não () Sim -----

ALTERAÇÃO DE COMPORTAMENTO: () NÃO () SIM -----

TRATAMENTO

CORTICOIDE: () Não () Sim

ESPECIFICO: () Não () Sim

CLASSIFICAÇÃO CLINICA:

() fase 1 () fase 2 () fase 3 () fase 4 () fase 5

ANEXO 1

| DETALHAR PROJETO DE PESQUISA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|-------------------------------|---------------------------------------|------------|-------------|---|---|---|-------------------|-------------------------|--------------|-----------|-------------|----------|----------------------------|-------------|----|-------------------------------|------------------|---|-------------|---|-------------|---|----|-------------------------------|------------------------------|------------|-------------|---|---|---|----|---------------------|----------------------------|---|-------------|---|---|--|----|---------------------|--------------------------------------|---|-------------|---|---|--|----|---------------------|---------------------------------------|---|-------------|---|---|--|----|---------------------|------------------------|---|-------------|---|---|--|----|---------------------|-----------------|---|------------|---|---|--|
| <p>DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA</p> <p>Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-MOLECULAR DE PACIENTES COM Distrofia Muscular de Duchenne em Serviço Especializado no Estado do Pará Pesquisador Responsável: RAIMUNDA HELENA FERREIRA FEIO Área Temática: Versão: 1 CAAE: 84000217.6.0000.0018 Submetido em: 27/02/2018 Instituição Proponente: Instituto de Ciências Biológicas Situação da Versão do Projeto: Aprovado Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ</p> <p style="text-align: right;">Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_988827</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 40%;"> <ul style="list-style-type: none"> ↳ Versão em Tramitação (E1) - Versão 2 <ul style="list-style-type: none"> ↳ Emenda (E1) - Versão 2 <ul style="list-style-type: none"> ↳ Currículo dos Assistentes ↳ Documentos do Projeto <ul style="list-style-type: none"> ↳ Comprovante de Recepção - Submissão ↳ Declaração de Instituição e Infraestrutura ↳ Declaração de Pesquisadores - Submissão ↳ Folha de Rosto - Submissão 1 ↳ Outros - Submissão 1 ↳ Projeto Detalhado / Brochura Investigação ↳ TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa ↳ Versão Atual Aprovada (PO) - Versão 1 ↳ Projeto Completo </div> <div style="width: 55%;"> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 35%;">Tipo de Documento</th> <th style="width: 15%;">Situação</th> <th style="width: 15%;">Arquivo</th> <th style="width: 15%;">Postagem</th> <th style="width: 20%;">Ações</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td colspan="5" style="height: 100px;"> </td> </tr> </tbody> </table> </div> </div> | | | | | | | | Tipo de Documento | Situação | Arquivo | Postagem | Ações | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tipo de Documento | Situação | Arquivo | Postagem | Ações | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>LISTA DE APRECIÇÕES DO PROJETO</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Apreciação</th> <th style="width: 15%;">Pesquisador Responsável</th> <th style="width: 10%;">Versão</th> <th style="width: 10%;">Submissão</th> <th style="width: 10%;">Modificação</th> <th style="width: 10%;">Situação</th> <th style="width: 10%;">Exclusiva do Centro Coord.</th> <th style="width: 15%;">Ações</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>E1</td> <td>RAIMUNDA HELENA FERREIRA FEIO</td> <td>2</td> <td></td> <td></td> <td>Em Edição</td> <td></td> <td>  </td> </tr> <tr> <td>PO</td> <td>RAIMUNDA HELENA FERREIRA FEIO</td> <td>1</td> <td>27/02/2018</td> <td>08/05/2018</td> <td>Aprovado</td> <td>Não</td> <td> </td> </tr> </tbody> </table> | | | | | | | | Apreciação | Pesquisador Responsável | Versão | Submissão | Modificação | Situação | Exclusiva do Centro Coord. | Ações | E1 | RAIMUNDA HELENA FERREIRA FEIO | 2 | | | Em Edição | |    | PO | RAIMUNDA HELENA FERREIRA FEIO | 1 | 27/02/2018 | 08/05/2018 | Aprovado | Não |   | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Apreciação | Pesquisador Responsável | Versão | Submissão | Modificação | Situação | Exclusiva do Centro Coord. | Ações | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E1 | RAIMUNDA HELENA FERREIRA FEIO | 2 | | | Em Edição | |    | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PO | RAIMUNDA HELENA FERREIRA FEIO | 1 | 27/02/2018 | 08/05/2018 | Aprovado | Não |   | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>HISTÓRICO DE TRÂMITES</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Apreciação</th> <th style="width: 10%;">Data/Hora</th> <th style="width: 10%;">Tipo Trâmite</th> <th style="width: 5%;">Versão</th> <th style="width: 5%;">Perfil</th> <th style="width: 20%;">Origem</th> <th style="width: 20%;">Destino</th> <th style="width: 30%;">Informações</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PO</td> <td>08/05/2018 12:37:38</td> <td>Parecer liberado</td> <td>1</td> <td>Coordenador</td> <td>UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará</td> <td>PESQUISADOR</td> <td></td> </tr> <tr> <td>PO</td> <td>08/05/2018 12:37:06</td> <td>Parecer do colegiado emitido</td> <td>1</td> <td>Coordenador</td> <td>UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará</td> <td>UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará</td> <td></td> </tr> <tr> <td>PO</td> <td>08/05/2018 12:36:30</td> <td>Parecer do relator emitido</td> <td>1</td> <td>Coordenador</td> <td>UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará</td> <td>UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará</td> <td></td> </tr> <tr> <td>PO</td> <td>08/05/2018 12:27:33</td> <td>Aceitação de Elaboração de Relatoria</td> <td>1</td> <td>Coordenador</td> <td>UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará</td> <td>UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará</td> <td></td> </tr> <tr> <td>PO</td> <td>03/04/2018 12:47:33</td> <td>Confirmação de Indicação de Relatoria</td> <td>1</td> <td>Coordenador</td> <td>UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará</td> <td>UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará</td> <td></td> </tr> <tr> <td>PO</td> <td>03/04/2018 12:47:09</td> <td>Indicação de Relatoria</td> <td>1</td> <td>Coordenador</td> <td>UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará</td> <td>UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará</td> <td></td> </tr> <tr> <td>PO</td> <td>01/03/2018 09:45:58</td> <td>Aceitação do PP</td> <td>1</td> <td>Secretária</td> <td>UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará</td> <td>UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;">«« « « Ocorrência 1 a 10 de 16 registro(s) » » »»</p> | | | | | | | | Apreciação | Data/Hora | Tipo Trâmite | Versão | Perfil | Origem | Destino | Informações | PO | 08/05/2018 12:37:38 | Parecer liberado | 1 | Coordenador | UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará | PESQUISADOR | | PO | 08/05/2018 12:37:06 | Parecer do colegiado emitido | 1 | Coordenador | UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará | UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará | | PO | 08/05/2018 12:36:30 | Parecer do relator emitido | 1 | Coordenador | UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará | UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará | | PO | 08/05/2018 12:27:33 | Aceitação de Elaboração de Relatoria | 1 | Coordenador | UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará | UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará | | PO | 03/04/2018 12:47:33 | Confirmação de Indicação de Relatoria | 1 | Coordenador | UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará | UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará | | PO | 03/04/2018 12:47:09 | Indicação de Relatoria | 1 | Coordenador | UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará | UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará | | PO | 01/03/2018 09:45:58 | Aceitação do PP | 1 | Secretária | UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará | UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará | |
| Apreciação | Data/Hora | Tipo Trâmite | Versão | Perfil | Origem | Destino | Informações | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PO | 08/05/2018 12:37:38 | Parecer liberado | 1 | Coordenador | UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará | PESQUISADOR | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PO | 08/05/2018 12:37:06 | Parecer do colegiado emitido | 1 | Coordenador | UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará | UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PO | 08/05/2018 12:36:30 | Parecer do relator emitido | 1 | Coordenador | UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará | UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PO | 08/05/2018 12:27:33 | Aceitação de Elaboração de Relatoria | 1 | Coordenador | UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará | UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PO | 03/04/2018 12:47:33 | Confirmação de Indicação de Relatoria | 1 | Coordenador | UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará | UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PO | 03/04/2018 12:47:09 | Indicação de Relatoria | 1 | Coordenador | UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará | UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PO | 01/03/2018 09:45:58 | Aceitação do PP | 1 | Secretária | UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará | UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

26/05/2018

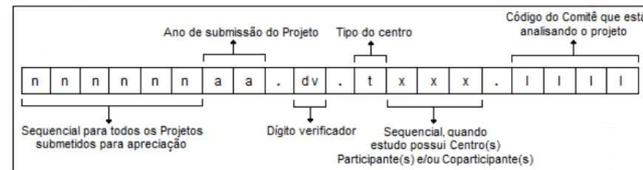
Plataforma Brasil

| Apreciação | Data/Hora | Tipo Trâmite | Versão | Perfil | Origem | Destino | Informações |
|------------|------------------------|---------------------------------|--------|-----------------------|---|---|--|
| PO | 27/02/2018 22:49:23 | Submetido para avaliação do CEP | 1 | Pesquisador Principal | PESQUISADOR | UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará | |
| PO | 26/02/2018 09:26:38 | Rejeição do PP | 1 | Secretária | UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará | PESQUISADOR | o TCLE deve conter os dados para contato do pesquisador. Ver mais >> |
| PO | 22/02/2018 11:00:48 | Submetido para avaliação do CEP | 1 | Pesquisador Principal | PESQUISADOR | UFPA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará | |

« « « Ocorrência 1 a 10 de 16 registro(s) » » »

LEGENDA:**(*) Apreciação**

| | | |
|---|---|---|
| PO = Projeto Original de Centro Coordenador | POp = Projeto Original de Centro Participante | POc = Projeto Original de Centro Coparticipante |
| E = Emenda de Centro Coordenador | Ep = Emenda de Centro Participante | Ec = Emenda de Centro Coparticipante |
| N = Notificação de Centro Coordenador | Np = Notificação de Centro Participante | Nc = Notificação de Centro Coparticipante |

(*) Formação do CAAE

Este sistema foi desenvolvido para os navegadores Internet Explorer (versão 7 ou superior),
ou Mozilla Firefox (versão 9 ou superior).

ANEXO 2

26/05/2018

IBGE | Brasil em Síntese | Pará | Pesquisa | Registro civil | Casamentos

Registro civil

TABELA

SÉRIE
HISTÓRICA

CARTOGRAMAS RANKING

Ano: 2016 ▾  Fonte Notas

Pará

Adicionar
comparação ▾Adicionar
comparação ▾✓ CASAMENTOS ✓ REGISTRADOS
NO ANOLugar do
registro

33.773

casamentos

✓ DIVÓRCIOS

✓ JUDICIAL

✓ 1º instância

LUGAR DA
AÇÃO DO
PROCESSO

7.053

divórcios

✓ POR
ESCRITURA
PÚBLICATabelionato
de notas

1.914

divórcios

✓ NASCIDOS VIVOS

✓ OCORRIDOS NO
ANO✓ Lugar de
residência da
mãe

125.428

pessoas

✓ LOCAL DE
NASCIMENTO

Hospital

121.266

pessoas

✓ REGISTRADOS

26/05/2018

IBGE | Brasil em Síntese | Pará | Pesquisa | Registro civil | Casamentos

| | | |
|--|---------|----------|
| Lugar do registro | 143.533 | peessoas |
| Lugar de residência da mãe | 142.980 | peessoas |
| ✓ ÓBITOS | | |
| ✓ OCORRIDOS NO ANO | | |
| > Lugar de residência do falecido | 32.138 | peessoas |
| > Lugar do registro | 32.516 | peessoas |
| ✓ OCORRIDOS E REGISTRADOS NO ANO | | |
| ✓ Fetais | | |
| LUGAR DE RESIDÊNCIA DA MÃE | 675 | peessoas |