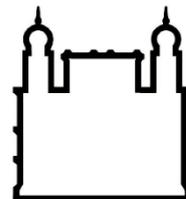




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE PACIENTES
COM ARTROGRIPOSE MÚLTIPLA CONGÊNITA**

MARCELA CÂMARA MACHADO COSTA

**Salvador-Bahia
2021**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE PACIENTES
COM ARTROGRIPOSE MÚLTIPLA CONGÊNITA**

MARCELA CÂMARA MACHADO COSTA

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas

Tese apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Patologia
Humana para a obtenção do grau
de Doutor.

**Salvador – Bahia
2021**

Título da Tese: "CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE PACIENTES COM ARTROGRIPOSE MÚLTIPLA CONGÊNITA"

MARCELA CÂMARA MACHADO COSTA

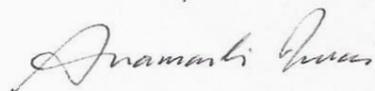
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 27 de maio de 2021.

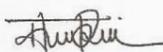
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Dafne Dain Gandelman Horovitz
Pesquisadora
IFF/FIOCRUZ



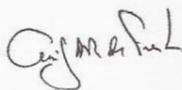
Dra. Anamarli Nucci
Professora
UNICAMP



Dra. Tatiana Regia Suzana Amorim Boa
Sorte
Professora
UFBA



Dr. Marcos Almeida Matos
Professor
BAHIANA



Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas
Pesquisador
IGM/Fiocruz

FONTES DE FINANCIAMENTO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior – Brasil (CAPES)-
Código de Financiamento 001

DEDICATÓRIA

A todos pacientes com artrogripose, exemplos de superação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tornar tudo possível.

Ao meu orientador, Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas por ter aceitado o desafio e acreditar neste projeto.

As amigas e incríveis geneticistas Angelina Xavier e Joanna Meira que tanto me ensinaram a identificar e classificar as dismorfologias nos casos.

Ao Professor Edmar Zanoteli, pela imensa colaboração com o processamento, análise das biópsias musculares e discussão dos casos clínicos.

A toda equipe do Instituto Gonçalo Moniz/Fiocruz, especialmente a equipe da biblioteca

A Cláudio, pela ajuda no processamento das amostras para microscopia eletrônica no Instituto Gonçalo Moniz/Fiocruz.

A equipe do laboratório de genética médica do HUPES, sobretudo Paula e Daniel.

Ao professor Luiz Alcântara pela possibilidade de colaboração para os exames por SNP *array*.

A Acácia, que se dedicou a me ensinar e ajudar com a análise dos resultados do SNP *array*.

Ao querido amigo Marco Antônio Novaes, que pacientemente realizou as eletroneuromiografias nas crianças com artrogripose, de difíceis avaliações.

A todos os meus amigos, em especial Adriele Ribeiro e Diego Miguel.

Minha querida família que torceram e me apoiaram nos momentos que precisei de ajuda, especialmente meu irmão Marcos e minha mãe do coração, Vanda.

Ao meu pai Jaime (*in memoriam*) e minha mãe Lígia por me ensinar o caminho correto das coisas.

Aos meus sogros Ana Angélica e Antônio Luís, meus segundos pais, por todo o apoio.

Aos meus pequenos Davi e Matheus, que transformaram minha vida numa alegria infinita.

Ao meu companheiro de vida e alma, André Leonardo, pelo apoio incondicional.

COSTA, Marcela Câmara Machado. Caracterização clínica, morfológica e molecular de pacientes com artrogripose múltipla congênita. 2021. 127 f. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

RESUMO

INTRODUÇÃO: As artrogripes múltiplas congênitas (AMC) são contraturas articulares em mais de duas articulações em diferentes áreas do corpo, observadas desde o nascimento. É um achado clínico, observado em cerca de 400 doenças distintas, a maioria de origem genética. Todas elas resultam em acinesia fetal por redução dos movimentos fetais intrauterino, com limitações articulares, que podem estar associadas a outros achados como dismorfias, fraqueza muscular, alterações cognitivas e envolvimento de outros órgãos. As doenças neuromusculares são causas frequentes de AMC. A definição etiológica é fundamental para decisão terapêutica, aconselhamento genético e prognóstico. A frequência das AMC é desconhecida no Brasil e não existem estudos demográficos para esta população em nosso meio. **OBJETIVO:** O presente estudo objetivou identificar a etiologia das AMC em indivíduos assistidos em serviço público especializado em doenças neuromusculares e genéticas do Hospital Universitário Professor Edgar Santos, além de levantar dados demográficos e clínicos destes pacientes. **MATERIAL E MÉTODOS:** Um estudo prospectivo, formado por uma amostra de conveniência de pacientes encaminhados para avaliação, onde foi elaborado um protocolo racional de investigação baseado em aspectos clínicos e exames complementares. Após preenchimento da ficha padrão, os pacientes realizaram investigação com exames complementares, tais como: dosagem de creatinofosfoquinase, eletroneuromiografia, ressonância magnética de crânio, cariótipo, biópsia muscular e estudo molecular. **RESULTADOS:** Durante o período de 42 meses foram avaliados 41 pacientes. 53,7% eram do sexo feminino e a média de idade na primeira avaliação foi de 8,8 anos. Cerca de 30% dos pacientes relatavam uma história familiar positiva. O número médio de articulações envolvidas foi seis (6), sendo o pé torto a alteração mais observada (85,4%). O diagnóstico etiológico foi estabelecido em 75,6% dos casos, com base no fenótipo e em exames complementares. Em quatro pacientes de três famílias distintas, o diagnóstico foi estabelecido por sequenciamento completo do exoma. Do total dos casos diagnosticados, 39% foram causados por doenças neuromusculares e do tecido conjuntivo, 24% classificados como amioplasia, em 12% a causa foi acometimento do sistema nervoso central e em 24,4% não foi estabelecido um diagnóstico etiológico. Foram encontradas nesta casuística formas raras de AMC e variantes patogênicas ainda não descritas em genes associados a miopatias. **CONCLUSÃO:** O presente estudo demonstrou as principais características clínicas e morfológicas de diversas formas de AMC na população estudada. Foi capaz de estabelecer um diagnóstico etiológico na maioria dos casos com AMC, com base em dados de exame clínico, biópsia muscular, eletroneuromiografia e estudo genético.

Palavras-chave: Artrogripose, Articulações, Biópsia, Doenças Neuromusculares, Fenótipo, Genética.

COSTA, Marcela Câmara Machado. Clinical, morphological and molecular characterization of patients with arthrogryposis multiplex congenita. 2021. 127 f. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Arthrogryposis multiplex congenita (AMC) are joint contractures in more than two joints in different areas of the body, seen since birth. It is a clinical finding, observed in about 400 different diseases, most of which are of genetic origin. All of them result in fetal akinesia due to reduced intrauterine fetal movements, with joint limitations, which may be associated with other findings such as dysmorphism, muscle weakness, cognitive impairment and involvement of other organs. Neuromuscular diseases are a frequent cause of AMC. The etiological definition is fundamental for therapeutic definition, genetic counseling and prognosis. The frequency of AMC is unknown in Brazil and there are no demographic studies for this population in our country. **AIM:** The present study aimed to identify the etiology of AMC in individuals assisted in a public service specialized in neuromuscular and genetic diseases at Professor Edgard Santos University Hospital, in addition to collecting demographic and clinical data of these patients. **Material and Methods:** A prospective study, formed by a convenience sample of patients referred for evaluation, in which a rational investigation protocol was developed based on clinical aspects and complementary exams. After filling out the standard form, patients underwent investigation with other exams, such as creatinine phosphokinase measurement, electroneuromyography, cranial magnetic resonance, karyotype, muscle biopsy and molecular studies. **RESULTS:** During the 42-month period, 41 patients were evaluated. 53.7% were female and the average age at the first assessment was 8.8 years. About 30% of patients reported a positive family history. The average number of joints involved was 6, with clubfoot being the most observed alteration (85.4%). The etiological diagnosis was established in 75.6% of the cases, based on the phenotype and on complementary exams. In four patients from three different families, the diagnosis was made by exome. Of the total diagnosed cases, 39% were caused by neuromuscular and connective tissue diseases, 24% classified as amyoplasia, in 12% the cause was involvement of the central nervous system and in 24.4% an etiological diagnosis was not established. Rare forms of AMC and pathogenic variants previously not described in genes associated with myopathies were found in this series. **CONCLUSION:** The present study demonstrated the main clinical and morphological characteristics of different forms of AMC in the studied population. A detailed clinical examination associated with electromyography, muscle biopsy and genetic study, was able to establish the etiological diagnosis in most cases with AMC

KEY WORDS: Arthrogryposis, Joints, Biopsy, Neuromuscular Disease, Phenotype, Genetics

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fluxograma 1: Fluxograma utilizado para a investigação da etiologia da artrogripose	38
Figura 2. Mapa de distribuição de procedência dos pacientes por mesorregiões da Bahia	48
Figura 3. Gráfico de Distribuição percentual das especialidades de encaminhamento dos pacientes	49
Figura 4. Biópsia de tecido muscular de paciente com distrofia muscular merosina negativa	67
Figura 5. Biópsia de tecido muscular revelando agregados intracitoplasmáticos vistos na periferia da fibra muscular	67
Figura 6. Pacientes com amioplasia com aquisição de marcha	73
Figura 7. Amioplasia em pacientes sem aquisição de marcha	74
Figura 8. Ressonância nuclear magnética de crânio do paciente n.14	75
Figura 9. Paciente n.14. Apresentação clínica de paciente com importante comprometimento do SNC	75
Figura 10. Pacientes com infecção congênita pelo <i>Zika virus</i>	76
Figura 11. Paciente n. 40 com fenótipo de síndrome de Beals	77
Figura 12. Paciente n. 27, com síndrome do pterígio múltiplo (síndrome de Escobar)	78
Figura 13. Pacientes com características fenotípicas de Ehlers Danlos musculocontractural	79
Figura 14. Paciente com artrogripose distal DA2A (Síndrome de Freeman-Sheldon)	80
Figura 15 – Paciente n.41, CHIFAHDD	81
Figura 16. Paciente n.31 com miopatia congênita por desproporção congênita de tipo de fibras	84
Figura 17. Achados na microscopia óptica de paciente n.32 com desproporção congênita de tipo de fibras.	84
Figura 18. Paciente n.16 com padrão de envolvimento distal	85
Figura 19. Aspecto histológico paciente n.16 com miopatia congênita tipo multi mini cores	86

Figura 20. Paciente n.17 com distrofia muscular congênita merosina negativa aos 7 meses de idade	87
Figura 21. Biópsia de músculo de paciente n.17 com distrofia muscular congênita merosina negativa	87
Figura 22. Paciente n.37 com distrofia muscular congênita merosina negativa	88
Figura 23. Miopatia com agregados citoplasmáticos	89
Figura 24. Paciente n.28 com grave escoliose, camptodactilia e baixa estatura	90
Figura 25. Paciente n.9	91
Figura 26. Gêmeas com VUS no gene <i>MYH14</i>	92
Figura 27. Paciente n.12	93
Figura 28. Paciente com AMC, aos 40 anos	94
Figura 29. Paciente n.1	94
Fluxograma 2. Fluxograma de investigação em pacientes com AMC	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Principais genes associados às proteínas do sarcolema envolvidos nas artrogriposes distais	31
Tabela 2 Principais genes envolvidos nas formas sindrômicas de origem em doenças neuromusculares associadas a AMC	32
Tabela 3. Procedência dos pacientes com AMC em serviço público especializado em doenças neuromusculares do SGM-HUPES, 2016-2019	48
Tabela 4. Dados demográficos: idade, sexo, cor/raça dos pacientes com AMC assistidos em serviço público especializado em doenças neuromusculares do SGM-HUPES, 2016-2019	50
Tabela 5. Consanguinidade e história familiar dos pacientes com AMC assistidos em serviço público especializado em doenças neuromusculares do SGM-HUPES, 2016-2019	51
Tabela 6. Dados maternos referente aos pacientes com AMC assistidos em serviço público especializado em doenças neuromusculares do SGM-HUPES, 2016-2019	52
Tabela 7. Idade da aquisição de marcos do neurodesenvolvimento dos pacientes com AMC assistidos em serviço público especializado em doenças neuromusculares do SGM-HUPES, 2016-2019	54
Tabela 8. Cirurgias realizadas previamente ou durante o período de estudo nos pacientes com AMC assistidos em serviço público especializado em doenças neuromusculares do SGM-HUPES, 2016-2019	55
Tabela 9. Achados no exame clínico em pacientes com AMC assistidos em serviço público especializado em doenças neuromusculares do SGM-HUPES, 2016-2019	58
Tabela 10. Exames complementares e resultados em indivíduos assistidos em serviço público especializado em doenças neuromusculares do SGM-HUPES, 2016-2020	60

Tabela 11. Principais topografias de lesão pela ENMG de pacientes com AMC em indivíduos assistidos em serviço público especializado em doenças neuromusculares do SGM-HUPES, 2016-2019	61
Tabela 12. Principais achados de RM de crânio em pacientes com envolvimento clínico do SNC, 2016-2019	63
Tabela 13. Categorias histológicas em 24 biópsias de músculo de pacientes com AMC assistidos em serviço público especializado em doenças neuromusculares do SGM-HUPES, 2016-2019	65
Tabela 14. Principais achados histológicos, na microscopia convencional e eletrônica de pacientes com AMC assistidos em serviço público especializado em doenças neuromusculares do SGM-HUPES, 2016-2019	66
Tabela 15. Resultados do SNP <i>array</i> , classificação de patogenicidade e Fenótipo de dez pacientes assistidos em serviço público especializado em doenças neuromusculares do SGM-HUPES, 2016-2019	68
Tabela 16. Genes, variantes e fenótipos dos pacientes com AMC que realizaram sequenciamento completo do exoma, assistidos em serviço público especializado em doenças neuromusculares do SGM-HUPES, 2016-2019	70
Tabela 17. Aspectos clínicos de pacientes com miopatias congênitas assistidos em serviço público especializado em doenças neuromusculares do SGM-HUPES, 2016-2020	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD	Artrogripose Distal
ADP	Adenosina difosfato
AMC	Artrogripose Múltipla Congênita
ATP	Adenosina trifosfato
CEPRED	Centro Estadual de Prevenção e Reabilitação de Pessoas com Deficiência
CNV	Varição do número de cópias
COX	Citocromo oxidase
CPK	Creatinofosfoquinase
CTG	Citosina timina guanina
DAB	Diaminobenzidina
DGV	Database of genomics variants
DNA	Do inglês, Deoxyribonucleic Acid
ECO	Ecocardiograma
ENMG	Eletroneuromiografia
GRCh37	Do inglês, Genome Reference Consortium Human Build 37
HE	Hematoxilina e eosina
LAPEM	Laboratório de Patologia Estrutural e Molecular
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
NADH	Nicotinamida adenina trinucleotideo
OMIM	Do inglês, Online Mendelian Inheritance in Men
PP	Provavelmente patogênico
RM	Ressonância nuclear magnética
RX	Radiografia
SDH	Succinato desidrogenase
SGM-HUPES	Serviço de Genética Médica- Hospital Universitário Professor Edgard Santos
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP <i>array</i>	Polimorfismos de Nucleotídeo Único por rearranjo
SNP	Sistema nervoso periférico

SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFBA	Universidade Federal da Bahia
USG	Ultrassonografia
USP	Universidade São Paulo
VUS	Variante de significado incerto

SUMÁRIO

1	INDRODUÇÃO	17
1.1	DEFINIÇÃO.....	17
1.2	ASPECTOS HISTÓRICOS.....	17
1.3	EPIDEMIOLOGIA.....	18
1.4	CLASSIFICAÇÃO.....	18
1.5	ETIOLOGIA DAS DIVERSAS FORMAS CLÍNICAS DAS ARTROGRIPOSES.....	22
1.5.1	Doenças neuromusculares	23
1.5.2	Alterações neuropáticas (dos sistemas nervoso central e periférico)	23
1.5.3	Alterações na junção neuromuscular	24
1.5.4	Alterações no tecido conjuntivo	24
1.5.5	Limitações do espaço intrauterino	25
1.5.6	Doenças maternas	25
1.5.7	Teratógenos	25
1.5.8	Outras doenças genéticas	25
1.5.9	Infecções congênitas	26
1.6	DIAGNÓSTICO.....	26
1.6.1	Creatinofosfoquinase (CPK)	28
1.6.2	Eletroneuromiografia (ENMG)	28
1.6.3	Biópsia de músculo	28
1.6.3	Análise genética	30
1.7	DESFECHO CLÍNICO E TRATAMENTO.....	32
2	JUSTIFICATIVA	33
3	OBJETIVOS	34
3.1	OBJETIVO GERAL.....	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	DELINEAMENTO E PERÍODO DO ESTUDO.....	35
4.2	LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO.....	35
4.3	SELEÇÃO DA AMOSTRA.....	35

4.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	35
4.5	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	36
4.6	COLETA DE DADOS.....	36
4.7	INVESTIGAÇÃO COMPLEMENTAR.....	37
4.7.1	Eletroneuromiografia	39
4.8	COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	39
4.8.1	Coleta do tecido muscular	39
4.8.2	Processamento do tecido muscular	40
4.8.3	Avaliação por microscopia óptica	42
4.8.4	Avaliação por microscopia eletrônica	42
4.8.5	Coleta de sangue	43
4.9	ESTUDO MOLECULAR.....	43
4.10	APRESENTAÇÃO DE CASOS BASEADOS NO FENÓTIPO E EM EXAMES COMPLEMENTARES.....	44
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
4.12	ASPECTOS ÉTICOS.....	45
4.12.1	Comitê de ética em pesquisa (CEP)	45
4.12.2	Análise dos riscos envolvidos	45
5	RESULTADOS	47
5.1	AMOSTRA.....	47
5.2	DADOS DEMOGRÁFICOS.....	49
5.3	CONSANGUINIDADE E HISTÓRIA FAMILIAR.....	50
5.4	ANTECEDENTES GESTACIONAIS E NEONATAIS.....	51
5.5	HISTÓRIA CLÍNICA.....	54
5.6	EXAME FÍSICO.....	56
5.7	EXAMES COMPLEMENTARES.....	59
5.7.1	CPK	60
5.7.2	ENMG	60
5.7.3	Ecocardiograma	61
5.7.4	Cariótipo	61
5.7.5	USG de abdome total	61
5.7.6	Radiografia das articulações envolvidas	62
5.7.7	Ressonância magnética de crânio	62

5.7.8	Biópsia muscular	63
5.7.9	SNP array	67
5.7.10	Sequenciamento completo do Exoma	69
5.7.11	Outros exames	70
5.8	CLASSIFICAÇÃO POR GRUPOS DE DIAGNÓSTICO, BASEADOS EM FENÓTIPO E EXAMES COMPLEMENTARES	71
5.8.1	Pacientes com amioplasia	71
5.8.2	Pacientes com AMC e envolvimento do SNC	74
5.8.3	AMC com envolvimento do nervo, junção, músculo ou tecido conjuntivo	76
5.8.4	AMC de causa não definida	92
5.9	FLUXOGRAMA DE INVESTIGAÇÃO	94
6	DISCUSSÃO	96
6.1	AMOSTRA	96
6.2	DADOS DEMOGRÁFICOS	98
6.3	CONSANGUINIDADE E HISTÓRIA FAMILIAR	99
6.4	ANTECEDENTES GESTACIONAIS E NEONATAIS	99
6.5	ASPECTOS CLÍNICOS	101
6.6	EXAMES COMPLEMENTARES	102
6.7	FLUXOGRAMA DE INVESTIGAÇÃO	109
7	CONCLUSÕES	111
	LIMITAÇÕES DO ESTUDO	113
	REFERÊNCIAS	114
	ANEXOS	120
	APÊNDICES	135

1 INTRODUÇÃO

1.1 DEFINIÇÃO

A palavra artrogripose deriva do grego “arthron” - articulação e “gryposis” - curvado, é utilizada para descrever contraturas articulares congênicas (STAHELI et al., 1998). Estas são classificadas em: contraturas isoladas e contraturas múltiplas. Contraturas isoladas afetam uma região do corpo, sendo o pé torto congênito a forma mais comum, com frequência de 1 a cada 500 nascidos vivos (BAMSHAD, 2009).

Os termos artrogripose, artrogripose múltipla congênita ou artrogripose multiplex congênita (AMC), são usados para descrever múltiplas contraturas congênicas que afetam duas ou mais articulações em diferentes áreas do corpo, limitando a amplitude dos movimentos, a funcionalidade e a independência do indivíduo (BAMSHAD, 2009; HALL, 2014; CACHECHO, 2019). As contraturas são simétricas e não progressivas, com melhora com cuidados ortopédicos e fisioterápicos; muitas vezes há melhora espontânea (HALL, 2014). Em geral envolve os membros, mas também incluem a mandíbula com limitação da abertura da boca; a coluna vertebral, com restrição de movimentação cervical e de tronco e obrigatoriamente são observadas ao nascimento (HALL, 2014).

Este é um grupo heterogêneo de doenças raras e a AMC é um sinal clínico, não um diagnóstico em si (STAHELI et al., 1998). O que é comum em todas as condições clínicas dos pacientes afetados, é que evoluíram com redução do movimento fetal intraútero como resultado de uma anormalidade fetal ou materna. São conhecidas mais de 400 diferentes doenças que se manifestam com contraturas articulares. (BAMSHAD, 2009; HALL, 2014, HALL, et al., 2019).

1.2 ASPECTOS HISTÓRICOS

O primeiro relato de uma síndrome caracterizada por contraturas articulares congênicas foi feito por Otto em 1841, embora Neil Gordon relate a história de uma menina com 8 anos de idade, residente na cidade de Norwich, Inglaterra no ano de 1156 que apresentava, desde o seu nascimento, deformidades em mãos e pés, e

contraturas em outras articulações, totalmente dependente para atividades de vida diária, e que teve sua condição melhorada e chamada de milagre, ao ser levada ao túmulo de St. William na Catedral de Norwich (GORDON, 1996).

A pintura de Jusepe de Ribera que se encontra no museu do Louvre, em Paris, França datada de 1642, chamada “The Clubfoot”, retrata uma criança que apresenta características físicas compatíveis com amiotrofia, a forma mais comum de AMC de origem não genética (RAMACHANDRAN, 2006).

1.3 EPIDEMIOLOGIA

A prevalência global da artrogripose é um em cada 3.000 a 5.000 nascidos vivos, embora cada tipo específico seja relativamente raro (LOWRY, 2010). A forma mais comum é a amiotrofia, uma condição esporádica, com uma frequência de um em cada 10.000 nascimentos (HALL, 2014).

O EUROCAT, uma base de dados de vigilância europeia para anomalias congênitas, composta por 24 países, reportou um registro de 787 casos de AMC entre os anos de 1980 e 2006, período em que foram contabilizados 8,9 milhões de nascimentos e uma prevalência de 8,5/100.000 nascimentos para artrogripose. A prevalência foi maior nos últimos anos deste estudo, provavelmente em decorrência de melhores ferramentas diagnósticas (HOFF et al., 2011).

Doenças neuromusculares são causa frequente de artrogriposes. Sua prevalência está aumentando em todo o mundo, possivelmente por melhores métodos diagnósticos, sobretudo estudos moleculares como o sequenciamento de nova geração (LEUNG, WAGNER, 2013).

No Brasil não existem estudos epidemiológicos sobre a frequência das artrogriposes, sendo descritas como grupos isolados de doenças ou como manifestação de doenças como as miopatias congênitas (NUCCI, et al., 2004) e a miastenia congênita (ENGEL et al., 2015) ou secundária ao uso de misoprostol, um análogo sintético da prostaglandina E1, usado em obstetrícia por sua ação útero-tônica, na dilatação do colo e indução de aborto (GONZALES, et al., 1998). Mais recentemente, relatos na literatura apresentam a AMC como parte do espectro de manifestações da infecção congênita pelo *Zika virus* (VAN DER LINDEN et al., 2016; DA SILVA PONE et al., 2018)

1.4 CLASSIFICAÇÃO

Em 1981, Judith Hall estabeleceu uma primeira classificação baseada na apresentação clínica e envolvimento de outros sistemas (HALL, 1981). BAMSHAD, em 2009, apresentou uma classificação mais ampla, incluindo formas de envolvimento articular distal, com subtipos bem definidos (BAMSHAD, 2009).

HALL, KIMBER e VAN BOSSE, em 2017 ao discutirem sobre a inexistência de uma classificação única e uniforme, capaz de definir a etiologia da AMC, propuseram uma abordagem baseada na separação de etiologias intrínsecas e extrínsecas que levam a acinesia fetal. Condições intrínsecas são aquelas próprias do embrião/feto, como doenças metabólicas, musculares, dos nervos ou do SNC. As condições extrínsecas estão relacionadas a doenças maternas, anormalidades uterinas e teratógenos (HALL, KIMBER, VAN BOSSE, 2017).

As classificações usadas na maioria das séries publicadas de pacientes até o ano de 2019, de pacientes com AMC são as seguintes:

1. Classificação proposta por Judith Hall, 1981:

Tipo I: envolvimento exclusivo dos membros

Tipo II: envolvimento dos membros e outras áreas do corpo ou sistemas

Tipo III: alterações no SNC ou associados a déficit cognitivo.

Pacientes com amioplasia são classificados como tipo I. Pacientes com artrogripose associado a hipoplasia pulmonar ou malformações renais são considerados do tipo II. Pacientes com doença do corno anterior da medula, por envolver o sistema nervoso central, como as amiotrofias espinhais, são classificados como tipo III (FILGES, 2013).

Segundo a classificação de HALL, fazem parte ainda das artrogriposes sindrômicas (tipo II) as de causa neuromuscular, onde os neurônios motores inferiores, a junção neuromuscular e o músculo podem estar envolvidos na etiologia. Nestes casos, além do aparecimento das contraturas articulares, que podem ser distais isoladas, distais e proximais ou apenas proximais, podem estar presentes: fraqueza muscular, hipotonia, anormalidades faciais como palato em ogiva, face alongada, envolvimento respiratório ou cardíaco (HALL, 1981).

2. Classificação proposta por BAMSHAD, 2009 são subdivididos em:

I. Amioplasia

II. Artrogriposes distais

III. Artrogriposes sindrômicas associadas a doenças do SNC ou a outras doenças neurológicas

I. Amioplasia

É uma forma distinta de artrogripose, com os seguintes aspectos clínicos: exame neurológico normal com contraturas nos ombros, que apresentam rotação interna e abdução, cotovelos estendidos, punhos flexionados e desvio ulnar, dedos rígidos e polegares posicionados nas palmas das mãos. Nos membros inferiores, o quadril pode estar deslocado, os joelhos são em geral estendidos e os pés têm contraturas graves em equinovaro (BAMSHAD, 2009). Muitos pacientes apresentam hemangioma facial, e a maioria, inteligência normal.

Em uma série de 38 casos, SELLS demonstrou que 84% das crianças tinham envolvimento simétrico dos membros superiores e inferiores e encontrou anormalidades abdominais como gastrosquise ou atresia intestinal em 10% dos casos. Outras variações de apresentação incluem contraturas apenas em membros superiores ou apenas em membros inferiores ou padrão assimétrico de envolvimento (SELLS, 1996).

Na descrição original de Hall de 135 pacientes com amioplasia, todos os casos eram esporádicos, sem anormalidade molecular descrita (HALL et al., 2014). Ela também notou um aumento de prevalência em gêmeos ou em condições que poderiam levar a redução dos movimentos dos membros como em alterações uterinas, oligodrâmnio, ou restrição uterina (HALL et al., 2014).

II. Artrogriposes distais

São um grupo de doenças, em geral, com padrão de herança autossômico dominante, com penetrância reduzida e expressividade variável, que envolve articulações distais. As síndromes de artrogriposes distais são clínicas e geneticamente heterogêneas e podem ser causadas por mutações em genes que codificam as proteínas contráteis durante o período embrionário, resultando em

proteínas sarcoméricas disfuncionais e, conseqüentemente, miopatias (KIMBER, 2012; HALL, 2014).

Em uma série que foram avaliados 39 pacientes provenientes de 21 famílias, as mutações mais frequentes foram nos genes *TNNI2* (que codifica a proteína troponina I2), *TPM2* (que codifica a tropomiosina) e *MYH3* (que codifica a proteína embrionária miosina 3 de cadeia pesada), todos associados a proteínas musculares contráteis. Portanto, uma função defeituosa das proteínas de contração muscular durante o período embrionário influencia na mobilidade do feto, sendo uma causa comum de contraturas congênitas nestas síndromes (KIMBER et al., 2012).

Aspectos clínicos compartilhados por todas as artrogriposes distais são envolvimento de mãos e pés, com pouco envolvimento de articulações proximais e envolvimento variado de outros sistemas, como envolvimento cardíaco, oftalmológico e neurológico. Foram descritas 19 formas clínicas distintas, classificadas de acordo com a proporção de características que compartilham entre si (BAMSHAD, 2009; HALL, 2014)

Os critérios diagnósticos são clínicos. Baseiam-se na presença de envolvimento distal de quatro membros, com camptodactilia ou pseudocamptodactilia (extensão passiva de articulação interfalangiana proximal limitada com hiperextensão do punho), desvio ulnar no punho e flexão de dedos, para os membros superiores (BAMSHAD, 2009).

Nos membros inferiores, são observados pés em equinvaro, deformidades calcaneovago e metatarso varo. Para ser considerado afetado, o paciente tem que apresentar dois ou mais desses critérios, considerados maiores, mas quando um familiar em primeiro grau é afetado, é necessário apenas um critério maior para o indivíduo ser considerado como afetado pela artrogripose distal (BAMSHAD, 2009).

Dentre as artrogriposes distais, os subtipos 1 e 2 são os mais prevalentes, sendo as do tipo 2 dividido em 2A (Síndrome de Freeman-Sheldon) e 2B (Síndrome de Sheldon Hall), sendo esta última a mais comumente observada, e com características fenotípicas peculiares que permitem um diagnóstico clínico (BAMSHAD, 2009; KIMBER et al., 2012).

III. Artrogriposes sindrômicas associadas a doenças do SNC ou a outras doenças neurológicas

Dentre as artrogriposes sindrômicas, destacam-se aquelas com envolvimento do SNC, que são causadas provavelmente por diminuição na ativação cortical e espinhal de neurônios motores. Decorrem de anomalias de desenvolvimento como defeitos de migração, microcefalia, anormalidades cromossômicas (deleções ou rearranjos) e infecções do sistema nervoso central por exemplos. Clinicamente esses pacientes, além das contraturas múltiplas, que podem ser unilaterais, podem apresentar anormalidades faciais, além de hiperreflexia ao exame neurológico e atraso cognitivo (BAMSHAD, 2009).

Em 2019, em uma reavaliação das diversas formas de classificação, HALL concluiu que não havia uma classificação única, abrangente para as diferentes etiologias da doença, e que abordagens diferentes se sobrepunham. Propôs, então, uma classificação baseada na clínica e em exames complementares que auxiliariam no diagnóstico, na compreensão da história natural e no uso de terapias com potencial de modificar o curso da doença (HALL, 2019).

1.5 ETIOLOGIA DAS DIVERSAS FORMAS CLÍNICAS DAS ARTROGRIPOSES

A acinesia fetal é a causa comum de todas as AMC. Existe uma correlação direta entre o início precoce da acinesia e a gravidade das contraturas. Quanto mais precoce e mais longa a duração da diminuição dos movimentos fetais, mais graves serão as contraturas ao nascimento. Na maioria dos casos há uma integridade na formação das articulações envolvidas (SWINYARD, 1982).

Possíveis etiologias e potenciais causas de acinesia fetal são:

- Doenças musculares
- Alterações neuropáticas (dos sistemas nervosos central e periférico)
- Doenças da junção neuromuscular
- Doenças do tecido conjuntivo
- Limitações do espaço intrauterino
- Doenças maternas
- Teratógenos
- Doenças genéticas como cromossomopatias
- Infecções congênitas

1.5.1 Doenças musculares

Doenças musculares associadas a alterações na estrutura e/ou função levam a redução da movimentação fetal e são observadas em muitas formas de artrogripose distal, que são causadas por defeitos em proteínas musculares sarcoméricas (KIMBER et al., 2012). Dentre as doenças musculares mais associadas às artrogripes destacam-se algumas mitocondriopatias, as miopatias congênitas, sobretudo as miopatias nemalínicas por mutações nos genes *ACTA1* e *NEB*, e as do tipo central core/multiminicore por mutações nos genes *RYR1* e *KLHL40* (NUCCI et al., 2004; HALL, 2014; NORTH et al., 2014).

Distrofias musculares congênitas associadas à deficiência de colágeno VI, como as distrofias de Ullrich e Bethlem podem apresentar artrogripose como manifestação clínica (GILBREATH, 2014). Mutações no gene *LAMA 2*, que causam uma forma de distrofia muscular congênita por deficiência de merosina, também podem apresentar um fenótipo de contraturas múltiplas congênitas, tanto distais como proximais associados a hipotonia (BONNEMANN et al., 2014), assim como mutações no gene *TPM2*, que codifica uma proteína sarcoplasmática importante no processo de contração muscular (TAYSHARGHI et al., 2012).

1.5.2 Alterações neuropáticas (dos sistemas nervosos central e periférico)

Os processos neuropáticos que levam a AMC estão associados à formação do nervo, sua estrutura ou função. Essas alterações podem envolver tanto o sistema nervoso central (SNC) (cérebro e medula), quanto o sistema nervoso periférico (SNP). No primeiro, defeitos de migração ou mielinização podem levar a redução da movimentação intrauterina e hipotonia, causando o aparecimento de contraturas articulares múltiplas. No geral, nestas formas de apresentação, além da artrogripose, se observam alterações cognitivas, atraso da fala e da linguagem e podem estar associados a malformações do SNC (HALL, 2014).

Nas doenças do nervo periférico, a atrofia muscular espinhal do tipo 0 pode se manifestar com artrogripose, além de apresentar um grave comprometimento respiratório (BAMSHAD, 2009). A atrofia muscular espinhal ligada ao X é também uma forma grave de doença do neurônio motor inferior, que se manifesta com artrogripose e marcada hipotonia, com elevada mortalidade (HUNTER et al., 2015).

1.5.3 Alterações na junção neuromuscular

As doenças da junção neuromuscular podem ser tanto adquiridas como herdadas. Nas primeiras, a artrogripose é observada em filhos de mães com miastenia gravis, com passagem de anticorpos maternos pela barreira placentária, que inibem os receptores nicotínicos de acetilcolina do feto, reduzindo a movimentação fetal entre a 13^a e 18^a semanas de gestação, produzindo contraturas articulares múltiplas no feto (HOFFMANN et al., 2007; EYMARD, 2009).

As causas de origem genética são as síndromes miastênicas congênitas. Mutações em genes que são responsáveis pela manutenção da integridade da junção neuromuscular, seja na membrana pré-sináptica, na fenda sináptica ou na membrana pós-sináptica podem estar envolvidas. Alterações dos receptores rapsina, subunidades gama e delta do receptor de acetilcolina e colina acetiltransferase, levam a um fenótipo clínico de contraturas articulares distais (ENGEL et al., 2015).

O diagnóstico precoce das miastenias congênitas é importante por responderem ao tratamento com pirostigmina, salbutamol ou epinefrina (ENGEL et al., 2015). Existem ainda casos descritos por mutações no gene *DOK7*, que codifica uma proteína transmembrana responsável pela manutenção dos receptores de acetilcolina na membrana pós-sináptica, que também respondem a uma terapia medicamentosa (HANTAI et al., 2004).

1.5.4 Alterações no tecido conjuntivo

Condrodisplasias estão associadas com limitações em movimentação fetal devido a uma malformação óssea ou cartilaginosa. Alterações na pele podem também levar a uma reduzida movimentação articular. Além disso, condições de hiper mobilidade articular, como nas síndromes de Marfan e de Beals, por exemplo, podem levar a um fenótipo com artrogripose (HALL, 2014), assim como, outros defeitos do colágeno, como na síndrome de Ehlers-Danlos musculocontractural (tipos 1 e 2), por exemplo, causadas por mutações nos genes *CHST14* e *DSE*, que codificam enzimas necessárias à biossíntese de dermatan sulfato, componente do tecido conjuntivo. Nestas formas raras de Ehlers-Danlos, os pacientes apresentam artrogripose distal, escoliose progressiva, hipotonia, frouxidão ligamentar e fragilidade capilar (JANECKE et al., 2016).

1.5.5 Limitações do espaço intrauterino

As limitações de espaço dentro do útero podem restringir os movimentos fetais na segunda metade da gestação. As causas mais frequentes são útero bicorno, miomatose uterina, gestações múltiplas (trigêmeos ou quadrigêmeos) e banda amniótica. Quando estas limitações são a origem da artrogripose, em geral, respondem bem à reabilitação funcional (HALL, 2012).

1.5.6 Doenças maternas

Doenças maternas que aumentam o risco de artrogripose são: diabetes, esclerose múltipla, além de infecções congênitas. Na maioria delas os mecanismos relacionados à redução de movimentos fetais são pouco conhecidos (HALL, 2012).

1.5.7 Teratógenos

O uso de medicações e drogas ilícitas tem sido associado ao aparecimento de artrogripose em recém-nascidos. Exemplos são relaxantes musculares, drogas com efeito abortivo como misoprostol e anticonvulsivantes como fenobarbital. Uso excessivo de bebidas alcoólicas, além de cocaína também podem ser causadores de contraturas múltiplas congênitas (HALL, 2012).

1.5.8 Outras doenças genéticas

Cromossomopatias, como as trissomias do 18 (síndrome de Edwards) e do 21 (síndrome de Down), podem manifestar contraturas articulares. Deleções ou duplicações de regiões cromossômicas contendo um gene ou uma região importante para o controle do movimento fetal são descritos como causa de AMC, sobretudo nos pacientes com AMC, alterações cognitivas e/ou outras anormalidades congênitas (HALL, 2019).

A síndrome de Marfan neonatal, formas perinatais graves de doença de Gaucher tipo 2, meningomielocele e fenótipo de Pena-Shokeir (sequência de acinesia/hipocinesia fetal), são outros exemplos de doenças genéticas que podem manifestar um quadro congênito de artrogripose, associada ou não a alterações no

SNC, e podem ser letais (MIGNOT et al., 2003; HALL, 2009; KALAMPOKAS et al., 2012).

A distrofia miotônica tipo 1 ou doença de Steinert é uma doença neuromuscular, causada por uma repetição de trinucleotídeos CTG no gene *DMPK* que codifica uma proteína quinase, localizado no cromossomo 19q13.3. Nesta forma de distrofia, há uma variabilidade fenotípica, onde se observa fenômeno miotônico, fraqueza muscular, catarata, distúrbios de condução cardíaca, diabetes, hipogonadismo e hipoventilação noturna com insuficiência ventilatória. A idade de início é também variada, com formas congênicas mais graves, com artrogripose associado a deficiência intelectual (TURNER, HILTON-JONES, 2014).

1.5.9 Infecções congênicas

Infecções maternas causadas por vírus, tais como: *Rubella virus* e *Coxsackie virus* têm sido associadas a contraturas articulares múltiplas fetais, embora os mecanismos que levem a acinesia fetal sejam desconhecidos (KALAMPOKAS et al., 2012; HALL, 2014).

Nas infecções congênicas causadas pelo *Zika virus*, a manifestação mais comum é a microcefalia, com atrofia cortical difusa e calcificações subcorticais. Os primeiros casos no Brasil surgiram em 2015 e desde então estudos reportam a ocorrência de artrogripose em crianças com microcefalia (VAN DER LINDEN et al., 2016) secundária à infecção pelo *Zika virus*. A patogênese proposta é o envolvimento dos neurônios motores do corno anterior da medula, que leva a uma imobilidade uterina (VAN DER LINDEN et al., 2016; DA SILVA PONE et al., 2018). Os padrões de envolvimento incluem deslocamento de quadril, pés tortos e envolvimento de membros superiores: limitação à extensão/flexão de punhos, camptodactilia, postura em flexão do segundo sobre o quinto dedo e flexão de cotovelos (VAN DER LINDEN et al., 2016; MENESES JA et al., 2017).

1.6 DIAGNÓSTICO

Definir a etiologia da AMC é importante para o planejamento de um tratamento adequado, aconselhamento genético e eventuais novos tratamentos (DIETERICH, KIMBER, HALL, 2019).

O diagnóstico inicial é clínico, com a presença de contraturas articulares em mais de duas articulações, observadas em qualquer fase da vida, mas de aparecimento desde o nascimento, que podem ser distais, proximais, com envolvimento facial ou de outros órgãos (HALL, 2014).

O diagnóstico pode ser realizado intraútero, por meio de ultrassonografia (USG). Anormalidades em movimentos fetais podem ser identificadas a partir da 8ª semana de gestação. Todavia no segundo trimestre pela maior facilidade de visualização dos movimentos fetais, especialmente entre 16ª e 18ª semanas, tem-se maior precisão (BATY, 1988; DIMITRAKI, et al., 2011).

Apesar disto, 75% dos casos de artrogripose não são diagnosticados antes do nascimento. Embora a realização de USG pré-natal seja obrigatória, os movimentos fetais não são sistematicamente avaliados nestes exames, contribuindo para uma ineficácia diagnóstica. (FILGES, HALL, 2013).

A avaliação clínica detalhada e história familiar, com realização de heredograma, são importantes para a identificação de possíveis causas para a artrogripose. A história gestacional é fundamental para a identificação de contraturas secundárias a uso de medicações, além de outras possíveis causas de restrição de crescimento fetal (HALL, 2014).

Em geral, a causa da AMC não é definida logo ao nascimento, exceto nos pacientes com múltiplas malformações em outros órgãos, sugerindo doenças cromossômicas, e nos quais a realização de cariótipo ou técnicas de hibridização *in situ* por fluorescência podem definir a etiologia das contraturas (BAMSHAD, 2009).

A avaliação do desenvolvimento motor e cognitivo é fundamental ao longo do desenvolvimento da criança e direcionam para a investigação, sobretudo naqueles com atraso cognitivo, de alterações em sistema nervoso central (HALL, 2014).

Quando se suspeita de uma origem neuromuscular como causa da artrogripose, sobretudo naquelas com envolvimento distal de quatro membros, a eletroneuromiografia (ENMG), a biópsia de músculo, além de testes moleculares são importantes ferramentas diagnósticas para diferenciar topograficamente lesões no nervo periférico, na junção neuromuscular ou na fibra muscular (KIMBER et al., 2012, WALLACH, et al., 2018).

1.6.1 Creatinofosfoquinase (CPK)

A CPK é uma enzima que catalisa a fosforilação reversível da creatina pela adenosina trifosfato (ATP) com a formação de creatina-fosfato. Fisiologicamente, quando o músculo contrai, a ATP é convertida em adenosina-difosfato (ADP) e a CPK catalisa a fosforilação da ADP em ATP utilizando a creatina-fosfato. A CPK está associada à geração de ATP nos sistemas contráteis ou de transporte, e sua função predominante ocorre nas células musculares (MOTTA, 2009). Níveis séricos de CPK são usados como biomarcadores de doenças neuromusculares, e encontram-se elevados em algumas formas de neuropatias, doenças do neurônio motor e miopatias, especialmente nas distrofias musculares (FARDEAU, DESGUERRE, 2013).

1.6.2 Eletroneuromiografia (ENMG)

A ENMG é um estudo neurofisiológico que avalia a condução nervosa sensitivo e motora, a junção neuromuscular e a contração muscular. É um importante exame para diferenciar as doenças neuromusculares, sobretudo aquelas causadas por doenças do segundo neurônio motor e nervo periférico, com alterações na condução e junção neuromuscular, com padrões de decremento na prova de estimulação repetitiva. Anormalidades nas velocidades de condução e amplitude de potenciais de ação, sensitivos ou motor, sugerem lesões em nervos periféricos. Os achados de potenciais de ação de curta duração, pequena amplitude e aumento de recrutamento são sugestivos de envolvimento muscular, no entanto, não define a etiologia da miopatia. Uma eletromiografia normal não exclui o diagnóstico de miopatia, sobretudo as de causa metabólica e as miopatias congênitas estruturais (SHAPIRO; KARTIJI; PRESTON, 2014)

1.6.3 Biópsia de músculo

A biópsia muscular é uma técnica difundida na investigação de doenças musculares primárias (DUBOWITZ et al., 2021).

A biópsia muscular pode ser realizada por técnica aberta ou fechada, nesta última com o uso de agulha ou *punch*, sendo pouco utilizada em nosso meio, onde é mais difundida a técnica aberta. Nesta, após escolha do músculo a ser biopsiado (bíceps, deltoide, extensores de punho, vasto lateral ou tibiais) é feita a abertura de pele com bisturi, exposição da fáscia, abertura e retirada de fragmento do músculo. É uma técnica simples, feita com anestesia local, realizada em ambiente ambulatorial, em salas de pequenos procedimentos. A anestesia geral e uso de salas cirúrgicas está reservada a crianças pequenas que não colaboram com o exame (DUBOWITZ et al., 2021, FARDEAU, 2015).

A escolha do músculo a ser biopsiado e avaliado é importante para aumentar a chance de achados patológicos significativos. Músculos muito comprometidos clinicamente podem revelar na histopatologia, substituição por tecido adiposo ou fibrose. Do ponto de vista prático, pela facilidade de acesso e segurança do procedimento, são escolhidos, em membros superiores os músculos deltoide ou bíceps e em membros inferiores o vasto lateral (DUBOWITZ et al., 2021). Biópsia muscular é sobretudo útil para o diagnóstico das formas de AMC secundárias a distrofia muscular congênita e miopatia congênita, com alterações estruturais que definem o diagnóstico (NORTH et al., 2014; WALLACH et al., 2018)

As amostras obtidas são analisadas por microscopia óptica, eletrônica, estudos bioquímicos e histoquímicos (UDD et al., 2019). Na maioria das vezes a observação por microscopia óptica de crio-seções de músculos é suficiente para estabelecer o correto diagnóstico de uma miopatia específica. Alterações observadas na avaliação histológica que sugerem fortemente um diagnóstico de miopatia são: internalização e centralização dos núcleos; fibras musculares hipertróficas ou fibras atroficas arredondadas; fibras com segmentação, com aspectos de regeneração ou com degeneração. Outras alterações observadas são bastões nemalínicos, falhas oxidativas centrais e núcleos centralizados, observados em miopatias congênitas dos tipos nemalínica, central core e centro-nuclear, respectivamente (DUBOWITZ et al., 2021). Miopatias crônicas, em estágio final de doença, revelam aumento de matriz conjuntiva e infiltração por tecido adiposo (SHAIBANI et al., 2015).

As colorações pela hematoxilina e eosina e pelo tricrômio de Gomori modificado são as mais utilizadas, sendo importante a utilização de técnicas histoquímicas variadas para um correto diagnóstico (DUBOWITZ et al., 2021). Este

estudo imunoistoquímico é uma importante ferramenta diagnóstica, e estão disponíveis uma grande variedade de imunomarcadores para a detecção de proteínas do sarcolema e outras, envolvidas na manutenção da integridade da fibra muscular. As principais utilizadas na rotina de investigação são: distrofinas R, C e N, sarcoglicanas (alfa, beta e gama), disferlina, calpaina, caveolina 3, teletonina, laminina alfa 2, colágenos IV e VI, integrina alfa 7, emerina, actina, miosina, desmina, miotilina. Por outro lado, os marcadores fenotípicos de células da resposta imune e inflamatória são identificados pela técnica de imunomarcagem, sendo os principais utilizados o CD4, o CD8 e o CD68 (DUBOWITZ et al., 2021).

A técnica por microscopia eletrônica de transmissão (MET) analisa a ultraestrutura da fibra muscular, mas não é necessária para conclusão diagnóstica na maioria dos casos de miopatia. O seu uso em geral está reservado para avaliação das miopatias estruturais e mitocondriais para melhor observação das estruturas da fibra, além de ser útil na avaliação da junção neuromuscular (DUBOWITZ et al., 2021).

1.6.3 Análise genética

O cariótipo é um exame preliminar realizado para casos suspeitos de cromossomopatias, anomalias congênicas múltiplas e/ou deficiência intelectual. Tem a limitação de detectar alterações cromossômicas com perda ou ganho de material ou com mudança de local de segmentos cromossômicos, mas quando envolvem pelo menos 3 a 19 Mb de tamanho (BI et al., 2015).

A técnica de SNP *array* permite identificar deleções e duplicações em várias regiões do genoma humano em genes já descritos. É uma técnica utilizada em pacientes com anomalias congênicas, atraso do desenvolvimento ou aspectos dimórficos. DIETERICH et al., 2019, ao analisar estudos publicados com o uso desta ferramenta em AMC, conclui que deve ser um exame inicial para os casos de AMC com outras malformações

Atualmente, para avaliação de doenças envolvendo múltiplos genes são utilizados sequenciamentos de nova geração, uma técnica fundamental, mas ainda pouco difundida em nosso meio devido ao elevado custo. Muitas plataformas estão disponíveis, sendo possível a avaliação do genoma completo ou do exoma (TETREAULT et al., 2015). Para pesquisa de deleções ou duplicações, pode ser

utilizada a técnica de SNP/CGH *array*. É realizado por hibridização genômica comparativa, em uma plataforma de triagem genômica de alta resolução, por arranjo com sondas de variação do número de cópias (CNV) e polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) (JACKSON, 2018).

Até o momento, mutações em cerca de 220 genes, com distintos padrões de herança foram descritos como causa de artrogripose múltipla congênita, embora em uma proporção elevada de casos, o diagnóstico molecular seja desconhecido. (HOFFMANN 2011; HALL, 2014; BAYRAM 2016). Muitas dessas mutações são associadas a doenças neuromusculares. Dentre estas, destacam-se: a) aquelas associadas ao fenótipo das artrogriposes distais e causadas por genes responsáveis pela expressão de proteínas do sarcolema e filamentos contráteis da fibra muscular (KIMBER et al., 2012); b) aquelas associadas as amiotrofias espinhais (HALL, 2014); c) as relacionadas a defeitos na junção neuromuscular (ENGEL, 2015); d) as associadas a distrofias musculares congênitas (BONNEMANN et al., 2014); e, e) as miopatias congênitas (NORTH et al., 2014).

Na tabela 1 estão listados os principais genes associados às proteínas do sarcolema envolvidos com as artrogriposes distais (KIMBER, 2012) e na tabela 2, os genes envolvidos com as formas sindrômicas de origem neuromuscular, listado por grupos de doenças (BONNEMANN et al., 2014; HALL, 2014). O apêndice 1, traz uma lista completa das proteínas codificadas pelos genes descritos nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 Principais genes associados às proteínas do sarcolema envolvidos nas artrogriposes distais

Fenótipo	Genes
Artrogripose distal	<i>TPM2, TNNI2, TNNT3, TNNC1, TNNC2, MYH3, MYH8, MYBPC1</i>
Escobar	<i>CHRNA1, CHRND, CHRNG, RAPSN, DOK7</i>
Schwartz-Jampel	<i>HSPG2</i>

Tabela 2 Principais genes envolvidos nas formas sindrômicas de origem em doenças neuromusculares associadas a AMC

Grupo de doenças	Genes
Atrofia muscular espinhal	<i>SMN, UBA1</i>
Miastenias congênitas	<i>CHRNA1, CHRNE, MUSK, CHAT, RAPSN, DOK7, LRP4, LAMB2, AGRN, LAMININA B2, PLEC1</i>
Miopatias congênitas	<i>NEB, ACTA1, SEPN1, SEPN2, MYH7, TPM2, TPM3, TNNT1, CFL2, KBTBD13, KLHL40, RYR1</i>
Distrofias musculares congênitas	<i>PMPK, COL6A1, COL6A2, COL6A3, FCMD, POMT1, POMT2, LARGE, LAMA2</i>

1.7 DESFECHO CLÍNICO E TRATAMENTO

O tratamento das AMC envolve uma equipe multidisciplinar, independente da etiologia. É recomendado a fisioterapia precoce, mobilização articular e uso de órteses que objetivam melhorar posição e função, que são fundamentais para um desfecho clínico favorável de melhor funcionalidade para esses indivíduos, além do suporte psicológico e a terapia ocupacional para inserção destes indivíduos em suas atividades cotidianas (HALL, 2014; DIETERICH, KIMBER, HALL, 2019).

A terapia contínua é realizada na maioria dessas crianças, com 80% dos casos permanecendo em acompanhamento até a adolescência. Deformidades persistentes dos membros que restringem a função são comuns e, muitas vezes, tratados por cirurgia. O tratamento cirúrgico nos pés são os mais necessários, seguidos por procedimentos nos joelhos e no quadril. As cirurgias em membros superiores são recomendadas para correção de contraturas articulares fixas que interferem com a função dos membros superiores (BAMSHAD, 2009; DIETERICH, KIMBER, HALL, 2019). Os cotovelos são os mais abordados nos membros superiores (BAMSHAD, 2009; HALL 2019). Os principais objetivos a longo prazo são aumentar a mobilidade articular e a força muscular para fornecer adaptações para aquisição de marcha e melhora na qualidade de vida.

Em crianças com amioplasia, por exemplo, os tratamentos ortopédicos e de reabilitação resultam em habilidade de caminhar e realizar atividades da vida diária em aproximadamente 85% dos indivíduos. Quando adultos, em geral, eles necessitarão de assistência para atividades da vida cotidiana (BAMSHAD, 2009; HALL, 2014).

2 JUSTIFICATIVA

A AMC é uma condição rara, subdiagnosticada, de múltiplas etiologias. Existe uma dificuldade na classificação das formas de AMC, tanto clínica quanto etiológica, baseada apenas em achados clínicos e dismorfológicos. Atualmente, com o advento de tecnologias de sequenciamento de nova geração, mais diagnósticos etiológicos são realizados, e identificados mais genes associados as doenças neuromusculares, sobretudo as miopatias, com manifestação congênita de AMC.

Os pacientes com diagnósticos clínicos de contraturas articulares são em geral encaminhados para tratamento ortopédico e reabilitação, sem investigação neurológica ou genética. A definição da doença ou grupo de doenças que levam ao fenótipo de AMC, permite um melhor planejamento terapêutico, melhorar a qualidade de vida e definição de um prognóstico para aquele indivíduo e suas famílias.

No Brasil, não existem protocolos que definam uma rotina diagnóstica e de investigação etiológica destes pacientes, nem se conhece a frequência de casos de AMC. Definir um protocolo claro de investigação, direcionado pelo exame clínico e exames complementares racionais permitirá um diagnóstico correto e precoce. Este diagnóstico etiológico da AMC poderá levar a um manejo direcionado à causa, aconselhamento genético adequado e orientação familiar. Além da indicação precoce do tratamento clínico, funcional e psicológico impactando na redução da morbimortalidade com impacto na qualidade de vida do paciente. Sendo assim é essencial inserir nos protocolos assistenciais a exploração dos diagnósticos etiológicos nos centros de referência que atendem pacientes com artrogripes múltiplas congênitas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar a etiologia das artrogripes múltiplas congênitas em indivíduos assistidos em serviço público especializado em doenças neuromusculares do Serviço de Genética Médica do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (SGM-HUPES).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Levantar os dados demográficos e clínicos de pacientes com artrogribose múltipla congênita.

Classificar as artrogripes de causa neuromuscular de acordo com o local de lesão: nervo periférico, junção neuromuscular ou músculo.

Descrever os principais achados em biópsia muscular nos pacientes com artrogribose múltipla de causa neuromuscular.

Investigar variantes em genes candidatos associados às artrogripes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO E PERÍODO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo de série de casos, formado por uma amostra de conveniência de pacientes com artrogripose múltipla congênita. O período do estudo foi de abril de 2016 a dezembro de 2020.

4.2 LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO

O estudo foi realizado no ambulatório público especializado em doenças neuromusculares do Serviço de Genética Médica do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (SGM-HUPES), referência para o estado da Bahia.

Os pacientes foram recebidos para avaliação inicial entre de abril de 2016 a dezembro de 2019.

4.3 SELEÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi gerada por demanda espontânea a partir de encaminhamento por fisioterapeutas, neurologistas, neuropediatras, ortopedistas e pediatras do próprio hospital e de outros serviços de referência no atendimento a pacientes com artrogripose, contactados pela pesquisadora para recrutamento de pacientes a exemplo de:

- IBR- Instituto Bahiano de Reabilitação - Salvador/Bahia;
- CEPRED- Centro Estadual de Prevenção e Reabilitação de pessoas com deficiência - Salvador/Bahia;
- Hospital Martagão Gesteira - Salvador/Bahia;
- Clínica Escola de Reabilitação da UFBA - Salvador/Bahia

Esses centros foram escolhidos baseados no perfil de atendimento populacional, incluindo portadores de deficiência e por atenderem pacientes provenientes de muitos municípios do estado da Bahia.

4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

A casuística foi formada por pacientes que concordaram em participar do estudo ou que tiveram o assentimento dos representantes legais, após a assinatura dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1), Termo de Consentimento dos Pais e/ou representantes legais (para indivíduos menores de 18 anos de idade) (Apêndice 2) e do Termo de Assentimento (para indivíduos abaixo desta faixa etária) (Apêndice 3).

Os pacientes incluídos preencheram os seguintes critérios:

- ✓ Diagnóstico clínico de AMC;
- ✓ Quadro congênito (observado desde o nascimento);
- ✓ Sem restrição de idade;
- ✓ Pacientes com AMC com ou sem abordagem ortopédica prévia das contraturas múltiplas;

4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- ✓ Contraturas isoladas
- ✓ Exposição a misoprostol na gestação ou outros agentes com efeito teratogênico
- ✓ História de trauma gestacional
- ✓ Restrição de crescimento intrauterino por anormalidades uterinas
- ✓ Pacientes que não completaram a investigação clínica ou complementar, que permitisse a classificação diagnóstica

4.6 COLETA DE DADOS

A coleta de dados foi realizada a partir da aplicação e preenchimento de uma ficha padrão (Apêndice 4), com complementação de dados obtidos em prontuário. Todos os dados foram coletados pela pesquisadora.

Os pacientes foram submetidos a uma anamnese detalhada, com atenção especial à história gestacional, ao parto, às intercorrências neonatais e história familiar. Foram solicitadas ainda, quando disponíveis, fotografias ao nascimento ou do período neonatal, para melhor caracterização das articulações envolvidas.

Realizado exame clínico e neurológico detalhado, com avaliação de marcha, coordenação e equilíbrio, força muscular, reflexos superficiais e profundos,

sensibilidades superficial e profunda e dos pares cranianos. Foram registrados achados dismórficos (sistêmicos e faciais). Os dados do exame clínico e neurológico foram registrados pela pesquisadora principal e a descrição dismorfológica, pela pesquisadora e por geneticista do SGM-HUPES.

As variáveis avaliadas foram: idade, sexo, cor autodeclarada, procedência, serviço de origem, história familiar, consanguinidade, idade materna, intercorrências gestacionais, uso de medicações ou agentes com efeitos teratogênicos, história de abortamento, intercorrências perinatais, número de articulações envolvidas, envolvimento do SNC, hipotonia, presença de outras malformações, presença de hérnias, histórico de cirurgias e/ou fraturas, exames complementares e diagnósticos etiológicos. Os pacientes considerados suspeitos de envolvimento do SNC foram pacientes que apresentavam microcefalia, atraso linguagem e sinais de envolvimento clínico do neurônio motor superior, alterações na coordenação e distúrbios do movimento.

4.7 INVESTIGAÇÃO COMPLEMENTAR

A investigação complementar foi realizada seguindo o fluxograma apresentado na Figura 1, especificamente elaborado para investigação dos pacientes de AMC nesta amostra.

Exames realizados previamente à entrada do paciente no estudo, e, portanto, fora do modelo proposto de investigação, foram validados e compilados em resultados.

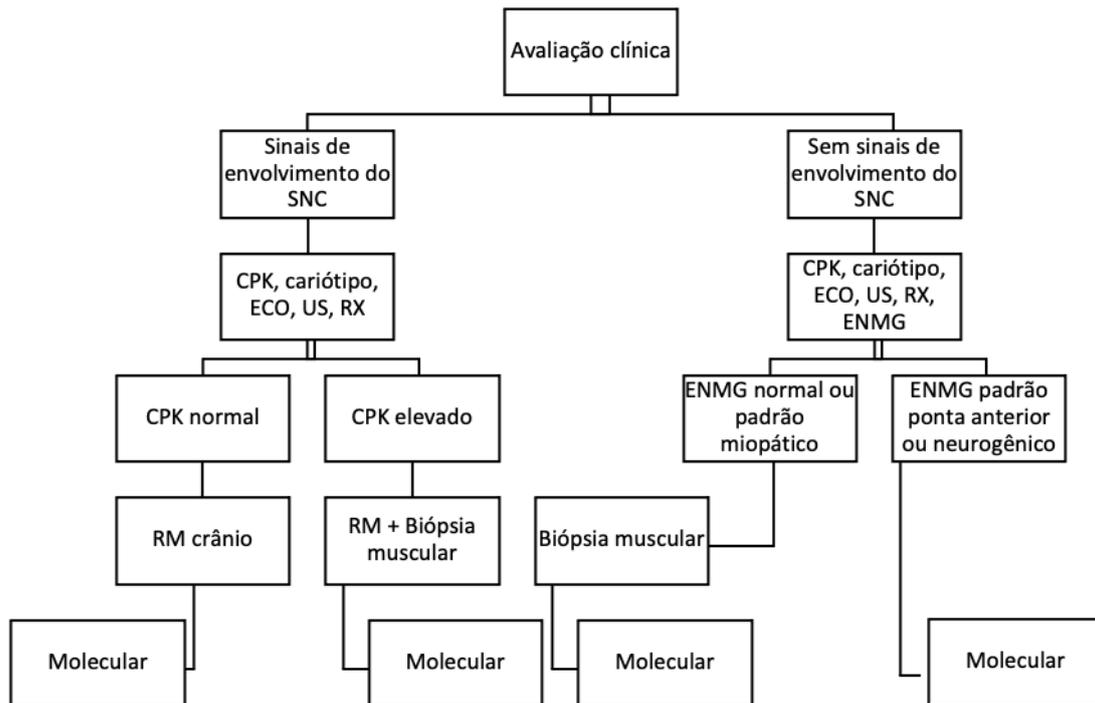


Figura 1. Fluxograma utilizado para a investigação da etiologia da artrogripose.

Dosagem de creatinofosfoquinase (CPK) solicitada em todos os pacientes avaliados, como forma de triagem para envolvimento muscular mais pronunciado. Os pacientes realizaram a dosagem desta enzima no laboratório central do HUPES ou em laboratórios externos via SUS.

O cariótipo com banda G foi solicitado para todos os pacientes e realizado no SGM-HUPES. Foram considerados, também, os exames realizados em outros laboratórios de referência. O cariótipo foi realizado em amostra de sangue periférico.

Baseado na avaliação clínica de achados de outros sistemas envolvidos, foram realizados os seguintes exames: ressonância magnética de crânio (RM) nos pacientes com suspeita de envolvimento do sistema nervoso central ou regressão neurológica (SNC); ecocardiograma transtorácico (ECO) para avaliação de malformações cardíacas e USG de abdome total, ambos solicitados nos pacientes com artrogripose proximal ou na presença de dismorfias.

Os pacientes com achados patológicos no ecocardiograma e/ou na USG foram encaminhados para médicos especialistas, cardiologistas e/ou gastroenterologistas.

Exames radiográficos das articulações envolvidas foram realizados em todos os indivíduos.

Os exames de eletroneuromiografia e biópsia de músculo para avaliação morfológica foram realizados nos pacientes sem sinais de envolvimento do sistema nervoso central ou nos que, mesmo com este envolvimento, apresentaram elevação de CPK e/ou exame clínico compatível com envolvimento associado do sistema nervoso periférico. O estudo molecular foi solicitado somente após a investigação inicial com os exames listados acima.

4.7.1 Eletroneuromiografia

A ENMG foi realizada via Sistema Único de Saúde (SUS), por neurologista habilitado, e realizada nos quatro membros com estudo de condução sensitiva, com avaliação de latência, amplitude, morfologia e velocidade de condução nos nervos medianos, ulnares, radiais, surais e fibulares superficiais. O estudo de condução motora foi realizado nos nervos medianos, ulnares, tibiais e fibulares, com avaliação de latência, amplitude, morfologia e velocidade de condução. Foram pesquisados, ainda, o reflexo H, a prova de estimulação repetitiva em baixa frequência e o estudo eletromiográfico com agulha concêntrica.

Todos os exames de ENMG foram realizados pelo mesmo examinador. Pacientes que traziam o exame no momento da avaliação, foram encaminhados para realização de nova ENMG, exceto aqueles que se recusaram a repetir o exame.

Os pacientes que apresentaram alterações consistentes com o envolvimento do neurônio motor inferior ou nervo periférico foram encaminhados para realização de estudo molecular específico para as formas de atrofia muscular espinhal ou avaliação por SNP *array* e não foram submetidos a biópsia muscular. Por outro lado, os pacientes que apresentaram padrão de decremento ou incremento motor, cujo local de lesão fosse a junção neuromuscular foram encaminhados para realização de estudo molecular por SNP *array* ou sequenciamento completo do exoma. Naqueles que a eletromiografia revelou um padrão miopático ou normal foi indicado a realização de biópsia muscular.

4.8 COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

4.8.1 Coleta do tecido muscular

As biópsias musculares foram realizadas por técnica aberta, no músculo deltoide esquerdo. A escolha dessa técnica e local está de acordo com o treinamento realizado pela pesquisadora e por se tratar de um músculo de fácil acesso e com baixo risco de complicações como sangramento e hérnia incisional (MIKELL, 2013). Os procedimentos foram realizados em ambiente estéril, na sala de pequenas cirurgias do HUPES pela pesquisadora principal. Os pacientes foram submetidos a anestesia local na pele da região deltoide esquerda com lidocaína 2% com vasoconstrictor, com retirada de cinco fragmentos de músculo de 0,5x0,5 cm cada.

Quatro destes fragmentos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer -80° C. Posteriormente, três fragmentos do tecido muscular congelados foram encaminhados para o Laboratório de Patologia Muscular do Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) para realização das colorações, de histoquímica e imunoistoquímica em colaboração com o Prof. Dr. Edmar Zanoteli. O material foi encaminhado em caixa térmica com gelo seco, transportado por empresa de biolística, para garantir a chegada do material congelado. O tecido muscular foi processado em laboratório externo pela inexistência de serviço de patologia muscular no estado da Bahia. O quarto fragmento foi mantido em freezer -80° C no LAPEM (Laboratório de Patologia Estrutural e Molecular) do Instituto Gonçalo Moniz da Fiocruz em Salvador (BA), para controle e reserva de segurança.

Um fragmento de músculo de 0,5x0,5 cm foi seccionado em três fragmentos menores e fixados, imediatamente após a retirada, na mistura de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 2,5% diluídos em cacodilato de sódio 0,1M. Em seguida foram encaminhados ao laboratório de microscopia eletrônica da Fiocruz.

Os exames de biópsia muscular previamente realizados pelos pacientes em serviços externos foram validados pela pesquisadora principal, através de contato com o serviço, com discussão dos casos clínicos e achados morfológicos.

4.8.2 Processamento do tecido muscular

Para todas as amostras congeladas e enviadas à USP, foram realizados cortes em criostato entre -20 a -23° C, com cortes entre 8-10 micra e realizadas as seguintes colorações, histoquímica e imunoistoquímica:

- Hematoxilina & eosina
- Tricrômio de Gomori modificado
- Ácido periódico de Schiff
- Oil red O
- Succinato desidrogenase
- Nicotinamida adenina dinucleotídeo
- ATPase nos pH 9.4, 4.3 e 4.6
- Fosfatases alcalina
- Fosfatase ácida
- Citocromo-C-oxidase
- Anticorpos primários: distrofinas (D1, D2, D3), merosina, disferlina, alfa-sarcoglicana, colágeno 6, gama-sarcoglicana, beta-sarcoglicana, caveolina-3

O protocolo utilizado para a imunistoquímica, com o kit Novolink™ Novocastra seguiu as recomendações do fabricante.

As lâminas foram mantidas em ar ambiente por 10 minutos, e posteriormente aplicado *Peroxidase block* por 5 minutos. Foram lavadas em solução Tris salina tamponada (TBS), pH 7.6, 2 vezes por 5 minutos. Em seguida os cortes foram encubados por 10 minutos em *Protein block*, seguido de 2 lavagens em TBS por 5 minutos. Os fragmentos de tecido foram incubados com anticorpo primário diluído em *Protein block* por 1 hora em temperatura ambiente, seguidos por 2 lavagens em TBS por 5 minutos e incubados em *Post Primary Block* por 30 minutos. Após 2 lavagens de 5 minutos cada em TBS, os fragmentos foram incubados com *polymer* por 30 minutos e lavados 2 vezes com leve agitação por 5 minutos. Em seguida os fragmentos foram tratados com diaminobenzidina (DAB) por 2 a 5 minutos. A cada 10 lâminas foram utilizados 50 µL de *DAB chromogen* em 1 ml de *DAB substrate Buffer*. As lâminas foram lavadas 2 vezes em água por 2 minutos, para bloquear o DAB. Em seguidas coradas em hematoxilina e desidratadas 3 vezes em álcool nas concentrações entre 70 e 100 % e xileno por 2 minutos cada ciclo e posteriormente montadas em meio com xileno.

4.8.3 Avaliação por microscopia óptica

Após realizado o processamento do material na USP, as lâminas foram avaliadas por três avaliadores: pelo Prof. Dr. Edmar Zanoteli, em microscópio óptico, com aumentos de 20, 40 e 100x, fotografadas e encaminhadas as imagens para avaliação pelo orientador deste trabalho, Prof. Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas e pela doutoranda no mesmo momento. As lâminas também foram posteriormente encaminhadas para avaliação em microscópio óptico multiobservador, com aumentos de 20, 40 e 100x pela equipe. A análise histológica dos casos foi realizada por dois grupos de observadores.

Em todas as colorações e histoquímica foram observados os seguintes critérios para padronização de um laudo final: tamanho da fibra muscular, variação no tamanho; proliferação de tecido conjuntivo endomisial e perimisial; localização de número de núcleos celulares, se periféricos ou centralizados; presença ou ausência de necrose, presença ou ausência de reação inflamatória, reação normal para fosfatase ácida, presença ou ausência de acúmulo de gordura e glicogênio, avaliação da arquitetura interna das fibras, preservação do padrão de mosaico pela distribuição de tipo de fibras e presença ou ausência de fibras COX- negativas.

Foram avaliados o padrão de marcação se normal e homogêneo ou ausente na imunoistoquímica das proteínas analisadas (distrofinas, merosina, disferlina, alfa-sarcoglicana, gama-sarcoglicana, beta-sarcoglicana, colágeno 6 e caveolina-3).

4.8.4 Avaliação por microscopia eletrônica

Os fragmentos de tecido muscular, após fixados, foram lavados três vezes em cacodilato de sódio 0,1M e pós-fixados na solução de tetróxido de ósmio 1% por 1h em temperatura ambiente. A seguir, os fragmentos foram lavados em cacodilato de sódio e desidratados em uma série de acetona em concentrações crescentes de 30 a 100%. Após esta etapa, foi realizada a substituição gradativa da acetona pela resina epóxi Polybed812, utilizando misturas de resina e acetona em concentrações crescentes de resina até resina pura. Ao final, os fragmentos foram incluídos em moldes com resina Polybed812 e polimerizados por 48h a 60^oC. Após a polimerização, os blocos formados foram “trimados” e cortados em secções de 1µm de espessura, aderidos em lâmina de vidro e corados com azul de metileno/Azur2.

As lâminas foram observadas pelo orientador e pela pesquisadora em microscópio multiobservador de luz em campo claro, e selecionados blocos e regiões de interesse. A escolha das regiões foi baseada em achados da microscopia óptica, em áreas com alterações estruturais do sarcolema. Foram realizados cortes ultrafinos (70 nanômetros) em navalha de diamante, em ultramicrótomo (Leica®). Os cortes ultrafinos foram colocados em grades de cobre de 200 Mesh e contrastado com citrato de chumbo e acetato de uranila. Em seguida foram observados em microscópio eletrônico de transmissão, marca JEOL, modelo JEM1230, com imagens capturadas e avaliadas posteriormente pela pesquisadora principal e seu orientador.

4.8.5 Coleta de sangue

Os pacientes foram submetidos a coleta, em veia periférica, de 10 ml de sangue em tubo com EDTA. As coletas foram realizadas por técnicos habilitados, no laboratório de genética do SGM-HUPES para realização do estudo por *SNP array*.

4.9 ESTUDO MOLECULAR

Para análise molecular, foram utilizadas as técnicas de citogenética para realização de cariótipo com Banda G, realizada no laboratório do SGM-HUPES ou em laboratórios externos quando os pacientes já traziam na consulta inicial.

Para avaliação molecular, existiram as seguintes possibilidades:

- Realização de técnica de *SNP array* realizados em pacientes cujo cariótipo teve resultado normal, com o objetivo de identificar deleções ou duplicações no genoma. Para esta análise, foram coletados 10 ml de sangue em tubo com EDTA, com posterior extração de DNA. O DNA genômico foi obtido a partir de 200µl de sangue periférico, utilizando o kit de Extração Mini Spin Plus (Biopur®), seguindo todas as recomendações do fabricante. As amostras de DNA utilizada para as análises foram quantificadas e qualificadas através de leitura em espectrofotômetro. As amostras de DNA extraído foram encaminhadas para o Laboratório Multiusuário de Sequenciamento em Larga Escala e Expressão Gênica do Departamento de Tecnologia da UNESP/Jaboticabal, sob coordenação da Prof. Dra. Eliana Gertrudes

de Macedo Lemos. Estes exames foram realizados por meio de projeto em colaboração com o pesquisador da Fiocruz, Prof. Dr. Luiz Carlos Jr. Alcântara.

A análise de microarranjos cromossômicos por SNP array foi realizada utilizando-se 250 nanogramas de DNA genômico, o qual foi fragmentado, amplificado e hibridado de acordo com a orientação do fabricante. Foi utilizado a plataforma *Cytoscan 750K* (Affymetrix®), que contém 750.000 marcadores, incluindo 200.000 marcadores SNPs, distribuídos pelo genoma humano. Os dados brutos obtidos por este sequenciamento foram encaminhados para a pesquisadora deste estudo para análise.

As CNV (variações do número de cópias) identificadas na matriz SNP foram avaliados usando os bancos de dados de variação genômica da *USCS Genome Bioinformatics* (<http://genome.ucsc.edu>); Banco de dados DGV (<http://projects.tcag.ca/variation/>); e DECIPHER (<http://decipher.sanger.ac.uk/>). As CNVs foram classificadas de acordo com os critérios do *American College of Medical Genetics and Genomics* (RIGSS et al., 2019).

A patogenicidade da CNV foi avaliada por meio da ferramenta *AnnotSV*, que compila informações regulatórias e clinicamente relevantes para a anotação e classificação das variações estruturais, considerando os genes apresentados na região deletada ou duplicada junto com os dados do DGV, dbVar, ExAC, ClinGen e bancos de dados OMIM (GEOFFROY et al., 2018)

- Sequenciamento completo do exoma completo, com análise de éxons para identificação de mutações pontuais. O sequenciamento completo do exoma foi aceito como exame molecular nos pacientes que já traziam este exame no momento da avaliação clínica e inclusão no estudo, e realizado em laboratórios de reconhecida qualidade técnica. Nestes casos, havia um cariótipo normal.

4.10 APRESENTAÇÃO DE CASOS BASEADOS NO FENÓTIPO E EM EXAMES COMPLEMENTARES

Os casos com diagnóstico estabelecidos foram agrupados, baseados nas características fenotípicas, exames complementares e topografia de lesão, e apresentados em resultados.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados compilados foram transferidos da planilha Excel e foram processados e analisados. Foram realizadas análises descritivas, utilizando-se tabelas com número absoluto (n) e frequência relativa (%) para variáveis categóricas. Para variáveis contínuas foram utilizadas média +/-, desvio padrão (DP) para as que apresentarem distribuição normal.

4.12 ASPECTOS ÉTICOS

4.12.1 Comitê de ética em pesquisa (CEP)

Este projeto obteve aprovação no CEP do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, com o CAAE de número 48551015.3.0000.0049, parecer 1.510.521 de 16 de abril de 2016, o qual foi aprovado obedecendo rigorosamente a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde que respalda as pesquisas com seres humanos associada ao desenvolvimento e engajamento ético, inerente ao progresso científico e tecnológico (Anexo 2).

4.12.2 Análise dos riscos envolvidos

Todos os indivíduos, elegíveis e acessíveis da pesquisa, foram informados clara e abertamente sobre o estudo e a sua participação nele durante um momento oportuno, em condições e local adequado, com tempo necessário para reflexão acerca da participação e com plena assistência dos pesquisadores. Nos pacientes menores de idade ou incapazes de tomar decisões, os responsáveis assumiram este papel e passaram pelo mesmo processo de informação. Após o entendimento e concordância em participação do projeto, o indivíduo ou o responsável por ele assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e/ou Termo de Consentimento dos Pais/Responsáveis e/ou do Termo de Assentimento, se menores de idade. Ver apêndices 1-3.

Os riscos envolvidos para os participantes foram os relacionados a coleta de sangue e tecido muscular, com explicação pelo pesquisador no momento da coleta dos dados, com riscos de pequenos hematomas locais e infecção local, de rara

ocorrência, que apresentam baixa gravidade e manejados pelo profissional médico. Foi assegurado para o paciente e/ou responsável a privacidade e sigilo das informações fornecidas durante todas as fases da pesquisa, a fim de conservar o conforto do paciente ao longo do estudo.

O presente protocolo de pesquisa foi realizado seguindo fielmente as instruções dos guias de Boas Práticas Laboratoriais (BPL), dessa forma reduzindo ao máximo as possibilidades de risco durante o processamento do tecido biopsiado e os ensaios imunoistoquímicos.

5 RESULTADOS

5.1 AMOSTRA

Foram encaminhados para avaliação 53 pacientes com sinais clínicos de artrogripose. Foram excluídos doze participantes por preencherem os seguintes critérios de exclusão: nove pacientes por perda de seguimento, com ausência de dados clínicos e/ou de exames complementares que permitissem uma caracterização clínica; duas participantes, gêmeas, com camptodactilia como única manifestação e uma com pé torto isolado. A pesquisadora realizou contato telefônico sem sucesso com os participantes que perderam seguimento. Um paciente foi a óbito após a segunda consulta.

A amostra foi representada por 41 participantes com dados clínicos e de exames complementares. Os participantes foram procedentes de vinte cidades de diversas regiões do estado a saber: 17 pacientes de Salvador, três de Feira de Santana, dois de Salgueiro, Monte Santo e Jacobina, e um paciente das cidades de Alagoinhas, Barrocas, Campo Formoso, Dias D'Ávila, Irecê, Itiúba, Jaguaripe, Jaguaquara, Juazeiro, Oliveira dos Brejinhos, Valente, Lauro de Freitas, Simões Filho, Mundo Novo e Caldeirão. Os dados da procedência estão apresentados na tabela 3 e divididos por microrregiões na figura 2.

Tabela 3. Procedência dos pacientes com AMC em serviço público especializado em doenças neuromusculares do SGM-HUPES, 2016-2019

Procedência	n	%
Salvador	17	41,5
Feira de Santana	3	7,3
Jacobina	2	4,9
Monte Santo	2	4,9
Salgueiro	2	4,9
Alagoinhas	1	2,4
Barrocas	1	2,4
Caldeirão Grande	1	2,4
Campo Formoso	1	2,4
Dias D'Ávila	1	2,4
Irecê	1	2,4
Itiúba	1	2,4
Jaguaripe	1	2,4
Jaguaquara	1	2,4
Juazeiro	1	2,4
Lauro de Freitas	1	2,4
Mundo Novo	1	2,4
Oliveira dos Brejinhos	1	2,4
Simões Filho	1	2,4
Valente	1	2,4
Total	41	100

Total de municípios:20

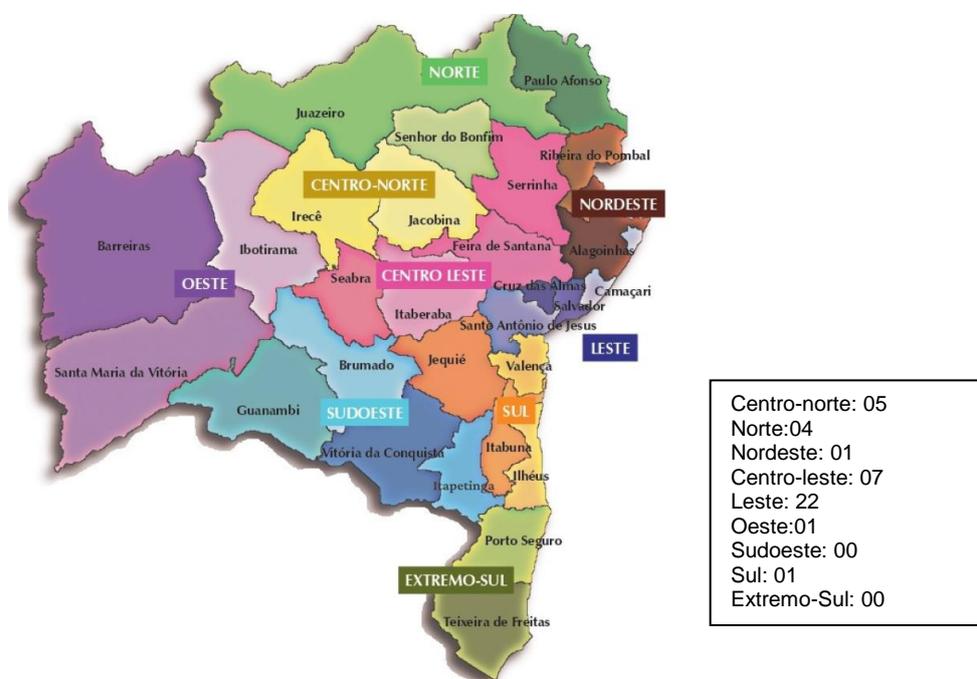


Figura 2. Mapa de distribuição de procedência dos pacientes por mesorregiões da Bahia
 Fonte: adaptado de Plano Diretor de Regionalização, Secretaria de Saúde do Estado da Bahia, Sesab, de 14/09/2020.

A ortopedia foi a especialidade que mais encaminhou os casos para avaliação (12), seguida pela genética (9), fisioterapia (7), neuropediatra (6), pediatra (4) e cardiologia (1). Dois participantes não recordavam a origem do encaminhamento. O percentual de cada especialidade responsável pelo encaminhamento dos pacientes está representado na Figura 3.

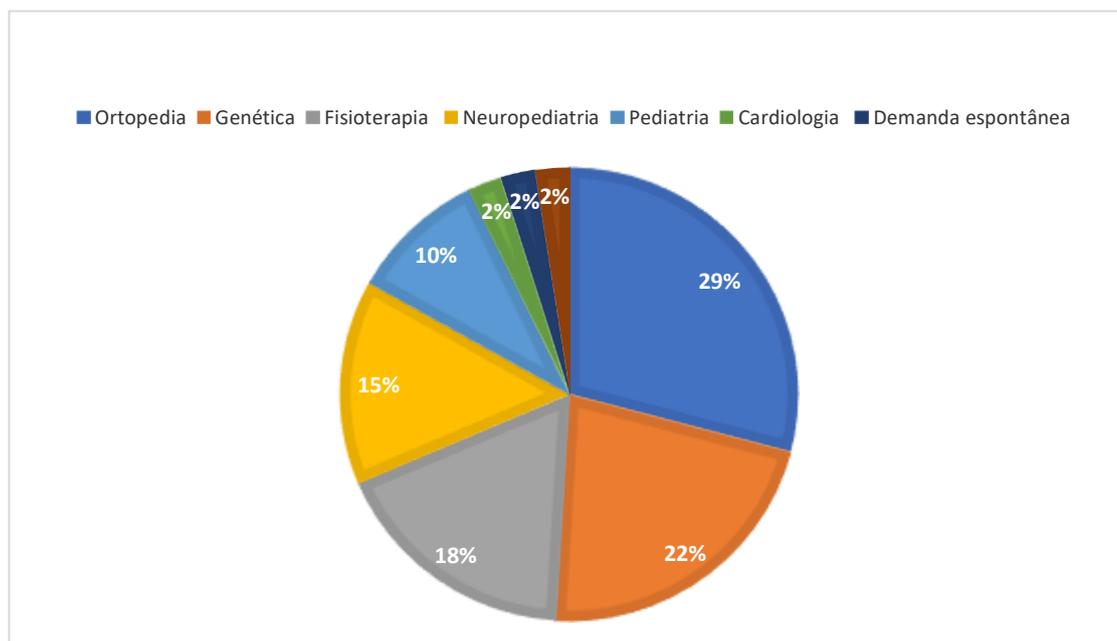


Figura 3. Gráfico de distribuição percentual das especialidades de encaminhamento dos pacientes

5.2 DADOS DEMOGRÁFICOS

Os dados demográficos estão listados de forma resumida na tabela 4 e listados com detalhe na tabela 2 do apêndice 5.

Houve predomínio de pacientes do sexo feminino (53,7%), com média de idade calculada em anos de 8,80 ($\pm 12,33$), mediana de 4,12, com idades variando entre 0,18 (65 dias de vida) a 49 anos. A idade foi calculada pela diferença entre a data da primeira consulta e a data de nascimento, dividido por 365,25, pois existiam pacientes com mais de 4 anos de idade. Portanto, levou-se em consideração os anos bissextos. Dezoito pacientes se declararam pardos, dezessete brancos e seis negros.

Tabela 4. Dados demográficos: idade, sexo, cor/raça dos pacientes com AMC assistidos em serviço público especializado em doenças neuromusculares do SGM-HUPES, 2016-2019

Média de idade*		8,80±12,33
Sexo		
Feminino		22 (53,7%)
Masculino		19 (46,3%)
Cor	Pardo	18 (43,9%)
	Branco	17 (41,5%)
	Negro	6 (14,6%)

*idade em anos; n=41

5.3 CONSANGUINIDADE E HISTÓRIA FAMILIAR

Não havia história de consanguinidade em 37 pacientes (90,2% da amostra). Três pacientes tinham pais primos em primeiro grau e um paciente não tinha essa informação, por ter sido adotado. Havia história familiar de AMC, contratura congênita isolada ou hipotonia muscular em doze pacientes (29,3%), sendo um par de gêmeas. Três pacientes tiveram irmãos com quadro semelhante, mais graves, com envolvimento respiratório e óbito precoce, com consanguinidade em uma destas famílias (pais primos em primeiro grau).

Um paciente apresentava primo em primeiro grau com fenótipo semelhante e um outro com diagnóstico semelhante no avô paterno. Dois pacientes tinham um dos pais com hipotonia e atraso no desenvolvimento motor e em quatro casos havia história de contraturas articulares isoladas em parentes de primeiro e terceiro grau. Tabela 5.

Tabela 5. Consanguinidade e história familiar dos pacientes com AMC assistidos em serviço público especializado em doenças neuromusculares do SGM-HUPES, 2016-2019

	N	%
Consanguinidade		
Não	37	90,2
Sim	3	7,3
História familiar		
Não	27	65,9%
Sim	13	31,7
Total*	40	

*havia uma paciente adotada, sem estas informações

5.4 ANTECEDENTES GESTACIONAIS E NEONATAIS

Os dados gestacionais, como idade materna no momento do parto, idade gestacional, tipo de parto, intercorrências gestacionais e perinatais, uso de medicações e teratógenos, abortamento prévio, realização de sorologias e peso ao nascer, estão disponíveis na tabela 6. Uma paciente adotada, que havia sido abandonada em via pública, não tinha informações sobre gestação.

A média de idade das mães no momento do parto foi de $26,1 \pm 6,36$ anos, com mediana de 25 e moda de dezenove anos, com idades entre 16 e 37 anos. Trinta e sete gestações (94,8%) foram a termo (com idade gestacional entre 37 e 41 semanas). Duas gestações foram a pré-termo (30 e 35 semanas) e esta informação não foi possível em dois pacientes (um não se recordava e um por adoção). Quanto ao tipo de parto, 53,7% foram cesarianos (22 pacientes) e 43,9% (18 pacientes) vaginais. Um parto vaginal necessitou de auxílio de fórceps. Tabela 6

Tabela 6. Dados maternos referente aos pacientes com AMC assistidos em serviço público especializado em doenças neuromusculares do SGM-HUPES, 2016-2019

Idade materna	26,1 ± 6,36 anos	
Idade gestacional	n	%
37-41 semanas	37	94,8
<37 semanas	2	5,1
Não soube informar	2	4,8
Tipo de parto		
Cesariano	22	53,7
Vaginal	18	43,9
Não soube informar	1	2,4
Intercorrências durante a gravidez		
Sim	15	37,5
Não	24	58,5
Não soube informar	1	2,4
Movimentos fetais		
Presentes	26	63,4
Não presentes	12	29,3
Não soube informar	2	4,9
USG alterado		
Sim	13	31,7
Não	27	65,9
Não soube informar	1	2,4
Aborto prévio		
Sim	12	29,3
Não	28	68,3
Não soube informar	1	2,4
Uso de medicação		
Sim	7	17,1
Não	32	78,0
Não soube informar	2	4,8
Uso de álcool		
Sim	6	14,3
Não	33	80,5
Não soube informar	1	2,4
Uso de drogas		
Sim	0	0,0
Não	39	95,1
Não soube informar	1	2,4
Baixo peso ao nascer		
Sim	12	29,2
Não	20	48,7
Não soube informar	9	21,9
Hérnia inguinal/umbilical		
Sim	12	29,3
Não	29	70,7
Total		41 pacientes

*idade expressa em anos. Idade gestacional expressa em semanas

Infecção de trato urinário foi a intercorrência gestacional mais relatada, descrita em oito gestações, como evento único, seguido por sangramento em cinco, perda de líquido amniótico em dois, diabetes gestacional no último trimestre em dois, doença exantemática com febre e diagnóstico de infecção aguda por *Zika virus* em duas gestações e hipotireoidismo na única gestação gemelar desta amostra. Não havia informações sobre intercorrências em uma paciente adotada. O número total de gestações com intercorrências foi 15 (37,5% das gestações).

Exceto o caso de adoção, no qual não se obteve a informação, em todos os pacientes foi realizada USG obstétrica e, encontradas alterações em 13 (31,7%). A limitação de mobilidade articular foi observada em onze pacientes, possibilitando o diagnóstico pré-natal de artrogripose. Um dos exames revelou aumento de translucência nucal e em outro foi observado restrição de crescimento intrauterino.

História de abortamento prévio, todos descritos como espontâneos, foi relatado por 12 mães (29,3%). Não havia história de morte perinatal.

O pré-natal foi realizado em 39 pacientes, com relato de realização de sorologias para infecções congênitas (sífilis, toxoplasmose, hepatite, rubéola) e HIV em todos os pacientes. Um paciente relatou não realização de pré-natal e havia uma criança adotada, sem dados disponíveis. Em três pacientes, sorologias para *Zika virus* (IGG e IGM) estavam positivas: duas crianças com microcefalia e artrogripose e uma criança com artrogripose em 4 membros.

Quando questionadas sobre uso de medicações na gestação, havia sete (17,1% dos casos) com história de uso de medicações a saber: antibióticos, levotiroxina sódica e metformina. Não havia relato de uso de drogas ilícitas, com informação perdida em dois casos. O uso de álcool durante a gravidez foi relatado em seis casos (14,6%), todos no primeiro trimestre de gestação.

Informações sobre peso ao nascimento foram obtidas de 32 pacientes. A média de peso ao nascimento foi de 2716 ± 623 gramas, com pesos entre 1700 e 3750 gramas. Destas crianças com registro de peso ao nascer, doze tiveram baixo peso (abaixo de 2500 gramas). Intercorrências gestacionais, como dificuldade à sucção, necessidade de suporte ventilatório e icterícia foram relatados em nove pacientes. Gastrostomia foi realizada em quatro pacientes por disfagia grave no período neonatal. Traqueostomia foi realizada em dois pacientes por insuficiência respiratória no período neonatal.

Hérnias umbilical e/ou inguinal foram reportadas em doze casos (29,3%). História de fratura neonatal em um dos pacientes, com relato de fratura de fêmur ao nascimento. Quatro pacientes realizaram cirurgias no período neonatal, gastrostomia e traqueostomia. Nenhum paciente teve abordagem cirúrgica para correção de limitação articular no período neonatal.

5.5 HISTÓRIA CLÍNICA

Os pacientes foram avaliados em suas consultas de retorno quanto aos principais marcos do neurodesenvolvimento, quando crianças, ou questionados sobre idade dos marcos para os que já haviam atingido a habilidade em se sentar sem apoio, andar sem apoio e falar (primeiras palavras). Em dois pacientes essa informação foi perdida pois não se recordavam da idade que atingiram os marcos do desenvolvimento. (Tabela 7).

Tabela 7. Idade da aquisição de marcos do neurodesenvolvimento dos pacientes com AMC assistidos em serviço público especializado em doenças neuromusculares do SGM-HUPES, 2016-2019

	Sentar-se sem apoio	Andar sem apoio	Fala
	n (%)	n (%)	n (%)
Sim	36 (87)	23 (56,1)	33 (80)
Não	3 (7,3)	17 (41,5)	7(17)
Média	12,25±14,1	31,7±21,8	12,91±7,4
Mínimo	5	13	7
Máximo	84	84	36
Omisso**	2 (4,8)	1(2,4)	1(2,4)
Total	41	41	41

* Idade em meses **Pacientes não recordavam a aquisição destes marcos.

Dentre os pacientes em que foi obtida a informação do marco sentar-se sem apoio, 36/38 (87%), o fizeram em uma média de 12,25±14,1 meses. A idade mínima foi de 5 meses e a máxima de 84 meses. Em quatorze pacientes houve atraso na aquisição desta habilidade (idade superior a 9 meses). Os três pacientes que não

adquiriram a capacidade de se sentar tinham envolvimento do sistema nervoso central.

Em relação a andar sem apoio, 22/23 (53,6%) pacientes alcançaram este marco com média de $31,70 \pm 21,8$ meses, com mínimo de 13 e máximo de 84 meses. Houve atraso nesta aquisição em dezoito pacientes, ocorrendo após os 15 meses. Na amostra, dezessete pacientes (41,5%) não andaram de forma independente até a última consulta e todos os pacientes tinham idade superior à definida como máxima para aquisição desta habilidade (15 meses).

A fala não foi expressa em 7 pacientes, dois deles em uso de traqueostomia; A média de idade em que houve registro de primeiras palavras foi de $12,91 \pm 7,4$, com idade mínima de 7 meses e máxima de 36 meses.

A maioria dos pacientes (65,8%) nesta casuística foi submetido a um procedimento cirúrgico (27 pacientes) sendo os mais frequentes as cirurgias ortopédicas para correção das contraturas articulares e correção de hérnia umbilical e inguinal; em 14 pacientes não havia história de cirurgia. O número de procedimentos variou entre 1 e 11 (Tabela 8).

Tabela 8. Cirurgias realizadas previamente ou durante o período de estudo nos pacientes com AMC assistidos em serviço público especializado em doenças neuromusculares do SGM-HUPES, 2016-2019

	N	%
Sim	27	65,8
Não	14	34,1
Correção de pé torto	12	29,6
Outras cirurgias ortopédicas	5	12,1
Gastrostomia	4	9,7
Traqueostomia	2	4,8
Implante de desfibrilador	1	2,4

Total amostra: 41 pacientes

Fratura foi uma complicação pouco frequente, relatada em quatro pacientes (9,8%), sem necessidade de abordagem cirúrgica. Um dos casos de fratura ocorreu ao nascimento. Nos demais pacientes, a fratura foi em decorrência de trauma físico (queda em dois e acidente automobilístico em um paciente).

Quatro pacientes evoluíram com progressiva redução de suas capacidades vitais forçadas, com necessidade de uso de ventilação não invasiva em três deles e em um, terapia com empilhamento de ar e expansão pulmonar. Três destes pacientes tiveram diagnóstico confirmado de miopatia. Uma paciente em uso de ventilação não invasiva apresentava um fenótipo de pterígios múltiplos.

Foram registrados dois óbitos no período do estudo: um paciente do sexo masculino, com distrofia muscular congênita e com envolvimento respiratório, com óbito por sepse secundária a pneumonia aspirativa aos 26 meses de idade. Outro paciente, sexo masculino, 22 anos, com morte súbita, com histórico de miocardiopatia e distúrbio de ritmo cardíaco, com diagnóstico clínico e histológico de miopatia.

5.6 EXAME FÍSICO

Os principais achados do exame físico estão descritos na tabela 9.

A média de articulações envolvidas foi de 6,5 com um mínimo de três e máximo de 14 articulações. O pé torto congênito foi o sinal mais comum observado, presente em 35 pacientes (85,4%), seguido por camptodactilia em 68,3% (28 pacientes). Contraturas articulares, tanto em flexão quanto em extensão dos joelhos, estiveram presentes em 27 pacientes (65,9%). Quando em conjunto as articulações de quadril e pés foram as mais frequentemente envolvidas.

Escoliose foi observada em 16 pacientes (41,5% da amostra), e em onze deles, era uma forma congênita. Os cinco pacientes que desenvolveram escoliose posterior ao nascimento, apresentavam hipotonia associada. Tabela 9.

Em dez pacientes (24,4% da amostra) foi observada a presença de fossetas em articulações envolvidas. Dos pacientes que apresentavam esse sinal clínico, nove deles tinha artrogripose em articulações proximais e distais e uma paciente com contraturas articulares apenas em membros inferiores. Tabela 9.

Hipotonia axial e/ou apendicular foi observada em dezessete pacientes (41,5% da amostra). A hipotonia foi observada ao nascimento nos dezessete pacientes e em onze deles a hipotonia estava presente durante o período de seguimento. (Tabela 9).

A maioria dos pacientes (58,5%) apresentava dismorfias faciais, com o palato alto e estreito como o mais frequente, seguido por face alongada, implantação baixa

de orelhas e retrognatia. Quatro pacientes apresentavam alterações morfológicas que associadas ao padrão de envolvimento articular, permitiram diagnóstico clínico de: síndrome de aracnodactilia contratural congênita (Síndrome de Beals) em dois pacientes, artrogripose distal tipo 2A (Síndrome de Freeman-Sheldon) em um paciente, síndrome do pterígio múltiplo (síndrome de Escobar) em um paciente e Ehlers-Danlos tipo musculocontractural em outro paciente.

Dentre os casos com microcefalia, dois pacientes receberam o diagnóstico de embriopatia pelo *Zika virus*. Os outros dois pacientes não tiveram diagnóstico etiológico estabelecido.

Pterígio foi um sinal observado em uma pequena proporção de pacientes, com um caso de pterígio múltiplo. Nos demais casos havia pterígio em regiões cervical e axilar como mais frequentes.

Tabela 9. Achados no exame clínico em pacientes com AMC assistidos em serviço público especializado em doenças neuromusculares do SGM-HUPES, 2016-2019 (continua)

Variáveis Clínicas	n	n (%)
Número de articulações		
3	2	4,9
4	14	34,1
5	1	2,4
6	5	12,2
7	2	4,9
8	7	17,1
10	8	19,5
12	1	2,4
14	1	2,4
Alterações cognitivas		
Sim	10	24,4
Não	31	75,6
Camptodactilia		
Sim	28	68,3
Não	13	31,7
Contraturas em cotovelos		
Sim	18	43,9
Não	23	56,1
Contraturas em joelhos		
Sim	27	65,9
Não	14	34,1
Contraturas em punhos		
Sim	15	36,5
Não	26	63,4
Disfagia		
Sim	8	19,5
Não	33	80,5
Dismorfias faciais		
Sim	24	58,5
Não	17	41,5
Escoliose		
Sim	17	41,5
Não	24	58,5
Fossetas		
Sim	10	24,4
Não	31	75,6

Tabela 9. Achados no exame clínico em pacientes com AMC assistidos em serviço público especializado em doenças neuromusculares do SGM-HUPES, 2016-2019 (conclusão)

Hipotonia	17	41,5
Sim	24	58,5
Não		
Luxação de quadril		
Sim	26	63,4
Não	15	36,6
Microcefalia		
Sim	4	9,8
Não	37	90,2
Palato alto		
Sim	26	63,4
Não	15	36,6
Pé torto		
Sim	35	85,4
Não	6	14,6
Pterígio		
Sim	7	17,1
Não	34	82,9

5.7 EXAMES COMPLEMENTARES

Os dados referentes aos exames complementares realizados estão sumarizados na tabela 10.

Tabela 10. Exames complementares e resultados em indivíduos assistidos em serviço público especializado em doenças neuromusculares do SGM-HUPES, 2016-2020

	Normal (%)	Alterado (%)	Total realizado (%)
Biópsia muscular	7 (17)	17 (41,4)	24 (58,5)
Cariótipo	41 (100)	0	41 (100)
CPK	36 (87,8)	3 (7,3)	39 (95,1)
ECO	32 (78)	8 (19,5)	40 (97,5)
ENMG	19 (54,2)	16 (45,7)	35 (85,3)
Exoma	0	4	4 (9,75)
RM de crânio	13 (65)	7 (35)	20 (48,7)
RX coluna total	25 (60,9)	16 (39,1)	41 (100)
SNP array	7 (41,2)	10 (58,8)	17 (41,4)
US de abdome	36 (87,8)	4 (9,7)	40 (97,5)

CPK: creatinofosfoquinase; ECO: ecocardiograma; ENMG: eletroneuromiografia; Exoma: sequenciamento completo do exoma; US: ultrassonografia; RM: ressonância magnética de crânio. Total amostra: 41 pacientes

5.7.1 CPK

A dosagem de CPK foi realizada em 39 pacientes, com valores no intervalo de normalidade em 36 pacientes (87,8%) e elevada em três pacientes (7,3% da amostra, com os valores 298, 1430 e 3492 U/L), sugestiva de envolvimento muscular. Um paciente não tinha registro do resultado, apesar de solicitado, pois houve perda de seguimento após a terceira consulta. Uma paciente teve resultado de CK-fração MB, não CK total, solicitado novo exame, mas com recusa da mãe em realizá-lo por dificuldade de acesso venoso da menor.

5.7.2 ENMG

Trinta e cinco pacientes realizaram eletroneuromiografia. Três exames foram realizados por outros examinadores, com laudos normais, e foram revalidados quanto aos resultados pois os pacientes se recusaram a repetir o exame. Os exames estavam normais em outros 19 pacientes quanto aos parâmetros avaliados. Padrão miopático foi encontrado em 50% dos exames anormais (oito pacientes), seguidos por lesões neurogênicas em cinco pacientes. Polineuropatia motora foi vista em uma paciente, uma paciente tinha um padrão de ponta anterior em outro

paciente havia uma síndrome do túnel do carpo bilateral como único achado. A prova de estimulação repetitiva foi normal em todos os pacientes (Tabelas 10 e 11).

Tabela 11. Principais topografias de lesão pela ENMG de pacientes com AMC em indivíduos assistidos em serviço público especializado em doenças neuromusculares do SGM-HUPES, 2016-2019

	N	%
Músculo	8	50
Redução de unidades motoras*	5	31,3
Nervo periférico	2	12,5
Ponta anterior	1	6,2
Junção neuromuscular	0	0
Total	16	100

*Redução de unidades motoras podem ser observados em lesões do neurônio motor superior, inferior ou atrofia muscular por desuso

5.7.3 Ecocardiograma

Ecocardiograma transtorácico foi realizado em 40 pacientes. Não há informação em um paciente pois houve perda de seguimento após terceira consulta. Este exame foi normal em 32 pacientes e a alteração mais frequente foi de forame oval patente nos oito pacientes em que o ecocardiograma estava alterado. Todos os pacientes com exame alterado foram encaminhados para avaliação cardiológica e em apenas um deles, foi necessária intervenção – um paciente com miocardiopatia hipertrófica, que desenvolveu arritmia e precisou de implante de desfibrilador. Não havia registro de resultado em um paciente, apesar de solicitado, pois houve perda de seguimento após terceira consulta. Tabela 10.

5.7.4 Cariótipo

O cariótipo com banda G foi realizado em 100% da amostra, sendo o resultado normal em sua totalidade (Tabela 10).

5.7.5 USG de abdome total

Este exame foi realizado por 40 pacientes. Em 36 pacientes não foram encontradas anormalidades e quatro pacientes foram anormais. Três pacientes apresentavam sinais de hidronefrose unilateral e uma paciente tinha mal formação ureteral (Tabela 10).

5.7.6 Radiografia de articulações envolvidas

Radiografias das articulações envolvidas foram realizadas nos 41 pacientes. Não foram encontradas alterações sugestivas de malformações ósseas ou displasias esqueléticas. Radiografias de coluna foram realizadas em todos os pacientes, com escoliose em quinze pacientes e um apresentava cifose (Tabela 10).

5.7.7 Ressonância magnética de crânio

O exame de ressonância magnética de crânio foi realizado em 20 pacientes. Todavia, deve-se ressaltar que em onze pacientes este exame não teve indicação de realização pelo protocolo proposto, e foram realizados previamente à inclusão no estudo. Destes onze exames, três mostravam uma alteração, dois deles com desmielinização periventricular bilateral, compatível com o diagnóstico de distrofia muscular congênita merosina negativa. O resultado alterado visto no terceiro paciente foi uma dificuldade em visualização do VI nervo craniano à esquerda. Os outros quatro pacientes com exames anormais tinham sinais clínicos de comprometimento do SNC. Vinte e um pacientes não realizaram o exame, dois deles com diagnóstico de infecção congênita pelo *Zika virus* (realizaram tomografia de crânio) e um paciente por não conseguir realizar o exame com sedação no sistema único de saúde (SUS). Os demais exames não realizados (18 pacientes), não foram solicitados pois os pacientes não apresentavam sinais clínicos sugestivos de envolvimento do SNC. (Tabela 10).

A tabela 12 descreve os achados de RM de crânio em pacientes com sinais clínicos de envolvimento do SNC: pobre contato com o meio, atraso de fala e linguagem, deficiência intelectual e história de crise convulsiva.

Dois pacientes (pacientes n.16 e 36) com clínica consistente com miopatia, sem sinais clínicos de envolvimento do SNC, realizaram RM de crânio previamente à entrada no estudo, com a presença de hipoatenuação de substância branca

periventricular, compatíveis com distrofia muscular congênita merosina negativa nos dois pacientes, confirmados posteriormente por biópsia muscular.

Tabela 12. Principais achados de RM de crânio em pacientes com envolvimento clínico do SNC, 2016-2019

Paciente	Envolvimento SNC	Número de articulações envolvidas	RM de crânio
13	Atraso de linguagem (36 meses)	8	Macro cisterna Magna
14	Sem aquisição de linguagem aos 9 anos e epilepsia	10	Dilatação do sistema ventricular supratentorial, acentuada redução volumétrica do parênquima encefálico supratentorial direita, com aparente simplificação giral e sinais de disgenesia de corpo caloso
22	Dificuldade no aprendizado	8	VI nervo craniano de difícil caracterização. Córtex cerebral normal
33	Atraso de linguagem (36 meses) e dificuldade no aprendizado	4	displasia cortical focal /polimicrogiria nas regiões perissilvianas, bilateralmente
34	Dificuldade no aprendizado	8	Macro cisterna magna com agenesia de hemisférios e do <i>vermis</i> cerebelar

5.7.8 Biópsia muscular

A biópsia muscular foi realizada em 24 de 41 pacientes (58,5% da amostra). Vinte e três exames foram colhidos pela pesquisadora principal, exceto um exame, que foi realizado na Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), dois anos antes da inclusão do paciente neste estudo. O

resultado do exame foi o definidor do diagnóstico e o resultado foi conferido pela pesquisadora por contato telefônico com o serviço de patologia da UNIFESP.

Os motivos de não realização do exame nos 17 pacientes foram: recusa em onze pacientes, cinco por alteração do SNC ou nervo, observados no exame clínico ou na eletroneuromiografia e um paciente por perda de seguimento após terceira consulta. Das biópsias não realizadas por recusa, três foram por ter resultado do sequenciamento completo do exoma prévio no momento da entrada neste estudo. Quatro pacientes recusaram a coleta no período da pandemia pelo COVID19, por precaução ao contágio. Duas crianças se recusaram a realizar o procedimento, apesar do consentimento dos pais. A mãe de uma das crianças recusou coleta por risco de cicatriz hipertrófica e de difícil cicatrização no paciente com suspeita de Ehlers-Danlos. Outra mãe recusou o procedimento por ser invasivo.

Sete pacientes (17% da amostra) tiveram resultados normais na histologia e imunohistoquímica, além da microscopia eletrônica. Alterações histológicas foram observadas em 17 pacientes (41,4% da amostra). Os principais achados histológicos, baseados na microscopia óptica foram agrupados nas categorias neurogênico, miopático, indeterminado e normal. Tabelas 13 e 14. Na figura 4 estão apresentados histologia de dois pacientes.

Tabela 13. Categorias histológicas em 24 biópsias de músculo de pacientes com AMC assistidos em serviço público especializado em doenças neuromusculares do SGM-HUPES, 2016-2019

	N	%
Miopático	8	33,3
Necrose, regeneração, fibrose, fibras atroficas, arredondadas, variação no calibre de fibras, alterações estruturais, histoquímicas e imunoistoquímicas específicas		
Normal	7	29,1
Indeterminado	6	20,8
variação leve no calibre de fibras, fibrose, substituição por tecido adiposo ou escassez de tecido muscular, predomínio de fibras tipo 1		
Neurogênico	3	16,6
Presença de fibras atroficas, isoladas ou em grupo, com ou sem atrofia fascicular, ou atrofia com grupamento de tipos de fibras, na ausência de achados miopáticos		
Total biópsias realizadas	24	(58,5%)

Tabela 14. Principais achados histológicos, na microscopia convencional e eletrônica de pacientes com AMC assistidos em serviço público especializado em doenças neuromusculares do SGM-HUPES, 2016-2019

Paciente	Achados histológicos	Achados na ME	Diagnóstico
16	Moderada variabilidade no calibre das fibras com moderado aumento do tecido conjuntivo endomisial e perimisial. Discreto aumento da centralização nuclear, e discreto aumento da atividade das fosfatase ácida. Alterações difusas na arquitetura interna das fibras, com padrão em mosaico preservado. Redução da marcação pela merosina	Normal	Distrofia muscular congênita merosina negativa
36	Moderada variabilidade no calibre das fibras com marcado aumento do tecido conjuntivo endomisial e perimisial. Ausência de marcação pela merosina	Normal	Distrofia muscular congênita merosina negativa
8	Moderada variação no tamanho das fibras com predomínio de fibras do tipo I em mais de 90% das fibras com atrofia de fibras do tipo I	Normal	Desproporção congênita de tipo de fibras
31	Moderada variação no tamanho das fibras com predomínio de fibras do tipo I em mais de 90% das fibras com atrofia de fibras do tipo I	Normal	Desproporção congênita de tipo de fibras
6	Variação discreta no calibre de fibras, com agregados intracitoplasmáticos em algumas fibras	Desorganização de miofibrilas com agregados de glicogênio	Miopatia com agregados de glicogênio
9	Moderada variabilidade no tamanho das fibras, discreto aumento do tecido conjuntivo endomisial e perimisial, acentuado aumento da centralização nuclear, e discreto aumento da atividade das fosfatase ácida. Alterações difusas da arquitetura interna das fibras (falhas focais), ausência de fibras COX-negativas.	Normal	Miopatia com características distróficas
25	Variação discreta no calibre de fibras. Agregados intracitoplasmáticos inespecíficos com aumento de fosfatase ácida	Normal	Miopatia inespecífica com agregados intracitoplasmáticos
15	Presença de discretas alterações da arquitetura interna das fibras (presença de multi minicores) em fibras do tipo 1	Normal	Miopatia com minicores

Total de pacientes: 08

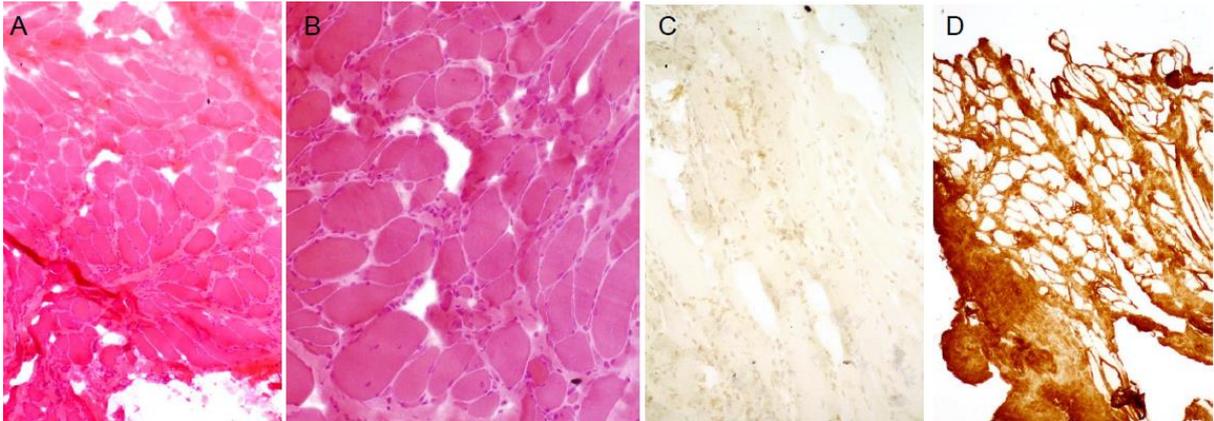


Figura 4. Biópsia de tecido muscular de paciente com distrofia muscular merosina negativa. A e B: variação no calibre de fibras, com centralização nuclear e aumento de tecido conjuntivo (H&E, aumento 20x e 40x, respectivamente). Em C, imunistoquímica com marcação negativa para merosina (20x) e em D, imuno marcação positiva para colágeno VI (40x).

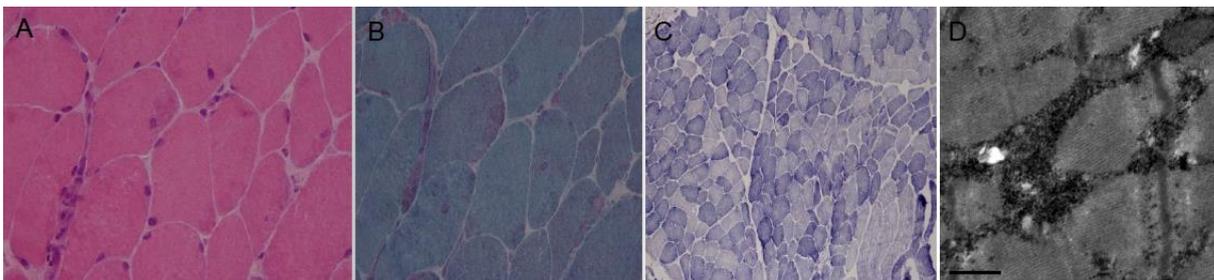


Figura 5. Biópsia de tecido muscular revelando agregados intracitoplasmáticos vistos na periferia da fibra muscular. Em A (H&E,40x) e B (Gomori,40x). Na fotomicrografia C, SDH (40x) com mosaico preservado e sem alterações na arquitetura interna das fibras musculares. Em D, observa-se acúmulo de material eletrodense sugestivo de glicogênio pela eletron-micrografia

5.7.9 SNP array

Foram realizados SNP array de 17 pacientes e 29 genitores. Dez pacientes tiveram o resultado anormal. Destes, foram observadas variantes provavelmente patogênicas (oito variantes) e variantes de significado incerto (5 variantes). Três pacientes apresentavam mais que uma variante. Dos 17 pacientes que realizaram o exame, em apenas um o fenótipo foi compatível com a alteração encontrada. A tabela 15 mostra os resultados dos dez pacientes, o tamanho da deleção, a classificação de patogenicidade, fenótipo associado a variante e correlação com a clínica.

Tabela 15. Resultados do SNP *array*, classificação de patogenicidade e fenótipo de dez pacientes assistidos em serviço público especializado em doenças neuromusculares do SGM-HUPES, 2016-2019

Paciente	CNV: arr[GRCh37]	Tamanho	Classificação	Fenótipo associado	Correlação clínica
26	1p34.3(36563467-36565617)x0	2Kb	VUS	Gene <i>COL8A2</i> exon 2 AD	Não
20	2p13.2(71,838,463-71,839,898)x0	1,4Kb	PP	Gene <i>DYSF</i> exons 35-39 AR	Não
21	19q13.42 (55,653,283-55,665,410)x0	12Kb	PP	Gene <i>TNNT1</i> exons 2-6 AR	Não
33	16q24.3(89,623,304-89,623,408)x0	105Pb	VUS	Gene <i>SPG7</i> exon 5 AR	Não
14	1q41(214,816,198-214,816,263)x0	66Pb	VUS	Gene <i>CENPF</i> exon 12 AR	Sim *
	10q23.1(85,976,965-85,981,812)x0	4Kb	VUS	Gene <i>CDHR1</i> exon 17 AR	Não
13	7q21.1(92,199,201-92,244,486)x0	45Kb	VUS	Gene <i>CDK6</i> exon 8/8 AR	Não
28	1q24.1(165,697,325-165,769,653)x1	72Kb	PP	Gene <i>TMCO1</i> exon 1-6/7 AR	Não
	17q21.1(40,695,370-40,695,946)x0	577Pb	PP	Gene <i>NAGLU</i> exon 6 AR	Não
40	4q35.1(186,335,007-186,381,382)x1	46Kb	PP	Gene <i>UFSP2</i> exons 1-6 AD	Não
	12q23.1(100,429,769-100,720,403)x1	290Kb	PP	Gene <i>SCYL2</i> exons 1- 8 AR	Não
15	14q32.32q32.33 (103,555,497-105,965,245)x1	2,4 Mb	PP	Genes <i>INF2</i> AD	Não
				Gene <i>PACS2</i> AD	Não
22	19q13.42(55,656,925-55,665,575)x0	8kb	PP	Gene <i>TNNI3</i> exon 8 AR	Não

Kb: kilobase. Mb: megabase. Pb: pares de base. VUS: variante de significado incerto , PP: provavelmente patogênica; CNV:arr[GRCh37]: variante do número de cópia com referência do UCSC Genome Browser hg19

5.7.10 Sequenciamento completo do Exoma

Quatro pacientes realizaram sequenciamento completo do exoma em laboratórios externos e portavam estes exames no momento da inclusão no estudo (dois pacientes) ou em consultas subsequentes. A versão GRCh37 do genoma humano foi utilizada como referência nos quatro testes realizados.

Nestes quatro exames realizados foram encontradas alterações nos seguintes genes:

- *MYH14* (NM_001145809: c.3322C>T p.(Arg1108Cys) no exon 27 em heterozigose. Variante classificada como de significado incerto pelo *American College of Medical Genetics* (ACMG). Exame realizado em gêmeas monozigóticas, com resultado positivo em ambas e no genitor (confirmado pelo método Sanger)

- *TPM3* (NM_152263.4:c.502C>T p.(Arg168Cys) em heterozigose. Variante classificada como patogênica pelo (ACMG).

- *NALCN* (NM_052867.2:c.3542G>A p.(Arg1181Gln) em heterozigose. Variante classificada como patogênica pelo (ACMG)

A tabela 15 descreve os genes, variantes e fenótipos de quatro pacientes que realizaram o sequenciamento completo do exoma.

Tabela 16. Genes, variantes e fenótipos dos pacientes com AMC que realizaram sequenciamento completo do exoma, assistidos em serviço público especializado em doenças neuromusculares do SGM-HUPES, 2016-2019

Paciente	Gene	Variante	Aspectos clínico	Doença	OMIM
2	MYH14	c.3322C>T p.(Arg1108Cys)*	Baixa estatura, camptodactilia, limitação extensão punhos, pterígio cervical, palato ogival e boca em carpa, rouquidão	Neuropatia periférica, miopatia, rouquidão e perda auditiva	614369*
29	MYH14	c.3322C>T p.(Arg1108Cys)*	Baixa estatura, camptodactilia, limitação extensão punhos, pterígio cervical, palato ogival e boca em carpa, semi ptose direita rouquidão	Neuropatia periférica, miopatia, rouquidão e perda auditiva	614369*
31	TPM3	c.502C>T p.(Arg168Cys)	Hipotonia, palato ogival, semi ptose bilateral, escoliose, pés tortos e limitação de extensão punhos	Miopatia congenita por desproporção congenita de tipo de fibras	255310
41	NALCN	c.3542G>A p.(Arg1181Gln)	Face contraída, hipotonia, atraso desenvolvimento, pés tortos e desvio ulnar de mãos	CLIFAHDD	616266

*Variante nunca descrita. Variante de significado incerto pelo ClinVar e deletéria pelos parâmetros *in silico* (*Mutation taster*, SIFT)

5.7.11 Outros exames

Exames adicionais foram realizados como complementação da investigação etiológica ou para tomada de decisão clínica. Os principais exames realizados foram espirometria em oito pacientes, tomografias de coluna e crânio em sete e

densitometria óssea em cinco pacientes. Três pacientes realizaram ACGH *array* com resultados normais.

5.8 CLASSIFICAÇÃO POR GRUPO DE DIAGNÓSTICOS, BASEADOS EM FENÓTIPO E EXAMES COMPLEMENTARES

Trinta e um pacientes (75% da amostra) receberam diagnóstico etiológico baseados em avaliação clínica e exames complementares.

Dez pacientes (24,4%) foram diagnosticados com amiotrofia. Seis deles com envolvimento de quatro membros e quatro com envolvimento exclusivo de membros inferiores. Cinco pacientes (12,2%) foram classificados como de origem no SNC (três pacientes com atraso global no desenvolvimento e ressonância com achados que justificam, e dois com infecção congênita pelo *Zika virus*). Dezesesseis pacientes (39% da amostra) tiveram envolvimento do nervo periférico, músculo, tecido conjuntivo ou síndrome de pterígio múltiplo. Dez pacientes não tiveram diagnóstico (24,3% da amostra).

5.8.1 Pacientes com Amiotrofia

Na presente casuística, dez pacientes (24,4%) preenchem critérios clínicos para amiotrofia: seis para amiotrofia envolvendo os quatro membros e quatro com amiotrofia envolvendo apenas membros inferiores. Não se identificou nenhum paciente com amiotrofia restrita a membros superiores.

Não havia história familiar de amiotrofia e em um dos pacientes os pais eram primos em primeiro grau. Havia uma paciente adotada e, portanto, sem estas informações.

As características clínicas que permitiram a classificação destes pacientes em amiotrofia foram: simetria no envolvimento articular, rotação interna dos ombros, posição em extensão ou flexão dos cotovelos, punhos fletidos, fossetas em articulações envolvidas, pés em equinovaro, membros curtos, redução do volume muscular, e ausência de história familiar. Um dos pacientes apresentava atraso escolar e uma paciente apresentava malformação ureteral. Na figura 06 são apresentados oito pacientes com amiotrofia, dois deles com envolvimento restrito aos membros inferiores.

Os pacientes classificados como amíoplasia de membros inferiores, apresentavam pés tortos congênitos, atrofia de músculos das pernas e fossetas acima de articulações envolvidas. Todos os pacientes com amíoplasia de membros inferiores foram investigados com tomografia de coluna ou RM de coluna para avaliação de medula.

Todos os pacientes com amíoplasia realizaram ENMG com resultados que variaram de normal a redução de unidades motoras. As biópsias musculares realizadas em seis pacientes tiveram resultados normais, escassez de tecido muscular ou apresentavam achados inespecíficos. Nenhuma biópsia tinha padrão histológico compatível com miopatia.

Não foram encontradas alterações no SNP array compatíveis com o fenótipo clínico de amíoplasia em quatro pacientes que realizaram este exame.



Figura 6. Pacientes com amioplasia com aquisição de marcha. A-D paciente n.12. A: aos 4 meses com múltiplas contraturas e fossetas em regiões tibiais anteriores. B: Aspecto de boca em carpa, temporais estreitos e pescoço curto. C e D: após aquisição de marcha com limitação de extensão de punhos, camptodactilia bilateral e joelhos fletidos. E-H, paciente n.22. E: Presença de múltiplas contraturas, pterígio axilar, limitação de extensão de punhos, pés tortos bilaterais e fossetas em regiões tibiais anteriores. F: polegar em adução. G: Pescoço curto, limitação de extensão de cotovelos e punhos fletidos. H: após aquisição de marcha, aos 4 anos, com postura em flexão de joelhos.



Figura 7. Amíoplasia em pacientes sem aquisição de marcha. A e B: paciente com amíoplasia em idades distintas, em A ao diagnóstico e em B aos 4 anos com limitação à extensão de joelhos e membros superiores normais. Em C, paciente com envolvimento restrito a membros inferiores, com pés tortos bilaterais e limitação à extensão de joelhos. D: envolvimento de 4 membros em paciente com malformação ureteral associada. E: amíoplasia de membros inferiores, com atrofia tibial esquerdo. Em F e G paciente com amíoplasia em quatro membros em distintas idades.

5.8.2 Pacientes com AMC e envolvimento do SNC

Cinco pacientes (pacientes 14,15, 26,34 e 35) tinham artrogripose e sinais de envolvimento do SNC e dois pacientes tinham infecção congênita pelo *Zika virus* (pacientes 10 e 18).

Os pacientes que apresentam envolvimento do SNC tinham comprometimento cognitivo grave ou atraso na aquisição de fala e linguagem. O paciente 15 foi o mais grave deste grupo, com RM de crânio com disgenesia de corpo caloso e alterações corticais, com marcada hidrocefalia. Não foi possível estabelecer o diagnóstico deste paciente. Este paciente foi submetido a biópsia de músculo por ter elevação discreta de CPK e ENMG de difícil interpretação devido à gravidade das contraturas articulares. O SNP *array* revelou uma deleção em homozigose no exon 12 do Gene *CENPF*, classificada com VUS, mas com fenótipo compatível. Foi solicitado genoma para este paciente e avaliação nos pais, ainda sem resultado. Figura 06

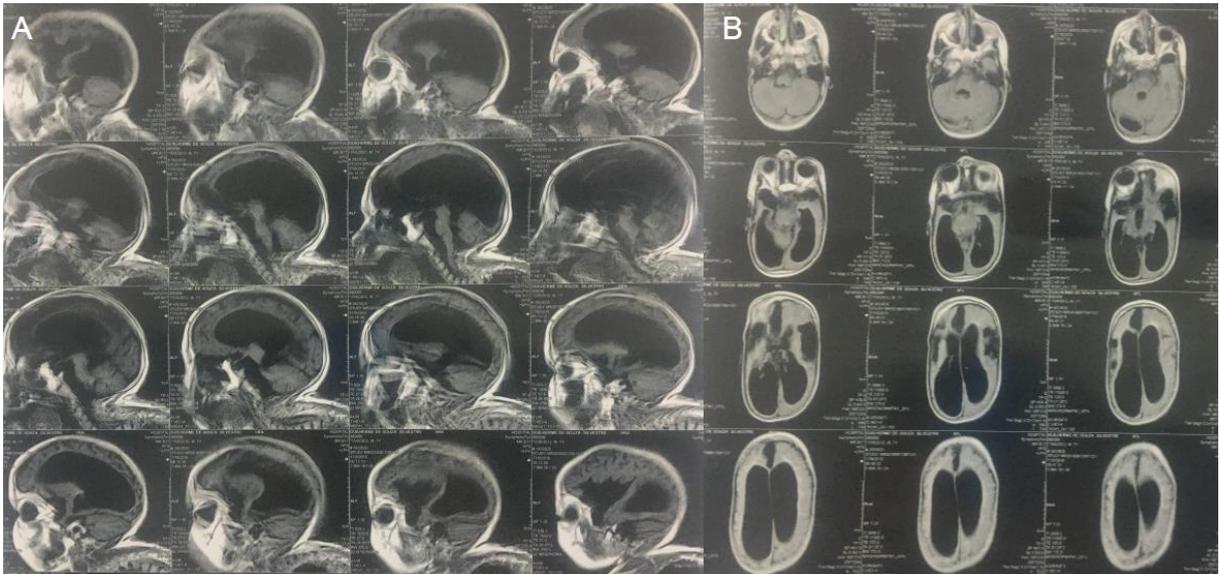


Figura 8. Ressonância magnética de crânio do paciente n.14. A: presença de ventriculomegalia e disgenesia de corpo caloso (corte sagital, T1), em B: atrofia cortical e aparente simplificação giral (corte axial, T1)



Figura 9. Paciente n.14. Apresentação clínica de paciente com importante comprometimento do SNC. A e B: presença de cifose e postura em flexão de cotovelos, sem abertura ocular.

Dois pacientes foram encaminhados com microcefalia e diagnóstico sorológico de infecção por *Zika virus*. Em um dos pacientes havia história de doença

exantemática no primeiro trimestre de gestação e no outro paciente não houve relato de intercorrências gestacionais, e o diagnóstico foi suscitado após o nascimento.

Os pacientes apresentavam padrões distintos de envolvimento articular. Os pacientes estão apresentados na figura 8. Foram realizadas biópsias musculares nos dois pacientes, com escassez de tecido muscular.

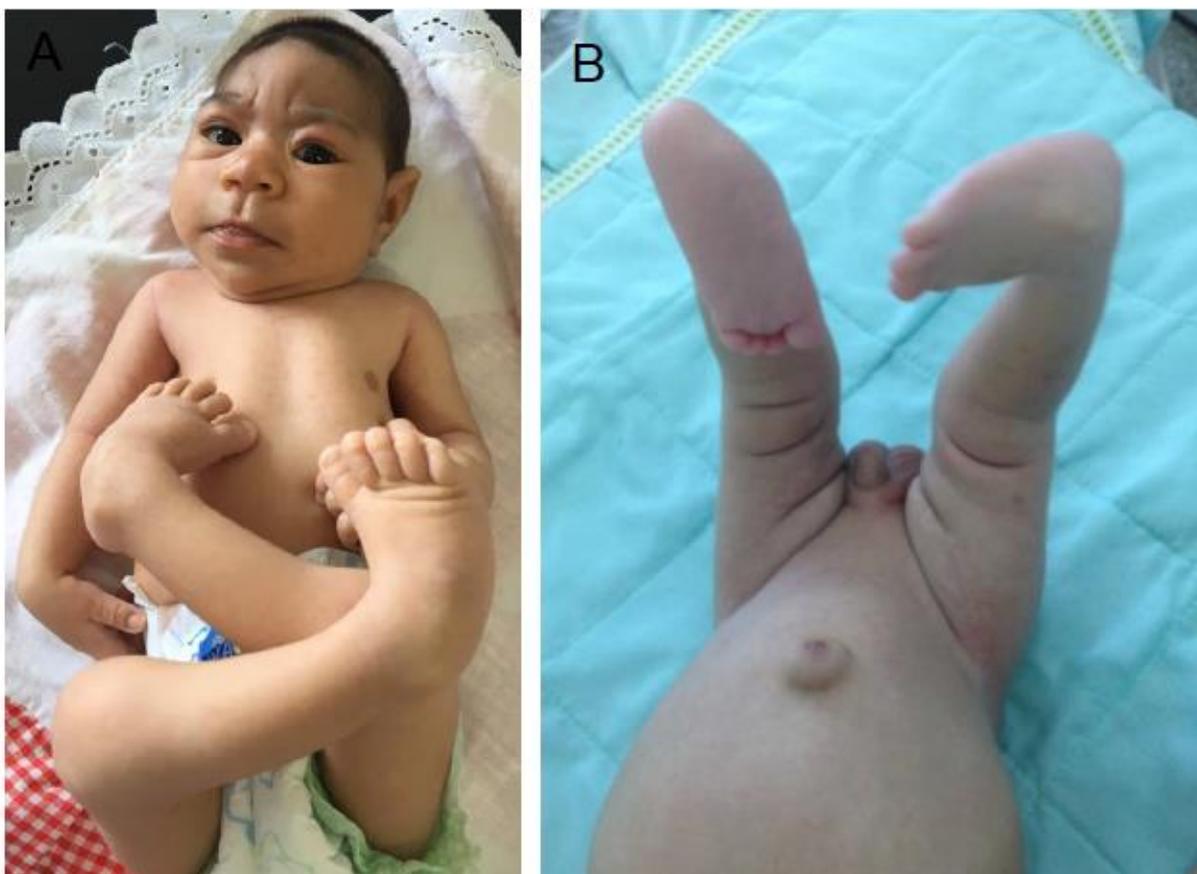


Figura 10. Pacientes com infecção congênita pelo *Zika vírus*. A, paciente n.19, com presença de microcefalia, luxação de quadril, limitação de extensão de cotovelo e pés tortos bilaterais. Em B, paciente n.11, com luxação de quadril, restrição à flexão de pernas e pés tortos bilaterais.

5.8.3 AMC com envolvimento do nervo, junção, músculo ou tecido conjuntivo

a) Síndrome de Beals / aracnodactilia contractural congênita (OMIM 121050)

Os pacientes 19 e 40 apresentavam características clínicas compatíveis com a síndrome de Beals (figura 9). O paciente 40 realizou dosagem de CPK, ENMG e biópsia muscular normais. O paciente realizou ainda SNP *array* com deleção em heterozigose nos exons 1 a 6 do gene *USFP2*, provavelmente patogênica associado a uma displasia quadril. Foi encontrada ainda outra deleção em heterozigose nos

exons 1 a 18 do gene *SCYL2*, provavelmente patogênica, associado a um fenótipo de AMC com grave envolvimento do SNC, com agenesia de corpo caloso, de padrão recessivo. Os pais deste paciente não apresentavam a mesma alteração genotípica.



Figura 11. Paciente n. 40, com fenótipo de síndrome de Beals. A: camptodactilia bilateral; B: orelhas com conchas mal definidas e C: presença escapula alada com hipotrofia muscular

b) Síndrome do pterígio múltiplo - Escobar (OMIM 26500)

O fenótipo da síndrome de Escobar foi observado em uma paciente (paciente n. 26). Paciente encaminhada pela ortopedia e avaliada com 10 anos de idade. Não havia história de consanguinidade parental e tinha história de um primo materno com quadro semelhante, residente no estado de São Paulo.

Paciente com baixa estatura, ptose palpebral com inclinação palpebral inferior, pregas nos cantos internos dos olhos, micrognatia, dificuldade em abertura oral completa, face tristonha, com orelhas de implantação baixa. Apresentava escoliose, pés tortos, limitação à extensão total de joelhos e camptodactilia bilateral. Presença de múltiplos pterígios em pescoço, axilas e áreas antecubitais. Sem alteração cognitiva. Paciente apresentada na figura 10 abaixo.

Realizou investigação com CPK normal e eletroneuromiografia compatível com miopatia. Paciente se recusou a coleta de biópsia, apesar do consentimento dos pais. No SNP *array* com uma VUS no gene *NAGA*, não compatível com o fenótipo.

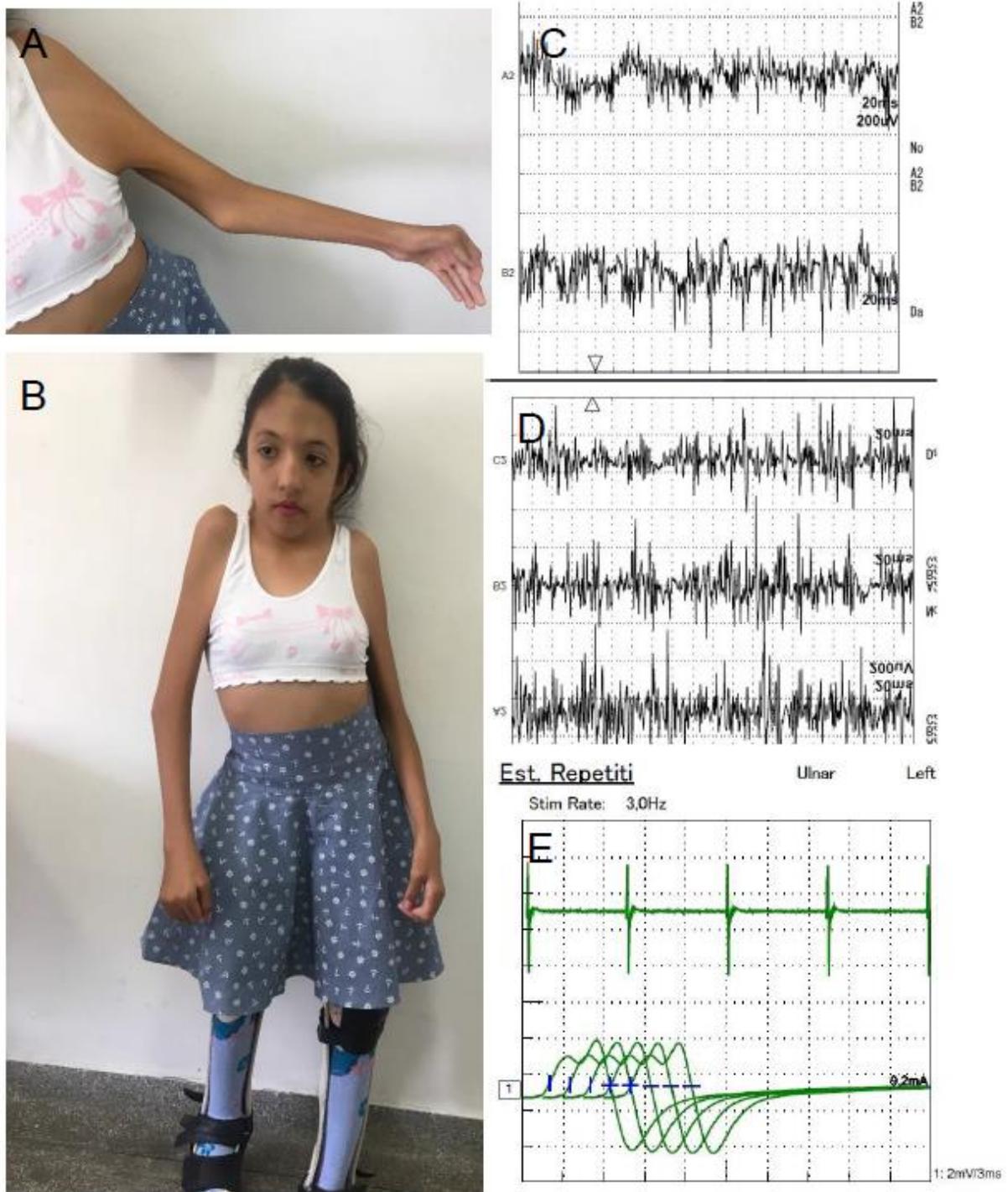


Figura 12. Paciente n. 27, com síndrome do pterígio múltiplo (síndrome de Escobar). A: Presença de pterígio axilar, B pescoço curto e limitação de extensão dos cotovelos. C: Eletromiografias de bíceps e em D: flexor radial do carpo com potenciais pequenos de padrão miopático. Em E: teste de estimulação repetitiva normal.

c) Ehlers-Danlos musculo contractural (OMIM 601776)

Um paciente do sexo masculino preenchia critérios clínicos de Ehlers-Danlos músculo contractural (paciente n. 32). Paciente encaminhado pela pediatria, com primeira avaliação aos 30 meses. Na história clínica, paciente com hipotonia ao nascimento, escoliose, pés tortos e postura em flexão de primeiro e segundo dedos mão esquerda, além de hérnia umbilical e inguinal bilateral. Relato de feridas com difícil cicatrização e hematomas frequentes. Não havia história familiar nem consanguinidade entre os pais. Apresentava ao exame clínico micrognatia, nariz pequenos, com filtro longo, orelhas proeminentes, esclera azulada e uma marcada frouxidão ligamentar, com hiperextensibilidade articular e de pele, com presença de cicatrizes atróficas em face e duas em perna esquerda. Evoluiu com escoliose rapidamente progressiva, com necessidade de correção cirúrgica (Figura 11).

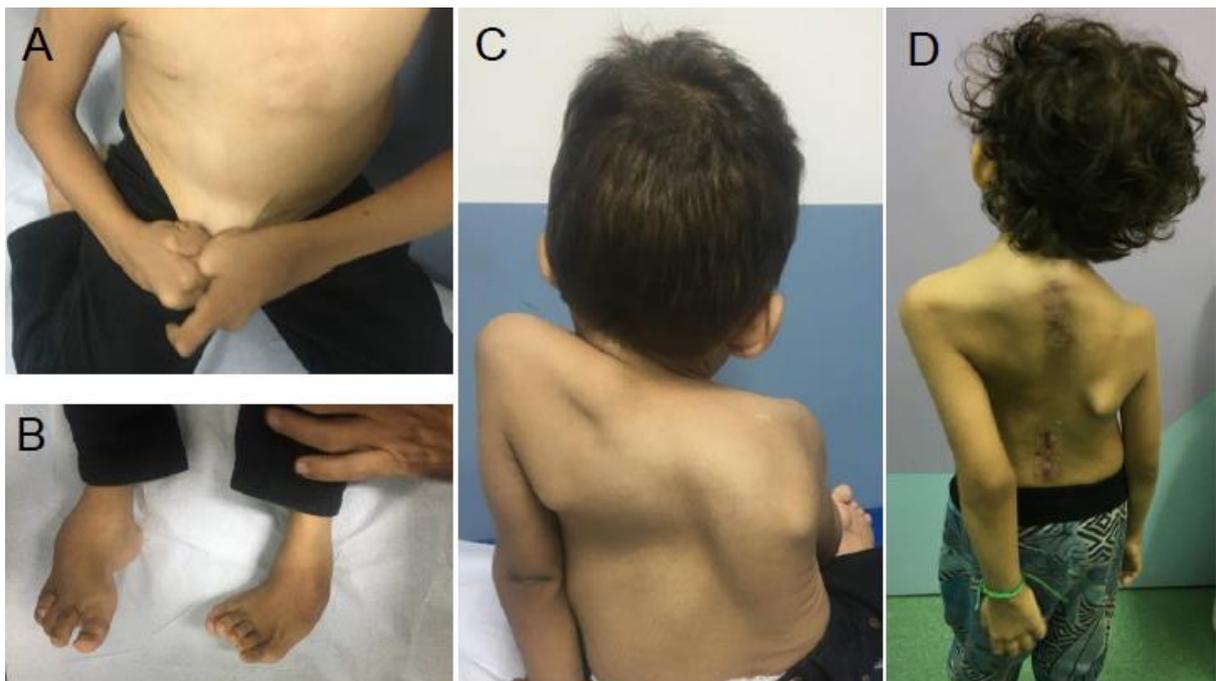


Figura 13. Paciente com características fenotípicas de Ehlers Danlos musculocontractural. A: hiperextensibilidade da pele, B: pés tortos bilateral, C: marcada cifoescoliose e em D: cicatrização precária

d) Freeman Sheldon (OMIM 193700)

O paciente 7 apresentava características fenotípicas compatíveis com Síndrome de Freeman Sheldon ou artrogripose distal 2A. Foi encaminhado para avaliação aos 12 anos, por ortopedista. Apresentava face semelhante à máscara, com microstomia e com aspecto de “assobio”. Olhos profundos filtro longo, nariz pequeno, palato alto, apinhamento dentário. Nas mãos havia desvio ulnar das mãos, com flexão dos

dedos das mãos, cifoesciose, com contraturas em quadril de joelhos. Realizou cirurgia para colocação de prótese em fêmur direito e correção de subluxação de cristalino bilateral. A dosagem de CPK e ENMG foram normais e a biópsia muscular apresentava um padrão histológico com características neurogênicas (leve variação no tamanho das fibras, ausência de aumento do tecido conjuntivo endomisial e perimisial, presença de fibras atrofiadas com aspecto angulado com presença de agrupamento de tipos de fibras). Figura 12 mostra as características fenotípicas.



Figura 14. Paciente com artrogripose distal DA2A (Síndrome de Freeman- Sheldon). Em A: limitação de abertura oral, e em B e C, o aspecto de face com aspecto de “assobio”

e) CLIFAHDD (OMIM 616266)

Um paciente do sexo masculino foi diagnosticado com CLIFAHDD, por sequenciamento completo do exoma. Foi encontrada a variante c.3542G>A p.(Arg1181Gln) em heterozigose. Variante classificada como patogênica pelo (ACMG) (paciente 41).

Paciente com primeira avaliação com 15 meses, com história AMC diagnosticada durante a gestação. Não havia relato de consanguinidade e história familiar de tio e primo paternos com alteração em quadril desde o nascimento, porém sem diagnóstico. Havia relato de restrição de crescimento intrauterino e movimentos fetais reduzidos, com duração da gestação de 30 semanas e Apgar 8/8 ao nascimento, com necessidade de suporte ventilatório. Os marcos motores estavam atrasados: sentou-se aos 9 meses e andou sem apoio aos 26 meses. Não adquiriu a linguagem até os 31 meses. Paciente trazia em primeira consulta investigação com

CPK 210 (VR até 185U/L), cariótipo 46XY, CGH-array ausência de heterozigose e ressonância de crânio normal.

O exame físico revelava uma face em “assobio”, com boca pequena, micrognatia, pregas epicânticas, estrabismo convergente à esquerda, ponte nasal larga, desvio ulnar das mãos, flexão dos dedos das mãos, pé torto bilateral e hipotonia. Alerta, emitia sons, e não havia interação com o examinador. A Figura 13 mostra os aspectos fenotípicos.



Figura 15 – Paciente n.41, CHIFAHDD. A e B, ao nascimento, com face com aspecto contraído. Em C, após início de reabilitação e em D com 31 meses de vida, com melhora do aspecto de face contraída.

- f) Miopatia congênita por desproporção congênita do tipo de fibras (OMIM 255310)

Dois pacientes apresentaram características histológicas compatíveis com

desproporção congênita de tipo de fibras. Uma paciente foi avaliada pela primeira vez aos 26 anos, com história de hipotonia ao nascimento, pés tortos e luxação de quadril, com atraso nos marcos do desenvolvimento motor (paciente 8). O tratamento das contraturas foi clínico ortopédico e fisioterapia. Apresenta face alongada, com palato ogival, sem ptose ou fraqueza facial. Apresentava uma marcha miopática, com força muscular grau IV proximal de membros superiores e IV proximal de membros inferiores (força avaliada de acordo com o MRC). Desenvolveu escoliose leve e insuficiência ventilatória restritiva, com capacidade vital forçada de 25% na avaliação em primeira consulta, com indicação de ventilação não invasiva com uso de ventilador binível (BiPAP®). Não havia história familiar nem casamentos consanguíneos dos seus pais. Esta paciente teve duas gestações no período de seguimento deste estudo, ambas sem intercorrências, com partos cesarianos e filhos sem hipotonia ou artrogripose ao nascimento. Os exames complementares mostravam uma CPK de 70 U/L (30-175 U/L). A biópsia muscular foi compatível com uma miopatia congênita do tipo desproporção congênita de tipo de fibras. Não foi realizado estudo molecular pois no período da coleta, paciente encontrava-se no período puerperal. Os dados clínicos resumidos encontram-se na tabela 17. As imagens estão na figura 14.

O segundo caso é uma paciente do sexo feminino (paciente 31), avaliada aos 4 anos com pés tortos diagnosticado por US gestacional, com 27 semanas. Nasceu a termo com hipotonia global, axial e apendicular, pés tortos e limitação à extensão de punhos bilateralmente. Utilizou botas corretivas para o tratamento dos pés tortos e fisioterapia para mãos, com melhora na mobilidade articular por volta de 2 anos. Sentou-se com 8 meses e andou sem apoio aos 2 anos.

Os exames complementares mostravam uma CPK de 35 U/L (30-175 U/L), eletroneuromiografia normal e sequenciamento completo do exoma com variante c.502C>T p.(Arg168Cys no gene *TPM3* em heterozigose. Não havia consanguinidade e o pai biológico tinha história de hipotonia ao nascimento. O estudo genético não foi realizado nos pais, a pedido da mãe da paciente, porque tratava-se de um filho de um relacionamento extraconjugal, de desconhecimento por parte do pai não biológico (imagens deste paciente não foram autorizados para divulgação). Após inclusão neste estudo, paciente foi submetida a biópsia de músculo, que foi compatível com uma miopatia congênita do tipo desproporção congênita de tipo de fibras. Aos 4 anos de idade, paciente desenvolveu disфонia e

disfagia, com episódios de infecção de trato respiratório e escoliose. O exame neurológico mostrava uma hipotonia global, com redução dos reflexos profundos, marcha em báculo de quadril, frouxidão ligamentar. Apresentava uma fraqueza facial, com semi ptose bilateral, com palato ogival, além de escoliose. Os dados clínicos resumidos encontram-se na Tabela 17. As imagens das histologias e fotografia da paciente n.08 estão na Figura 14. Na figura 15 a histologia da paciente

Tabela 17 Aspectos clínicos de pacientes com miopatias congênitas assistidos em serviço público especializado em doenças neuromusculares do SGM-HUPES, 2016-2020

Paciente	31	8	15
Sexo	F	F	M
Histologia	Desproporção congênita de tipo de fibras	Desproporção congênita de tipo de fibras	Mini cores
Gene/Variante	<i>TPM3</i> / c.502C>T p.(Arg168Cys)	Desconhecido	Desconhecido
CPK	35	70	35
Contraturas (n)	04	04	10
Idade marcha	24	24	72
Envolvimento respiratório	não	Sim	não
Escoliose	sim	Sim	sim
Hipotonia	Sim	Sim	sim
Dismorfias	Palato ogival, semi ptose "boca em carpa	Face alongada, palato alto	Frontal amplo, nariz pulposo, hemangioma frontal

F: feminino; M: masculino; valores de CPK em U/L; idade de aquisição de marcha em meses

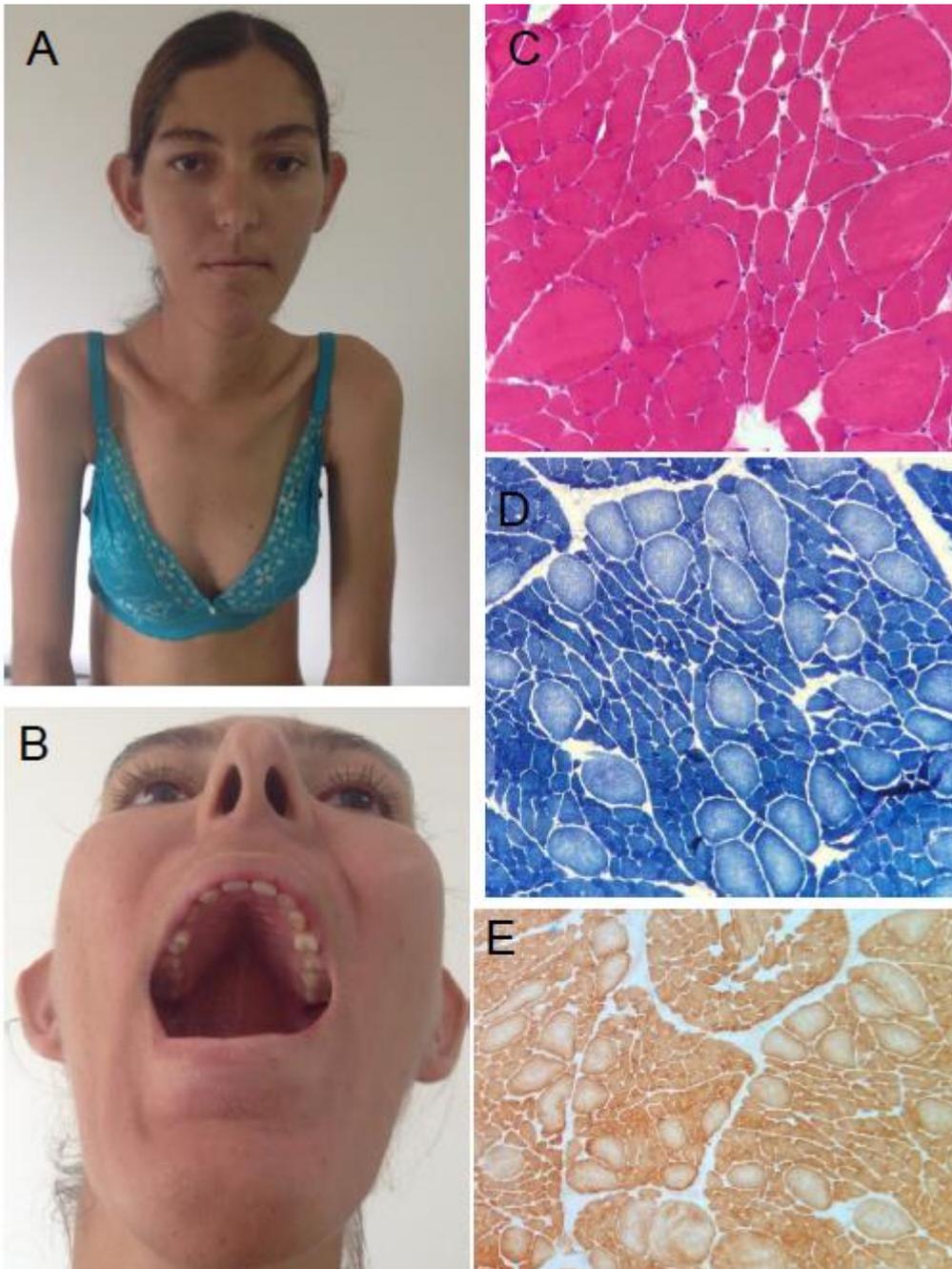


Figura 16. Paciente n.31 com miopatia congênita por desproporção congênita de tipo de fibras. A: face alongada e hipotrofia muscular, B: palato estreito. Em C: marcada variação no calibre de fibras musculares, sem aspecto distrófico, com núcleos periféricos (H&E, 40x).D: marcada variação no calibre de fibras com atrofia de fibras tipo 1 (NADH, 40x), e em E, com atrofia de fibras tipo 1 (COX, 20x)

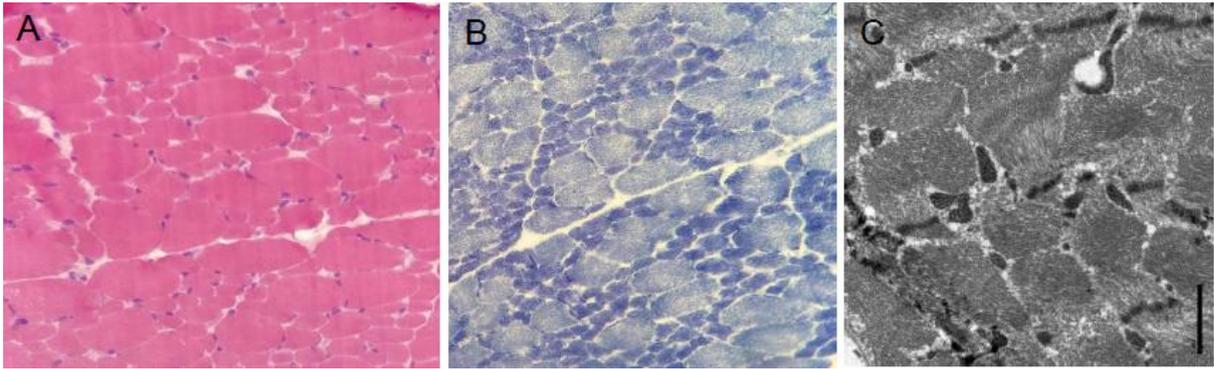


Figura 17. Achados na microscopia óptica de paciente n.32, com desproporção congênita de tipo de fibras. A: observa-se marcada variação de calibre de fibras, com atrofia de fibras tipo 1 vistas na H&E (40x). B: com atrofia de fibras tipo 1 no SDH (40x) e em C, microscopia eletrônica de transmissão sem alterações

g) Miopatia congênita tipo multi minicores (OMIM 117000)

O paciente 15 recebeu o diagnóstico de miopatia congênita com multi mini cores. Paciente com AMC e hipotonia, com atraso nos marcos motores. Sem consanguinidade na família e mãe com história de hipotonia ao nascimento e atraso de aquisição de marcha. O CPK e ENMG foram normais e biópsia do paciente e posteriormente realizada na mãe, com sinais sugestivos de mini cores. O exame de SNP *array* de ambos foi normal. Figura 16



Figura 18. Paciente n.16 com padrão de envolvimento distal com A: camptodactilia e polegares fletidos bilateralmente, B: pés tortos bilateral.C: paciente fotografado na aquisição de marcha aos 6 anos

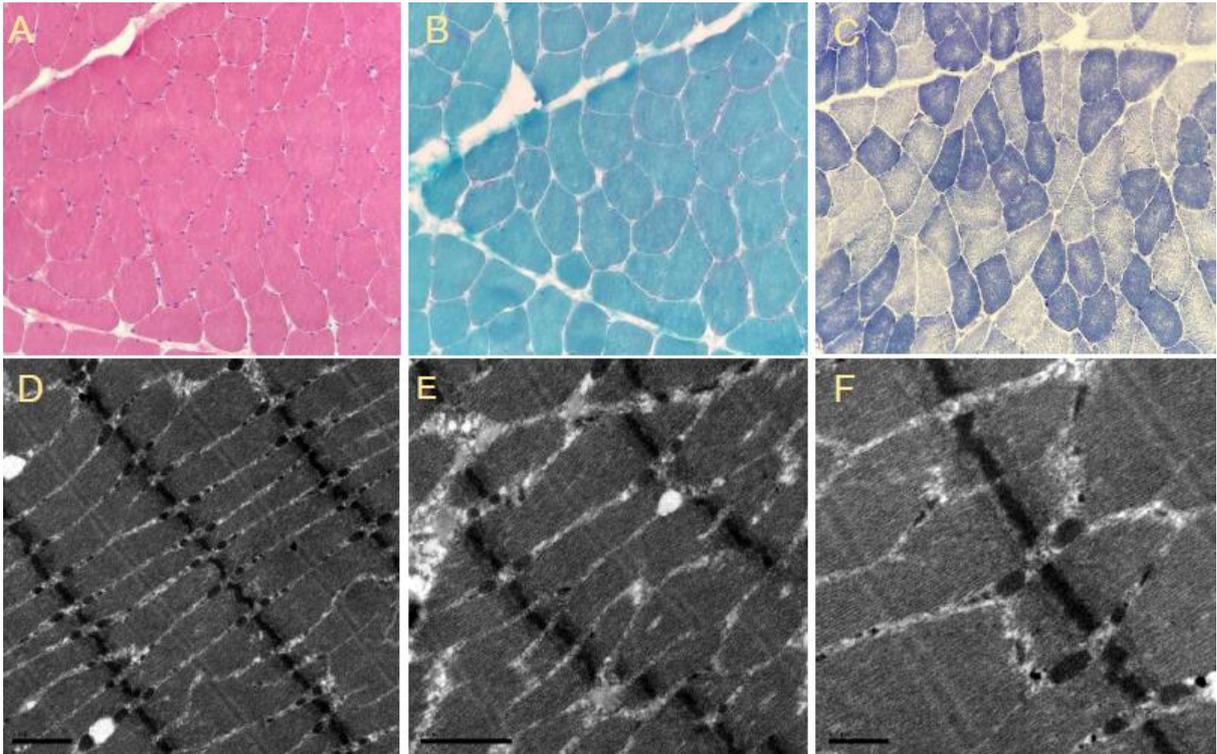


Figura 19. Aspecto histológico paciente n.16 com miopatia congênita tipo multi mini cores. A e B: discreta variação no calibre de fibras, H&E e Gomori, respectivamente (40x).C: presença de mini cores na reação da NADH. D a F: sarcômeros sem alterações na microscopia eletrônica de transmissão

h) Distrofia muscular congênita merosina negativa (OMIM 607855)

Dois pacientes desta casuística tiveram diagnóstico de distrofia muscular congênita por deficiência de merosina por meio da biópsia de músculo e RM de crânio. Eles eram do sexo masculino e um deles foi incluído nesta amostra com resultado de biópsia muscular externa.

O paciente 16 foi encaminhado pela fisioterapia aos 11 meses de idade, com relato de luxação de quadril, pés tortos e postura em flexão dos dedos das mãos, além de marcada hipotonia axial e apendicular, com manobra do arrasto positiva e sinal do “U invertido”. Havia macrocrania e *pectus excavatum*. Adquiriu a capacidade de sentar sem apoio aos 11 meses e falou primeiras palavras aos 7 meses. Não havia história de consanguinidade ou casos semelhantes na família. Ver figura 18;

O CPK encontrava-se elevado (3492 U/L) e a RM de crânio mostrava sinais de desmielinização periventricular. A biópsia apresentava características distróficas com marcação negativa para merosina. Este paciente evoluiu com óbito aos 2 anos de idade em decorrência de sepse secundária a pneumonia aspirativa.



Figura 20. Paciente n.17 com distrofia muscular congênita merosina negativa aos 7 meses de idade. A: contraturas distais em mãos e pés. B: marcada hipotonia muscular

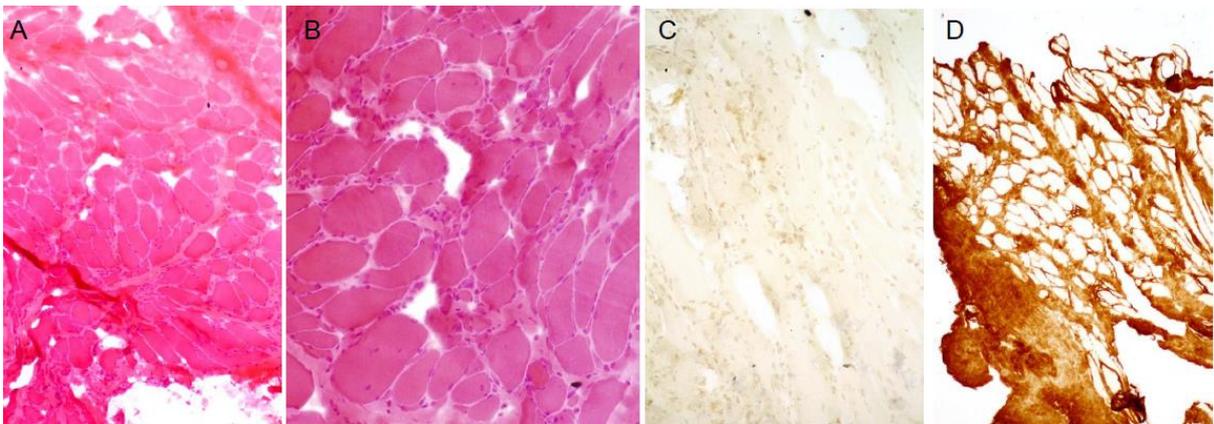


Figura 21. Biópsia de tecido muscular do paciente n.17 com distrofia muscular congênita merosina negativa. A e B: variação no calibre de fibras, com centralização nuclear e aumento de tecido conjuntivo (H&E, aumento 20x e 40x, respectivamente). Em C, imunistoquímica com marcação negativa para merosina (20x) e em D, imuno-marcação positiva para colágeno VI (40x).

O segundo paciente (paciente 36) foi encaminhado por neuropediatra, incluído nesta amostra com 8 anos de idade. Havia história de hipotonia ao nascimento, luxação congênita de quadril e pés tortos bilaterais, além de macrocrania e palato em ogiva. Não havia história de consanguinidade e refere avô materno com diagnóstico de distrofia muscular (não avaliado- óbito). Recebeu diagnóstico de distrofia muscular congênita merosina negativa aos cinco anos, com biópsia muscular compatível, realizada na UNIFESP. O CPK estava elevado (1430 U/L) e a RM revelava uma área de desmielinização periventricular. Resultado de SNP *array* normal. Quanto aos marcos do desenvolvimento, sentou-se com 15 meses e falou com 30 meses. Nunca andou. Sem relato de crise convulsiva.

Paciente evoluiu com redução de sua capacidade ventilatória, com necessidade de suporte ventilatório com ventilação não invasiva.

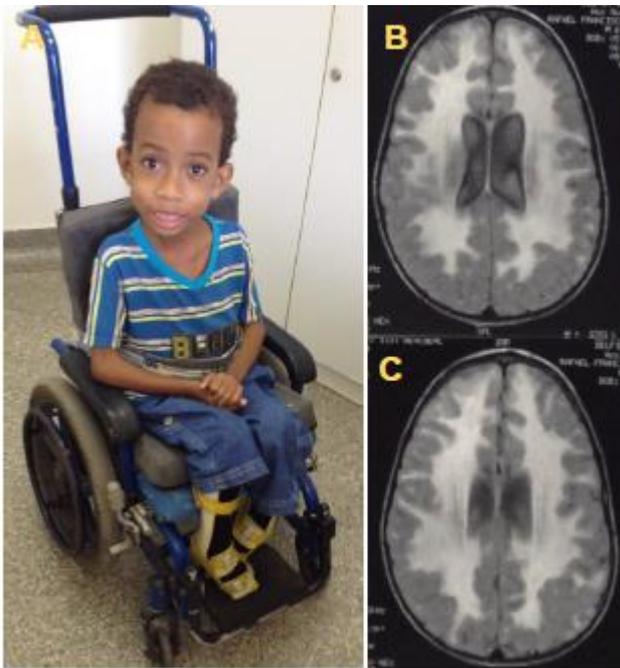


Figura 22. Paciente n.37 com distrofia muscular congênita merosina negativa. A: aspecto fenotípico com macrocrania e face alongada. Em B e C imagem de RM de crânio com alteração de sinal em substância branca periventricular e simétrica, no corte axial (sequência Flair)

i) Miopatia com agregados citoplasmáticos, escoliose, pterígio e arritmia

Um paciente foi encaminhado pela cardiologia aos 18 anos por cardiopatia hipertrófica desde os 2 anos de idade, progressiva. História de pterígio cervical e axilar, escoliose, palato ogival, contraturas articulares em mãos e limitação para extensão de cotovelos. Não havia fraqueza muscular ou envolvimento cognitivo. Sem casos semelhantes na família ou consanguinidade. Eletroneuromiografia normal. Biópsia (Figura 21) com agregados intracitoplasmáticos vistos na no HE e Gomori, com características de glicogênio na microscopia eletrônica. O SNP array sem alterações. Evoluiu com piora da cardiopatia, com uma arritmia ventricular com implante de desfibrilador aos 19 anos, com óbito por morte súbita aos 21 anos.

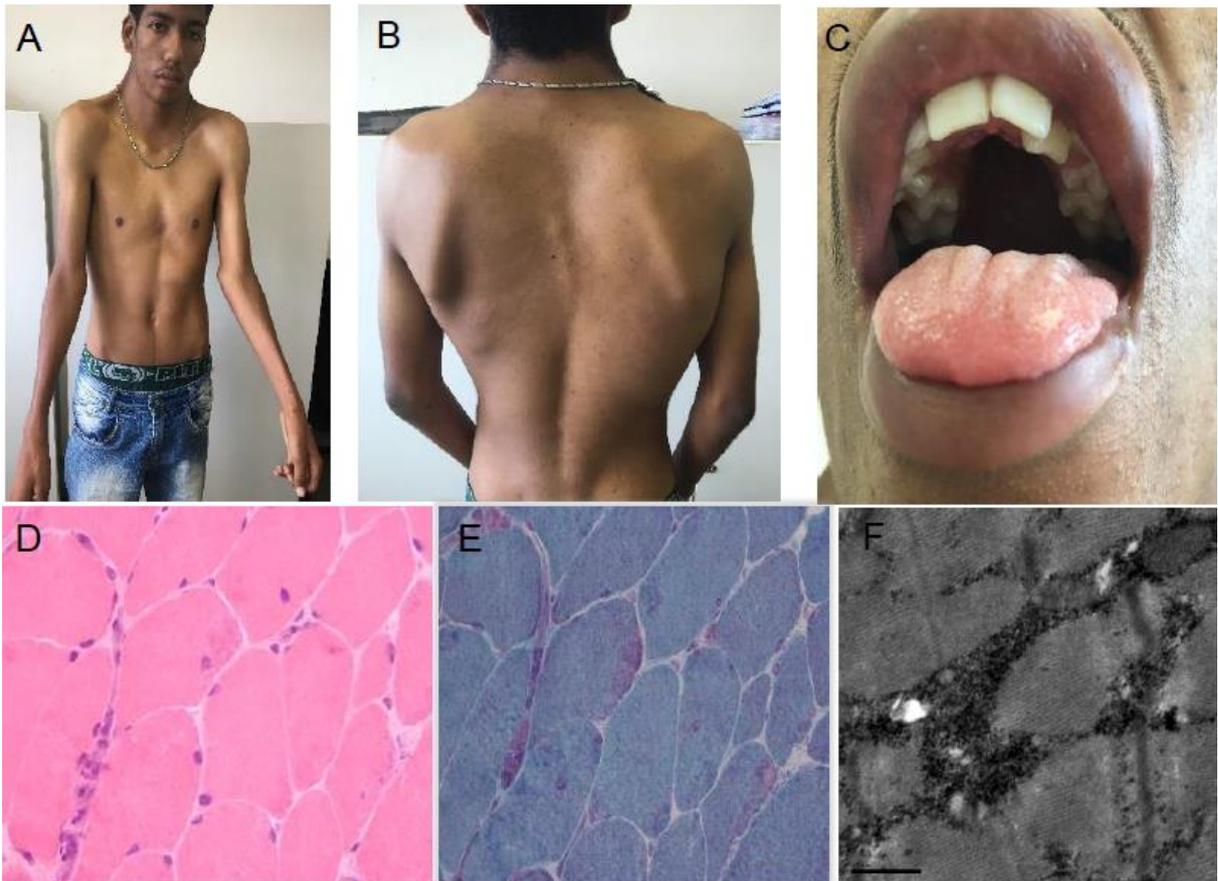


Figura 23. Miopatia com agregados citoplasmáticos. Paciente n.7. A: presença de pterígio cervical e limitação de extensão de cotovelos. B: escoliose com escapula alada. C: palato estreito. D e E: biópsia muscular evidenciando leve variação no calibre de fibras musculares e presença de inclusões citoplasmáticas, H&E e Gomori respectivamente (40x). F: ME com acúmulo de material sugestivo de glicogênio.

j) Outras miopatias

Duas pacientes apresentavam alterações mínimas na histologia, com quadro clínico de escoliose progressiva, sem definição etiológica.

O único par de gêmeos incluído nesta amostra foram as pacientes 3 e 30, com história de limitação à extensão de punhos e camptodactilia bilateral. Apresentavam ainda uma hipomímia facial, boca em carpa e palato ogival, além de ptose palpebral incompleta a direita em uma das pacientes, mais evidente com o crescimento. Ambas desenvolveram uma disfonia, além de baixo peso e baixa estatura. Dosagem de CPK e ENMG normais. Pais não concordaram em realizar a biópsia muscular por ser procedimento invasivo. O sequenciamento completo do exoma revelou uma VUS no gene *MYH14* em ambas. Os pais foram avaliados, com o pai portador da mesma variante. O pai fez avaliação clínica e por ENMG normal. A

variante é descrita, pelos parâmetros *in silico* pelo *MutationTaster* como causador de doença.



Figura 24. Paciente n.28 com grave escoliose, camptodactilia e baixa estatura. A: presença de *Pectus carinatum*. B: cifoesciose observada clinicamente e C e D: cifoesciose vista na tomografia óssea de coluna total

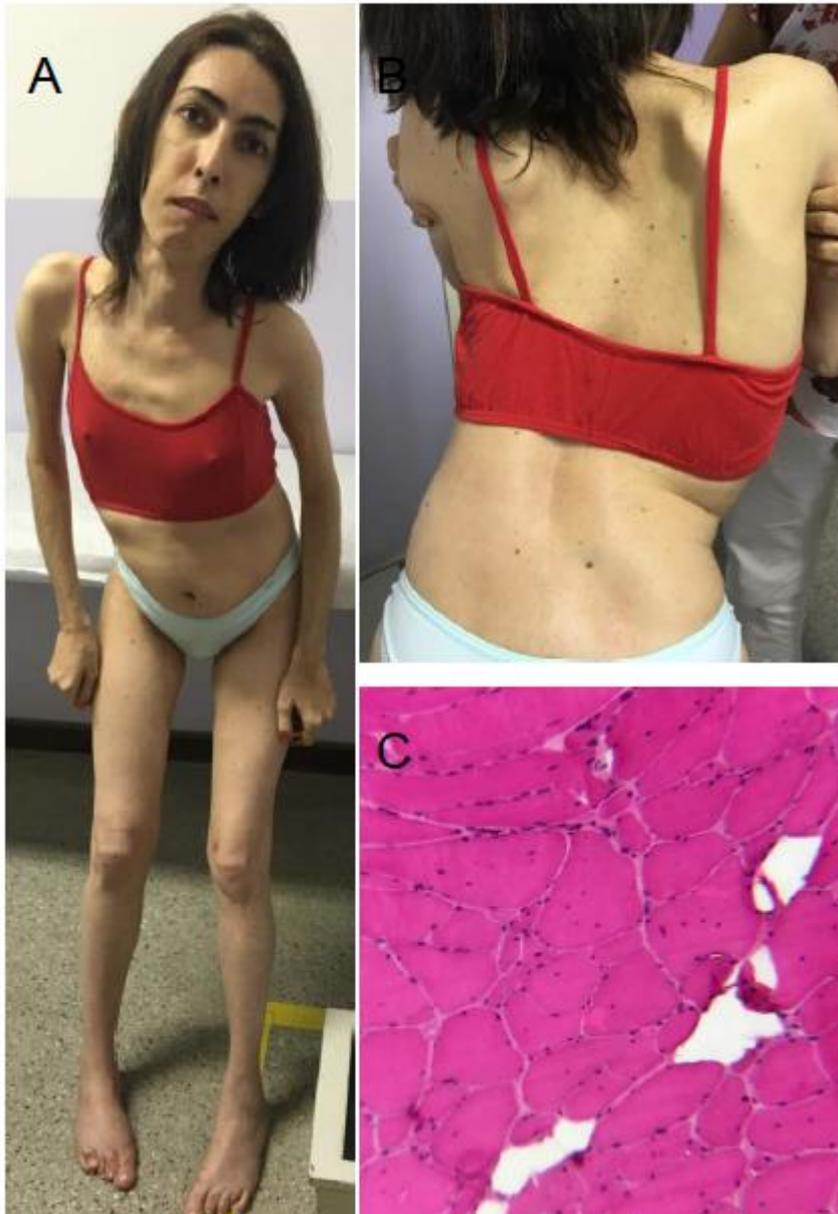


Figura 25. Paciente n.9. A: observa-se pés tortos e luxação quadril, com postura em flexão de tronco por fraqueza paravertebrais. B: escoliose. C: biópsia de músculo desta paciente, com marcada variação no calibre de fibras e centralizações nucleares (H&E, 40x)



Figura 26. Gêmeas com VUS no gene MYH14. A: paciente n.30 com hipertelorismo e boca em carpa. B: paciente n.2 com boca em carpa. C: observa-se hipomímia, boca em carpa, camptodactílica e semiptose nas duas pacientes

5.8.4 AMC de causa não definida

Do total da amostra, dez pacientes permaneceram sem definição etiológica da AMC, não sendo possível uma classificação baseada em dados clínicos e/ou exames complementares, e em sete deles não havia atraso no neurodesenvolvimento.

A paciente número 12, foi avaliada aos 33 anos, encaminhada pela genética, com quadro clínico compatível com amiotrofia congênita. Não havia fraqueza muscular, mas uma progressiva queda de capacidade vital forçada e escoliose. A investigação desta paciente revelou uma ENMG com padrão miopático e a biópsia muscular com achados inespecíficos. A pesquisa de microdeleções e duplicações por SNP *array* foi normal. Havia história de irmão, com quadro semelhante, porém mais grave, com importante envolvimento respiratório, com óbito aos 14 meses, sem diagnóstico etiológico da AMC. Os pais eram primos em primeiro grau. Esta paciente não foi classificada como amiotrofia pois esta é uma condição de ocorrência esporádica. A paciente e a biópsia muscular são mostradas na figura 27.

O paciente 5 foi o que apresentou a maior gravidade clínica quanto ao número de articulações envolvidas, sem envolvimento do SNC. Houve perda de seguimento deste paciente, após a terceira consulta, sendo possível a realização de

exame físico, eletroneuromiografia e ressonância de crânio. Este paciente foi mantido na amostra pela gravidade da artrogripose, porém com um desfecho clínico favorável, com adaptação de marcha e adaptação funcional (figura 28).

A paciente 1 foi avaliada aos 4 meses com artrogripose de articulações proximais e distais, com laringomalácia e insuficiência respiratória com necessidade de traqueostomia com 35 dias de vida e gastrostomia. Apresentava marcada hipotonia. Ao exame com retrognatia, ausência de hélice externa em ambas orelhas, base nasal achatada, filtro nasal curto e hipomímia facial. Presença de múltiplas contraturas articulares. Sentou com 01 ano e mantém boa interação com o meio. Tem suspeita diagnóstica de miopatia, com ressonância de crânio normal e biópsia muscular ainda não realizada. Esta paciente está ilustrada na figura 29.

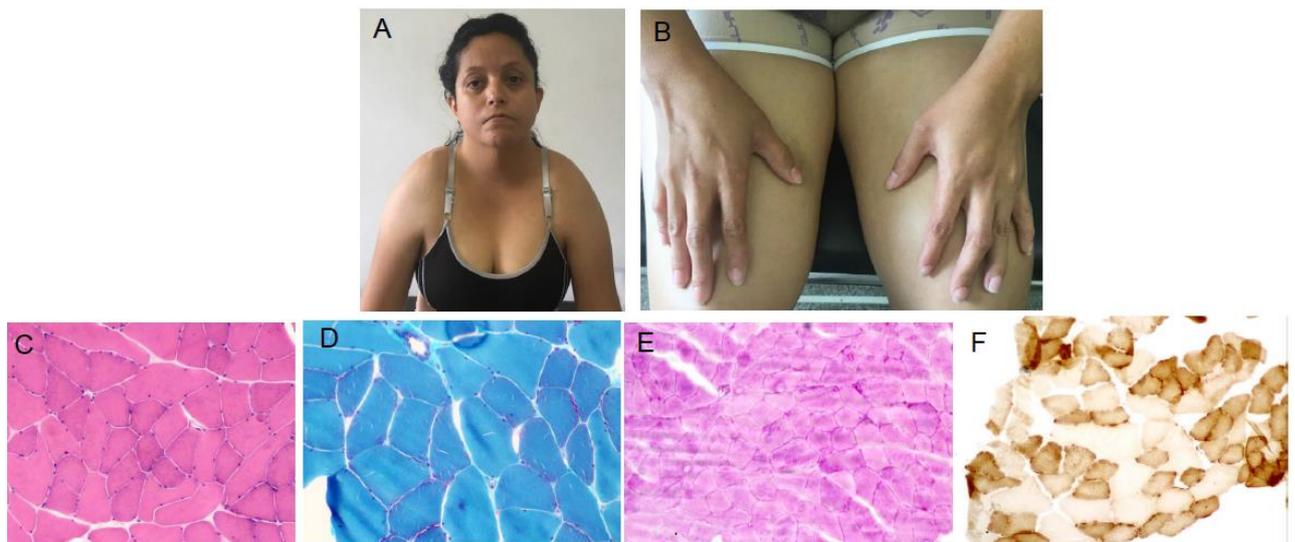


Figura 27. Paciente n.12. Paciente com características fenotípicas de amioplasia, com história familiar de irmão com óbito por quadro semelhante. A: pescoço curto e pterígios cervicais. B: camptodactilia. C-F: biópsia de músculo com padrão histológico com alterações mínimas. Em A: discreta variação no calibre de fibras (H&E, 40x). Em B, mínima variação de calibre de fibras e núcleos periféricos (Gomori, 40x). Em C PAS normal (20x) e D ATPase 4,65 com padrão em mosaico preservado (40x).



Figura 28. Paciente n.5 com AMC, aos 40 anos. Sem comprometimento cognitivo. A e B mostrando as múltiplas contraturas articulares. A: mostrando a postura fixa cervical e adaptação de locomoção deste paciente

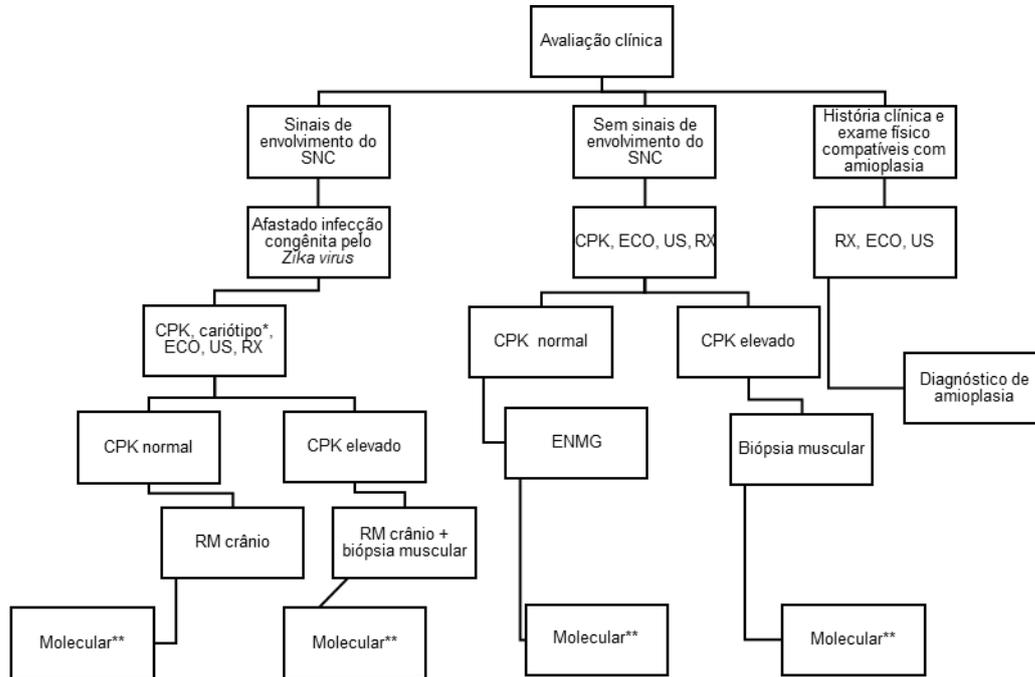


Figura 29. Paciente n.1 com A: micrognatia, face estreita e contraturas múltiplas, mostradas ao 2 meses. B: presença de dismorfias faciais, com ponte nasal ampla. Traqueostomia realizada por traqueomalácia. C: paciente aos 7 meses com melhora parcial das contraturas e D: aos 20 meses, sentando com apoio e boa interação com o meio.

5.9 FLUXOGRAMA DE INVESTIGAÇÃO

Após avaliação dos pacientes com dados de história clínica e exames complementares, o fluxograma inicial foi revisto e proposto um novo fluxograma de investigação dos casos de AMC.

Fluxograma 2. Fluxograma de investigação em pacientes com AMC



CPK: creatinofosfoquinase; ECO: ecocardiograma; ENMG: eletroneuromiografia; RX: radiografia das articulações envolvidas; US: ultrassonografia abdome. *cariótipo em casos de múltiplas malformações e suspeita de cromossomopatias; ** SNP array ou pesquisa de mutações em genes únicos por Sanger ou painéis ou sequenciamento completo do exoma definidos pelo fenótipo e exames complementares

6 DISCUSSÃO

6.1 AMOSTRA

A presente série de casos consta de quarenta e um pacientes. Trata-se de um número significativo de casos se levarmos em consideração a raridade dessa manifestação, bem como o período curto de coleta de 42 meses. Além disso, não foram incluídos pacientes com AMC de causas extrínsecas ao feto como as atribuídas ao uso de agentes teratogênicos e a alterações uterinas. Assinale-se, a título de comparação, que WALLACH et al., em 2018, conduziram um estudo observacional no Sudeste da França, em um centro especializado em doenças neuromusculares e reuniram, em um período de 20 anos, entre os anos de 1997 e 2017, 42 pacientes com AMC para avaliação etiológica, (WALLACH et al., 2018) e BAYRAM et al., em 2016, reuniram 52 pacientes, de origem turca, provenientes de 48 famílias distintas com AMC para investigação etiológica, com pacientes provenientes de toda a Turquia, não descrevendo o período de seleção dos casos. Posteriormente, em 2019, este mesmo grupo reuniu 77 novos casos de pacientes turcos para investigação, incluindo fetos e natimortos, sem descrição do período de seleção (PEHLIVAN D, et al., 2019). Foi encontrado um trabalho mexicano, conduzido por VALDÉS-FLORES et al., 2015, 50 casos mexicanos em um centro de referência em genética, reunidos em três anos. Apesar deste ser um período de coleta inferior ao presente trabalho, foram incluídos casos de todo o México, enquanto no trabalho apresentado, os pacientes foram provenientes de um único estado brasileiro. As séries de casos descritas na literatura com número semelhante de pacientes incluídos para investigação etiológica das AMC, tem um período ou mais prolongado de coleta de dados, ou tem um foco no genótipo, como os estudos de BAYRAM et al., 2016 e de PEHLIVAN D, et al., 2019 que descrevem apenas os achados clínicos nos casos que foi possível estabelecer um diagnóstico molecular. O presente trabalho reúne aspectos clínicos detalhados, com história clínica, exame físico e investigação complementar ampla.

Outros estudos, baseados em dados de plataformas de registros de malformações, como o realizado por DARIN et al, 2002, reuniram 68 pacientes em um período de 15 anos de estudo . O estudo baseado em informações do EUROCAT, registro europeu de malformações congênitas, reunindo 15 países e que

representam cerca de 30% da população europeia, foi o que apresentou o maior registro, com 757 casos de pacientes com AMC, entre os anos de 1980 e 2006, incluindo natimortos e óbitos fetais. Neste estudo foi constatada uma prevalência de 8,8/100000 nascidos (HOFF et al., 2011)

No presente estudo, os pacientes provieram de 20 municípios dentre os 417 da Bahia, incluindo sete das nove mesorregiões do mapa de saúde do Estado (IBGE, 2010). Vinte pacientes eram procedentes da região metropolitana de Salvador e três de Feira de Santana, a segunda cidade mais populosa do estado.

A especialidade médica que mais encaminhou pacientes foi a ortopedia, possivelmente por ser a que mais atende este grupo de pacientes para o tratamento clínico ou cirúrgico das contraturas articulares. Somados, ortopedistas e fisioterapeutas, foram responsáveis por 48% dos encaminhamentos para investigação etiológica das AMC. Nove pacientes foram encaminhados por geneticistas, sobretudo do SGM-HUPES, especialidade que habitualmente acompanha estes pacientes. Seis pacientes foram encaminhados por neuropediatras e não houve nenhum encaminhamento por neurologistas, apesar de causas neurogênicas (envolvimento do SNC e unidade motora) serem identificadas em diversas séries como causadoras de AMC.

AMBEGAONKAR et al., 2011, avaliaram a etiologia de 27 crianças com AMC, e encontraram doze pacientes com formas neurogênicas. No estudo retrospectivo, multicêntrico, conduzido por WALLACH et al. em 2018, que incluiu 42 pacientes, foram descritos quatorze pacientes de origem neurológica. KANG et al. relatam que, em um estudo retrospectivo durante um período de 23 anos com 38 pacientes, o diagnóstico de processo neurogênico ou muscular com base em dados de ENMG e biópsia muscular foi possível em 18 pacientes (8 neurogênicos e 10 miopáticos). Estes estudos revelam uma proporção elevada de causas neurológicas das artrogripes, apontando que neurologistas e neuropediatras precisam estar familiarizados com estas condições. Na presente casuística, foram encontrados 21 pacientes (51,2%) classificados como de origem neurológica, por envolvimento do sistema nervoso central ou periférico.

Nesta amostra não foram encaminhados para avaliação, pacientes com formas leves e com resolução espontânea das contraturas articulares, tampouco fetos ou natimortos, o que foi considerado como viés de encaminhamento. A maioria das séries de casos da literatura incluem fetos e natimortos em suas casuísticas

(DARIN et al, 2002; HOFF et al., 2011; PEHLIVAN D, et al.2019). O escopo de nosso trabalho não previa a inclusão de fetos e natimortos, mas essa abordagem será importante na continuidade dessa investigação e vai requer um novo desenho com comprometimento de obstetras, neonatologista e patologistas dedicados à patologia fetal e neonatal.

6.2 DADOS DEMOGRÁFICOS

Em nossa série houve um discreto predomínio de pacientes do sexo feminino (53,7%). Dentre os estudos de prevalência de AMC, não há um predomínio entre os sexos, com alguns estudos com maior predomínio de um sexo e outros com distribuição semelhante entre os sexos (DARIN et al., 2002; HOFF et al., 2011; WALLACH et al., 2018). É muito provável, dadas essas informações que a prevalência não seja significativamente diferente entre os diferentes sexos.

Quanto a cor autodeclarada, 44% da amostra foi formada por pardos, 41,4 % por brancos e 14% por negros. Quando comparado aos dados do censo demográfico de 2010 na população do estado da Bahia, os dados são equivalentes quanto a distribuição de cor, sugerindo não haver predomínio em determinado grupo. Não existem dados na literatura quanto a cor autodeclarada para comparação com os dados apresentados.

Apesar de ser uma doença observada desde o nascimento, a média de idade na primeira consulta foi de 8,8 anos, com o paciente mais jovem avaliado aos 65 dias de vida e o mais velho aos 49 anos. A maioria dos estudos nos quais esta informação está disponível, foram conduzidos em população pediátrica (KANG, et al., 2003; KIMBER et al., 2012). Esta informação não está disponível em estudos retrospectivos com grande número de casos (ADAMS, LAURENCE, MURPHY, 1998; WALLACH, et al., 2018), exceto no estudo de VALDÉS-FLORES et al.,2015, que relatam uma média de idade de 4.6 anos na primeira avaliação clínica. A demora para o diagnóstico causal da AMC tem importante impacto nos pacientes e suas famílias, tanto para aconselhamento genético, quanto para o início de terapia direcionada a aquisição de vida funcional independente, prevenção de complicações como fraturas, dor e escoliose, que ocorrem em algumas formas de AMC (GRIFFET et al., 2021). A constatação do retardo na avaliação especializada dos pacientes de nossa série aponta para a necessidade de medidas de esclarecimento de médicos,

enfermeira e das mães no período pré-natal da importância de, identificado o problema, o encaminhamento dos pacientes para diagnóstico etiológico preciso afim de orientação terapêutica.

6.3 CONSANGUINIDADE E HISTÓRIA FAMILIAR

Em 90,2 % dos pacientes não foram relatados casamentos consanguíneos e havia três casos de pais primos em primeiro grau. Na presente amostra, dados familiares de apenas uma paciente adotada não foram obtidos. Esta informação é relevante pois um número significativo de condições associadas às artrogriposes são de causa monogênicas, com padrão de herança autossômica recessiva (HALL, 2014; PEHLIVAN et al., 2019).

História familiar de ocorrência de casos em irmãos foi observada em três pacientes, todos com quadro mais grave e óbito precoce e que não tiveram diagnóstico etiológico definido. Nove pacientes tinham história familiar de casos de hipotonia ou contraturas articulares isoladas. Detalhes da história familiar são cruciais na avaliação de pacientes com artrogripose (STARELLI et al., 1998) e fornecem pistas para o diagnóstico etiológico, como nos casos de amiotrofia, de ocorrência sempre esporádica, não relacionadas a história familiar ou consanguinidade parental (HALL, KIMBER e TANAKA, 2014; GRIFFET et al., 2021). HALL, 2014 recomenda uma anamnese cuidadosa na história familiar, com informações de ao menos três gerações. As contraturas articulares podem variar em número e apresentação em pessoas afetadas de uma mesma família, e esta informação é útil para tentar estabelecer o padrão de herança e risco de recorrência (STARELLI et al., 1998).

6.4 ANTECEDENTES GESTACIONAIS E NEONATAIS

A história gestacional detalhada pode oferecer importantes informações sobre a possível causa da AMC, sobretudo quando há histórico de traumas, infecções, uso de medicações, drogas ou doenças preexistentes. (STARELLI et al., 1998, FILGES e HALL, 2013).

Na presente amostra, a maioria das gestações foram a termo, com idades gestacionais variando entre 37-41 semanas, semelhante aos dados da literatura, que não descreve partos prematuros associados a esta condição (FILGES e HALL,

2013; HALL 2014 e DIETERICH et al., 2019). A maioria dos partos foram cesarianos, em 22 pacientes, embora o diagnóstico pré-natal tenha sido feito em apenas 13 pacientes. Essa informação aponta para a necessidade de atenção sistemática dirigida a essas alterações nos exames morfológicos fetais do pré-natal. Nos pacientes com diagnóstico pré-natal de artrogripose, é recomendado o parto cesariano para evitar fraturas ao nascimento e melhor manejo do recém nascido (FILGES, TERCANLI e HALL 2019). A prevalência alta de partos cirúrgicos na nossa amostra deve-se provavelmente, a um maior número deste tipo de parto no Brasil que, segundo o Censo de 2010 do IBGE foi de 54,7% partos cesarianos e 45,3% de partos normais (IBGE, 2010) e não por diagnóstico pré-natal da artrogripose, que foi feito em cerca de 30% dos pacientes.

Não houve relato de doenças maternas preexistente e os relatos de intercorrências gestacionais foram descritos em 15 pacientes. STAHELLI et al., 1998; HALL, 2014 relatam que qualquer trauma, procedimento cirúrgico e infecção, sobretudo com presença de hipertermia, são potenciais causas de redução do movimento fetal intrauterino, sendo mais graves quanto mais precoces eles ocorrerem. Infecção urinária foi a complicação mais frequente em nossa amostra, com evento único em todos os pacientes, mas com necessidade de tratamento medicamentoso. Na literatura, não encontramos referências relacionando antibióticos específicos a contraturas articulares. . Essa é uma informação que mereceria ser resgatada, pois poderá trazer dados relevantes e eventualmente estabelecer nexos causais ou associativos com a manifestação clínica. Infecção urinária também foi a complicação infecciosa nos pacientes descritos por VALDÉS-FLORES et al., 2015, observada em 10% das gestações. HALL, KIMBERLY, TANAKA, 2014, na revisão de uma série de 560 pacientes com amiotasia, observou que em 76% das gestações havia relato de intercorrências, como vômitos, sangramento, infecção de trato urinário de repetição, hipertensão, febre e hipotireoidismo, com diferença estatisticamente significativa quando comparada a população normal.

Doença exantemática com febre foi descrita em dois pacientes que tiveram diagnóstico sorológico de infecção por *Zika virus*. Uma das crianças nasceu com microcefalia e características clínicas de infecção congênita pelo *Zika virus*. A infecção congênita causada pelo *Zika virus* foi descrita pela primeira vez no Brasil em 2016, cerca de 6 meses após os primeiros casos de infecção por este vírus

(BRASIL et al., 2016) e posteriormente foi associada à presença de artrogripose, com variados graus de envolvimento articular (VAN DER LINDEN et al., 2016), fazendo parte do espectro das manifestações neurológicas do vírus. Os mecanismos propostos para as contraturas articulares são a diminuição da ativação do trato corticoespinal dos neurônios motores da medula espinhal ou, lesão direta dos neurônios motores da medula espinhal, levando a imobilidade fetal, sobretudo se iniciado antes do quinto mês de gestação (DA SILVA PONE et al., 2017). Dois estudos brasileiros descrevem a prevalência de artrogripose entre os casos de embriopatia pelo *Zika virus*. MENEZES et al., 2017 reuniram 87 casos pernambucanos e em 18 deles (21%) havia contraturas articulares isoladas ou múltiplas. Outro estudo, de abrangência nacional, conduzido por DEL CAMPO et al., 2017, que propôs um protocolo para delinear o espectro fenotípico da embriopatia pelo *Zika virus* em 83 pacientes, encontrou uma prevalência de 42,1% de contraturas articulares, sendo 20,5% envolvendo punhos e camptodactilia, 15,7% envolvendo os pés e 9,6% com artrogripose múltipla. A baixa frequência de casos com embriopatia pelo *Zika virus* em nossa série deve decorrer da natureza do estudo com uma amostra de conveniência. Apesar do conhecimento atual sobre os mecanismos que levam a embriopatia pelo *Zika virus*, os pacientes foram incluídos no presente estudo pois foram encaminhados para avaliação no início deste estudo, quando não havia o conhecimento completo do padrão de envolvimento neurológico destas condições.

O uso de álcool foi relatado em uma pequena proporção de pacientes, com descontinuidade de uso com a descoberta da gravidez. Não houve relato de uso de drogas ilícitas. O álcool está associado a uma redução do movimento fetal intra-útero, podendo levar a uma contratura articular (HALL e REED, 1982; STAHELLI et al., 1998; HALL, 2014). Deve-se levar em consideração as dificuldades em se estabelecer com segurança o uso de álcool por gestantes e quantidades ingeridas.

6.5 ASPECTOS CLÍNICOS

As características fenotípicas descritas na presente casuística são similares às descritas em estudos prévios, como padrão de envolvimento articular, fossetas, pterígio, dentre outros, onde são descritos múltiplos fenótipos em doenças distintas. (AMBEGAONKAR et al., 2011; KIMBER et al., 2012; BAYRAM et al., 2016). Os

aspectos clínicos compilados foram relevantes para a caracterização fenotípica desta amostra. O exame físico e o histórico de nascimento são dados que permitem uma formulação diagnóstica com melhor acurácia (STARELI et al., 1998; DIETERICH et al, 2019). Achados dismorfológicos como palato ogival e micrognatia foram frequentes nesta amostra e possivelmente estão associados a consequência física de uma hipocinesia fetal (DIETERICH et al., 2019)

A descrição do padrão de envolvimento articular foi feita durante o exame físico da primeira consulta e registros fotográficos durante o período neonatal não estavam disponíveis na maioria dos casos, para melhor caracterização fenotípica, tendo em vista que muitos pacientes chegaram no serviço com idade avançada e/ou abordagens cirúrgicas ou clínicas prévias.

Nesta amostra, foram caracterizados, com base no exame físico, alguns grupos de doenças específicas, como os pacientes com síndrome de Beals, Escobar, Ehlers-Danlos musculo contractural, miopatias congênitas e sobretudo, amioplasias, cujo diagnóstico é essencialmente clínico (HALL, KIMBER, TANAKA, 2014).

6.6 EXAMES COMPLEMENTARES

A dosagem de CPK foi realizada em 39/41 pacientes. O resultado foi normal em 87,8% dos exames realizados e elevado em 7,3%, sugestivo de envolvimento neuromuscular. O nível sérico desta enzima foi utilizado como um exame inicial de triagem por ter baixo custo e cobertura pelo SUS. É utilizado como biomarcador para doenças neuromusculares há algumas décadas (FARDEAU e DESGUERRE, 2013).

Dois dos três pacientes com CPK elevada, apresentavam valores cinco a 10 vezes acima da referência de normalidade. O diagnóstico de distrofia muscular congênita, merosina negativa foi feito nestes dois pacientes (OMIM 607855). O paciente com CPK elevada 1,5 vezes maior que o valor de referência apresentava um envolvimento clínico significativo do SNC com alterações em RM de crânio.

Em estudo de revisão de avaliação diagnóstica de AMC, DIETERICH et al., 2019, encontrou treze artigos que relacionavam os níveis de CPK com AMC publicados entre os anos de 1996 e 2019. Valores considerados altos (acima de 10x o valor de referência), foram observados em distrofias musculares, em doenças do corno anterior da medula e na síndrome de Ehlers-Danlos musculocontractural.

Valores intermediários de CPK foram observados em processos neurogênicos, miopatias congênitas e formas distais de artrogripose (AMBERGAONKAR et al., 2011; JANECK et al., 2016). Em nossa casuística, o paciente classificado clinicamente como Ehlers-Danlos musculocontractural tinha o valor de CPK normal. A revisão realizada por DIETERICH et al., 2019, sugerem que níveis elevados de CPK são indicativos de distrofia muscular. Por outro lado, níveis intermediários são de mais difícil interpretação, pois podem ocorrer em outras doenças neuromusculares. Valores normais não afastam a possibilidade de miopatia congênita. Recomendam a dosagem de CPK como parte da investigação diagnóstica dos pacientes com AMC devido a boa relação custo efetividade deste teste quando comparado a outros exames (DIETERICH, et al., 2019). O exame de CPK, portanto, mostrou-se um importante exame de triagem, com bom custo-efetividade, e foi capaz de direcionar a investigação etiológica dos pacientes apresentados neste trabalho

Eletroneuromiografia foi realizada em 35 dos pacientes. Destes, dezesseis foram anormais, sendo o padrão miopático o mais frequente. Em um percentual elevado de pacientes foram encontradas alterações sugestivas de redução de unidades motoras, e este achado foi inconclusivo, não permitindo uma classificação topográfica, e não auxiliou no diagnóstico. Este padrão de redução de unidades motoras pode ser explicado por imobilidade de causa central ou dificuldade na realização do exame devido as contraturas articulares ou em caso de crianças, pela dificuldade de realização deste exame nestes pacientes (NORTH et al., 2014).

DIETERICH et al., 2019, ao revisar 16 artigos relacionando a utilização de ENMG para diagnóstico em AMC, conclui que é um exame com acurácia de 100% para diagnóstico de formas neurogênicas, mas com uma menor acurácia para processos musculares, tendo em vista que uma eletroneuromiografia normal não afasta o diagnóstico de doenças musculares, sobretudo miopatias congênitas. Este autor sugere a realização de ENMG apenas como segunda linha de investigação, quando existe dúvida entre causas neurogênicas ou miopáticas. No presente trabalho, a eletroneuromiografia não foi um exame complementar indispensável à conclusão diagnóstica, pois as alterações, quando observadas, foram em sua maioria, inespecíficas. Houve, ainda, pacientes com exame normal e com miopatia confirmados por biópsia muscular ou exame molecular. Portanto, no presente trabalho, a eletroneuromiografia não foi um exame indispensável para o diagnóstico.

Na presente casuística, alterações na biópsia muscular foram observadas em 41,4% dos 24 pacientes que realizaram este exame, sendo possível estabelecer um diagnóstico de miopatia em 33% dos exames anormais. Alterações inespecíficas como variação no calibre de fibras, atrofia discreta e predomínio de fibras do tipo 1 foram observados em seis pacientes. Esses achados foram considerados de significado indeterminado, e foram vistos predominantemente em pacientes com artrogripose distal, onde os estudos histopatológicos são limitados e o espectro das alterações histopatológicas desconhecidos por se tratar de condições raras (DUBOWITZ, SEWRY, OLDFORS, 2020).

O diagnóstico histológico definitivo foi feito sobretudo em pacientes que tinham uma clínica sugestiva de envolvimento muscular primário como hipotonia e progressão de escoliose ou elevação dos níveis de CPK. A biópsia muscular revelou achados interessantes como a presença de inclusões citoplasmáticas em um paciente com artrogripose e cardiopatia, e presença de mini cores em um paciente com artrogripose proximal e distal. Em ambos os pacientes não havia uma suspeita inicial de miopatia baseados apenas no fenótipo e dosagem de CPK, e a biópsia foi conclusiva. Não foi encontrada na literatura descrição similar ao paciente com inclusões citoplasmáticas (paciente n.07) e o caso com multi mini cores (paciente n.16) na histologia apresentava aspectos fenotípicos mais graves do que previamente descrito em literatura (NUCCI et al., 2004).

Os exames realizados em pacientes com amioplasia não apresentaram achados histopatológicos específicos, e variaram de escassez de tecido muscular a exames normais. Este dado é corroborado por estudos prévios que reforçam que o diagnóstico de amioplasia é essencialmente clínico e que dados de biópsia muscular não auxiliam no diagnóstico (HALL, 2014; DIETERICH et al., 2019; GRIFFET et al., 2021).

Nos pacientes com artrogripose distal que foram submetidos a biópsia muscular, os achados mais comuns foram variação no calibre de fibras e predomínio de fibras tipo 1. Eram pacientes com clínica compatível com síndrome de Freeman Sheldon e de Beals. Os achados histológicos de variação no calibre de fibras e atrofia seletiva de fibras tipo 1, são os mais comuns vistos em artrogripose distal, e são inespecíficos (DUBOWITZ, SEWRY, OLDFORS, 2020). Estas formas de artrogripose distal são causadas por mutações em genes codificadores de proteínas sarcoméricas, incluindo a beta tropomiosina (*TPM2*), troponina T rápida (*TTNT3*),

troponina I rápida (*TTNNI2*) e miosina embrionária de cadeia pesada (*MYH3*) (KIMBER et al., 2012). Nestes pacientes a microscopia eletrônica não forneceu resultados adicionais, com resultados normais em ambos os pacientes.

Não foram realizadas biópsias musculares em pacientes com clínica sugestiva de comprometimento do sistema nervoso central por não auxiliarem no diagnóstico (AMBEGAONKAR et al., 2011; DIETERICH et al., 2019).

As alterações histológicas observadas nesta casuística, sobretudo uma frequência alta de alterações musculares (dois pacientes com distrofia muscular congênita, três pacientes com miopatia congênita, um paciente com miopatia com características distróficas, um com miopatia com agregados citoplasmáticos), pode ser justificada pelo uso racional desta ferramenta diagnóstica, através de um protocolo baseado na clínica.

Apesar da descrição de cromossomopatias como causas frequentes de artrogripose (HALL, 2014), não foram encontradas alterações cromossômicas dentre os cariótipos realizados. (BI et al., 2013)

Dos 17 exames de SNP *array* realizados, nove apresentaram CNVs , em sua maioria descritas como variantes de significado indeterminado ou provavelmente patogênicas, não associadas aos fenótipos clínicos. Estas variantes não foram vistas nos genitores. Um dos pacientes apresentava uma CNV no exon 12 do gene *CENPF*, associado a síndrome de Stromme (OMIM 243605). É uma variante descrita como VUS e foi solicitado teste nos pais. A síndrome de Stromme foi descrita em 1993 por STROMME et al., em 1993, em dois irmãos apresentando atresia intestinal, alterações oculares e microcefalia. A etiologia permanece desconhecida e está associada a mutações no gene *CENPF*. Poucos casos são descritos na literatura, com variados graus de envolvimento cognitivo e malformações sistêmicas, como microftalmia e opacidade de córnea. Mais recentemente, ALGHAMDI et al., 2020, descreveu uma nova família com holoprosencefalia e óbito precoce, e com fenótipos variados em membros da mesma família. Inicialmente solicitamos a realização do SNP *array* do pai da criança (mãe com abandono) e posteriormente, caso o pai seja negativo, prosseguiremos o estudo molecular com sequenciamento de nova geração.

O paciente 21, classificado clinicamente como amioplasia, apresentou uma CNV em homozigose nos éxons 2-6 do gene *TNNT1*(OMIM 605355), que leva a uma miopatia congênita do tipo nemalínica tipo 5, fenótipo Amish, uma forma grave de

miopatia congênita, com contraturas articulares, e óbito precoce. Apesar desta variante ser considerada provavelmente patogênica, ela não deve ser a causadora da AMC neste paciente, que apresenta um quadro motor estável, com aquisição de marcha independente aos 50 meses, sem envolvimento respiratório ou fraqueza muscular, com biópsia muscular normal e com aspecto fenotípico de amioplasia nesta variante não estava presente em seus pais, sendo uma mutação *de novo*. Pela característica fenotípica deste paciente, com evolução benigna, esta CNV encontrada não deve ser a causadora da artrogripose, e todos os casos descritos até o momento associado ao fenótipo Amish apresentam óbito precoce. FOX et al., 2018, descrevem uma grande coorte de 106 pacientes de ancestralidade Amish nos Estados Unidos, entre os anos de 1923 à 2017 com média de sobrevida de 18 meses em 82% da amostra e 1 paciente vivo aos quatro anos de idade. Em todos os pacientes submetidos a biópsia muscular, haviam achados compatíveis com miopatia nemalínica, com corpos nemalínicos.

Dois pacientes apresentavam CNV classificadas como provavelmente patogênica (gene *DYSF*) e de significado incerto (gene *SPG7*), ambas em heterozigose. Os fenótipos descritos no OMIM são de manifestação na vida adulta e não foram encontradas publicações com variantes patogênicas nestes genes (*DYSF* e *SPG7*) e o fenótipo de AMC. Provavelmente estas variantes não são causadoras da artrogripose, sobretudo no paciente com CNV no gene *DYSF*, que apresenta biópsia de músculo normal. Os fenótipos descritos associados a variantes no gene *DYSF*, são de uma miopatia distal ou uma distrofia muscular com padrão tipo cintura membros, de manifestação não congênita e elevação dos níveis de CPK (OMIM. <https://www.omim.org/entry/603009?search=DYSF%20gene&highlight=dysf%20gene>). O paciente apresentado tem um fenótipo sugestivo de síndrome de Beals, com CPK, eletroneuromiografia e biópsia muscular normais.

Mutações no gene *SPG7* estão associadas a paraplegia espástica hereditária, caracterizada por uma fraqueza muscular progressiva, com sinais de envolvimento de neurônios do trato corticoespinhal. Os padrões de herança descritos são autossômico dominante e autossômico recessivo e existe uma variabilidade na gravidade das manifestações clínicas, com doença manifestando na vida adulta. Não foram descritas formas congênicas. O paciente com a variante no gene *SPG7* tem um fenótipo compatível com Ehlers Danlos músculo contractural. Esta variante

de significado incerto não é compatível com o fenótipo apresentado pelo paciente (OMIM. <https://www.omim.org/entry/607259?search=SPG7&highlight=spg7>).

As técnicas *array* são importantes ferramentas diagnósticas para casos de malformações (BI et al., 2013). Em seu trabalho de revisão sobre os principais exames para diagnóstico das AMC, baseado em revisão da literatura, DIETERICH, et al., 2019, conclui que as técnicas por *array* devem ser solicitadas nos casos de múltiplas malformações.

Os quatro pacientes que avaliaram o sequenciamento completo do exoma antes da biópsia muscular, tiveram resultados alterados. Foi visto em um par de gêmeas, uma variante de significado indeterminado no gene *MYH14*, que leva a um fenótipo de miopatia, neuropatia, surdez neurossensorial e rouquidão. Os poucos casos descritos apresentam uma variabilidade fenotípica intrafamiliar, que pode variar de quadros mais leves a comprometimento motor mais acentuado. A artrogripose não foi descrita como forma de apresentação clínica associada a variantes no gene *MYH14*, que codifica uma miosina de cadeia A variante está presente em heterozigose nestas pacientes e o pai delas também é portador dessa alteração. Os parâmetros *in silico* a descrevem como deletéria e as pacientes seguem em avaliação regular.

Um paciente da amostra foi diagnosticado com contraturas congênitas de membros e face, hipotonia e atraso no desenvolvimento (CLIFAHDD). Esta condição foi descrita pela primeira vez em 2013 como uma condição rara que leva a hipotonia, dismorfias faciais e atraso de linguagem. Poucos casos foram descritos até o momento. O paciente n. 41 tinha características fenotípicas similares a casos descritos na literatura (AL-SAYED, et al., 2013). O fenótipo é de uma artrogripose distal e o principal diagnóstico diferencial é com a síndrome de Freeman-Sheldon. CHONG et al., 2015, avaliaram uma coorte com 202 pacientes com fenótipo de artrogripose distal, sem diagnóstico genético e encontrou dez famílias com 14 variantes distintas, com fenótipos que variavam de quadros leves a marcada deficiência intelectual, sugerindo que este seja um gene pesquisado em casos de apresentação fenotípica de artrogripose distal. No Brasil não existem casos reportados com a síndrome CLIFAHDD.

Neste trabalho encontramos dois pacientes com diagnóstico histológico de miopatia congênita por desproporção congênita de tipo de fibras. As miopatia congênitas são um grupo de doenças heterogêneas, com variadas manifestações

clínicas, mas com características comuns, como início precoce de sintomas progressão lenta de doença, CPK normal e alterações histológicas que classificam as diferentes formas de miopatias congênitas. São causadas por mutações em diversos genes (NORTH, et al., 2014; CLAEYS, 2020).

A desproporção congênita de tipo de fibras é caracterizada por atrofia seletiva de fibras de tipo 1, com diâmetro 35% a 40% menor que fibras do tipo 2, sem anormalidades estruturais. Até o momento, 10 genes foram associados a esta condição, com padrão de herança dominante e recessivo. As mutações mais frequentes são nos genes que codificam α -tropomiosina (*TPM3*, 25-40%), receptor de rianodina 1 (*RYR1*, 20%) e α -actina (*ACTA1*, 5%). Raramente estão associadas aos genes *MYH7*, *SEPN1*, *MYL2*, *HACD1*, *TTN*, *SCN4A* e *TPM2* (CITIRAK et al., 2014; CLAYES, 2020). Uma das pacientes realizou o sequenciamento completo do exoma previamente à biópsia, com o encontro da variante c.502C>T p.(Arg168Cys) em heterozigose no gene *TPM3*, que pode estar associada a três fenótipos histológicos distintos: miopatia CAP, nemalínica e desproporção congênita de tipos de fibras. No caso descrito esta variante não estava associada ao fenótipo de AMC.

Nesta casuística portanto, um diagnóstico etiológico foi definido em 75,5% da amostra, com base em aspectos fenotípicos, eletroneuromiografia, ressonância de crânio, biópsia muscular e em estudos moleculares. As doenças neuromusculares formavam o maior grupo dos diagnósticos etiológicos. Em uma série retrospectiva, composta por 42 pacientes, WALLACH et al., 2018, definiram a etiologia 55% deles, com a maioria com envolvimento do SNC. Outras séries como a publicada por DARIN et al., 2002, descreveram o envolvimento do SNC como causa mais frequente de AMC, (34% de uma amostra composta por 68 pacientes), seguida por amioplasia e envolvimento da medula (24%) e causa neuromuscular (18%). Estes estudos não descrevem proporção de casos com investigação complementar, nem dados moleculares em todos os pacientes.

Os trabalhos de investigação de grandes séries de casos que utilizaram sequenciamento de nova geração, aliado ao fenótipo, apresentaram uma elevada proporção de casos com diagnóstico etiológico definitivo, como na série de BAYRAM et al., com 58,3% de diagnóstico molecular e 65,2% na casuística de PEHLIVAN et al. 2019. DIETERICH et al., 2019 na revisão dos exames complementares em artrogripose, encontrou 33 artigos onde foram utilizados sequenciamentos completos do exoma ou genoma como principal investigação de famílias ou grandes coortes

com resultados positivos na identificação de uma causa genética para AMC, sugerindo essas ferramentas como mais efetivas que biópsia muscular ou eletroneuromiografia para um diagnóstico preciso.

Embora a confirmação genética não tenha sido realizada na maioria dos pacientes desta amostra, a proporção elevada de diagnósticos etiológicos através deste protocolo de investigação proposto, permitiu uma intervenção clínica direcionada, com tratamento individualizado, aconselhamento genético e prognóstico dos casos, oferecendo assim uma melhor qualidade de vida e funcionalidade para estes pacientes.

6.7 FLUXOGRAMA DE INVESTIGAÇÃO

O fluxograma inicialmente proposto foi revisto após a avaliação dos casos clínicos e exames complementares. No novo fluxograma, o diagnóstico de amioplasia deve ser realizado baseado em história clínica e exame físico, sem necessidade de exame adicional, exceto RX de articulações (para decisão terapêutica), ECO e US de abdome (para investigação de alterações em outros órgãos). Os demais exames realizados nesta casuística (cariótipo, RM, biópsia e molecular), não revelaram informações adicionais para o diagnóstico. HALL et al., 2014 em avaliação de 135 pacientes com clínica compatível com amioplasia, não encontraram alterações em exames complementares, tornando este diagnóstico essencialmente clínico.

Os casos com artrogripose secundária à infecção congênita pelo *Zika virus* que foram incluídos na presente casuística foram encaminhados no início do projeto, e investigados quanto à natureza da AMC, quando não havia descrição de casos semelhantes na literatura, os quais foram descritos no Brasil no segundo semestre de 2016 por VAN DER LINDEN et al, 2016.

Neste novo fluxograma, o cariótipo permaneceu indicado para pacientes com suspeita de cromossomopatias e malformações múltiplas, tendo em vista que fora normal na totalidade dos casos desta casuística.

A ENMG deve ser realizada em casos sem envolvimento do SNC e naqueles com CPK normal para definição de topografia de lesão.

Os exames moleculares devem ser realizados após os exames complementares iniciais e a decisão de qual técnica molecular será empregada

diante da definição do fenótipo e exames. A técnica de SNP *array* deve ser empregada nos casos com malformações múltiplas. A escolha da técnica a ser empregada para a pesquisa de variantes em genes únicos ou múltiplos (por meio de painéis ou sequenciamento completo do exoma) também deve ser definida baseada no fenótipo e exames iniciais.

7 CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu as seguintes conclusões:

1. Foi identificada a etiologia das contraturas articulares em 75% da população estudada com base em achados clínicos e exames complementares;
2. A população estudada foi heterogênea nos aspectos demográficos e clínicos e, apesar disto, foi possível categorizar os pacientes em amiotrofia, causas com envolvimento do SNC, doenças neuromusculares e doenças do tecido conjuntivo;
3. Coleta de história clínica detalhada, com ênfase nos antecedentes maternos, gestacionais e neonatais, além de exame físico cuidadoso com atenção a envolvimento de outros sistemas, permitiram um direcionamento adequado para investigação etiológica nesta casuística, sem necessidade de exames de custo mais elevado;
4. A biópsia muscular demonstrou-se uma ferramenta importante para o diagnóstico da artrogripose, sobretudo se indicada em pacientes com suspeita clínica de envolvimento muscular. Nesta amostra foi possível definir o diagnóstico uma origem neurogênica, e de miopatias congênitas (core e desproporção congênita de tipo de fibras) e distrofia muscular congênita por deficiência de miosina;
5. O uso de microscopia eletrônica na patologia muscular e os exames de cariótipo e SNP *array* realizados nos pacientes desta amostra não contribuíram para um diagnóstico etiológico, não sendo possível definir genes candidatos por esta técnica;
6. O protocolo elaborado como guia diagnóstico foi capaz de discernir a etiologia da maioria dos casos nesta população;

7. O diagnóstico de amíoplasia nesta casuística foi baseado em história e exame clínico, com pouco auxílio diagnóstico o uso de exames complementares como a dosagem de CPK, eletroneuromiografia, biópsia muscular ou testes moleculares

LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Apesar da definição clínica de causa da artrogripose em 75% da amostra, baseado em exames clínicos e complementares, um diagnóstico genético não foi realizado na maioria dos pacientes por falta de acesso a exames de sequenciamento de nova geração,

Não foi possível a realização de biópsia muscular em todos os pacientes com indicação e uma das razões é a inexistência de um serviço estruturado de patologia muscular pelo SUS.

REFERÊNCIAS

ADAMS, C.; BECKER, L.E.; MYRPHY, E.G. Neurogenic arthrogryposis multiplex congenita: Clinical and Muscle Biopsy Findings. **Pediatr Neurosci**, New York, v. 14, n. 2, p. 97-102, 1988.

AL-SAYED, M.D. *et al.* Mutations in NALCN Cause an Autosomal-Recessive Syndrome with Severe Hypotonia, Speech Impairment, and Cognitive Delay. **Am J Hum Genet**, Baltimore, v. 93, n. 4, p.721-6. oct.2013.

ALGHAMDI M., *et al.* Expanding the phenotype and the genotype of Stromme syndrome: A novel variant of the CENPF gene and literature review. **Eur J Med Genet**, Amsterdam, v.63, n.5, p.103844, Jan. 2020.

AMBEGAONKAR, G. *et al.* The multiple phenotypes of arthrogryposis multiplex congenita with reference to the neurogenic variant. **Eur J Paediatr Neurol**, London, v. 15, n. 4, p.316-319, Jul. 2011.

BAMSHAD, M.; VAN HEEST, A. E; PLEASURE, D. Arthrogryposis: a review and update. **J Bone Joint Surg Am**, Boston, v. 91, suppl 4, p. 40-46, Jul. 2009.

BATY, B. J. *et al.* Prenatal diagnosis of distal arthrogryposis. **Am J Med Genet**, New York, v. 29, n. 3, p. 501–510, Mar. 1988.

BAYRAM, Y. *et al.* Molecular etiology of arthrogryposis in multiple families of mostly Turkish origin. **J Clin Invest**, Ann Arbor, v. 126, n. 2, p. 762-778, Feb. 2016.

BI, W. *et al.* Comparison of chromosome analysis and chromosomal microarray analysis: what is the value of chromosome analysis in today's genomic array era? **Genet Med**, Baltimore, v. 15, n. 6, p.450-457, Jun. 2013.

BONNEMANN, C. G. *et al.* Diagnostic approach to the congenital muscular dystrophies. **Neuromuscul Disord**, Oxford, v. 24, n. 4, p. 289-311, Apr. 2014.

CACHECHO, S. *et al.* Arthrogryposis multiplex congenita definition: Update using an international consensus-based approach. **Am J Med Genet C Semin Med Genet**, Hoboken, v. 181, n. 3, p. 280-287, Sep. 2019.

CITIRAK, G. *et al.* Frequency and phenotype of patients carrying TPM2 and TPM3 gene mutations in a cohort of 94 patients with congenital myopathy. **Neuromuscul Disord**, Oxford, v. 24, n. 4, p. 325–330, Apr. 2014.

CHONG, J.X. *et al.*, De novo mutations in NALCN cause a syndrome characterized by congenital contractures of the limbs and face, hypotonia, and developmental delay. **Am J Hum Genet**, Baltimore, v.96, n.3, p.462-73, Feb.2015.

CLAYES KG. Congenital myopathies: an update. **Dev Med Child Neurol.**, London, v. 62, n.3, p. 297-302, Mar. 2020

DARIN, N. *et al.* Multiple congenital contractures: birth prevalence, etiology, and outcome. **J Pediatr**, Saint Louis, v. 140, n. 1, p. 61-67, Jan. 2002.

DA SILVA PONE, M. V. S., *et al.* Zika virus infection in children: epidemiology and clinical manifestations. **Childs Nerv Syst**, Berlin, v. 34, n. 1, p. 63-71, Jan. 2018.

DEL CAMPO, M, *et al.* The phenotypic spectrum of congenital Zika syndrome. **Am J Med Genet A**, Hoboken, v.173, n.4, p.841-857, Apr.2017.

DIETERICH, K. *et al.* The diagnostic workup in a patient with AMC: Overview of clinical evaluation and paraclinical analysis with review of the literature. **Am J Med Genet C Semin Med Genet**, Hoboken, v. 181, n. 3, p. 337-344, Sep. 2019.

DIETERICH, K.; KIMBER, E.; HALL, J. G. Central nervous system involvement in arthrogryposis multiplex congenita: Overview of causes, diagnosis, and care. **Am J Med Genet C Semin Med Genet**, Hoboken, v. 181, n. 3, p. 345-353, Sep. 2019.

DIMITRAKI, M. *et al.* Prenatal assessment of arthrogryposis. A review of the literature. **J Matern Fetal Neonatal Med.**, London, v. 24, n. 1, p. 32-36, Jan. 2011.

DUBOWITZ V, SEWRY CA, OLDFORS A. **Muscle biopsy: a practical approach**. 5th ed. Londres: Elsevier, 2020. 600 p.

ENGEL, A. G. *et al.* Congenital myasthenic syndromes: pathogenesis, diagnosis, and treatment. **Lancet Neurol**, London, v. 14, n. 4, p. 420-434, Apr. 2015.

EYMARD, B. Antibodies in myasthenia gravis. **Rev Neurol (Paris)**, Paris, v. 165, n. 2, p. 137-143, févr. 2009.

FARDEAU, M; DESGUERRE, I. Diagnostic workup for neuromuscular diseases. *In*: Dulac, O.; Lasselonde, M; Sarnat, H. B. **Handbook of Clinical Neurology**. New York: Editora Elsevier. 2013. v. 113, Ch. 136 , p. 1291-1297.

FARDEAU M. About the technique of muscle biopsy - A historical flash-back on the technique of muscle biopsie. **Med Sci (Paris)**, Paris, v. 31, n. 3, p. 7-1, nov. 2015.

FILGES, I.; HALL, J. G. Failure to identify antenatal multiple congenital contractures and fetal akinesia – proposal of guidelines to improve diagnosis. **Prenat Diagn**, New

York, v. 33, n. 1, p. 61–74, Jan. 2013.

FILGES, I; TERCANLI S; HALL J.G. Fetal arthrogryposis: Challenges and perspectives for prenatal detection and management. **Am J Med Genet C Semin Med Genet**, Hoboken, v.181, n.3, p;327-336, Sep.2019.

FOX M.D. *et al.* TNNT1 nemaline myopathy: natural history and therapeutic frontier. **Hum. Molec. Genet**, Oxford, v. 27, p. 3272-3282, Sep. 2018.

GEOFFROY V.*et al.* AnnotSV: an integrated tool for structural variations annotation. **Bioinformatics**, Oxford, v. 34, n.20, p.3572-3574, Oct. 2018.

GILBREATH, H. R.; CASTRO, D.; JONNACCONE, S. T. Congenital myopathies and muscular dystrophies. **Neurol Clin**, Philadelphia, v. 32, n. 3, p. 689-703. Aug 2014.

GONZALES, C. H.*et al.* Congenital abnormalities in Brazilian children associated with misoprostol misuse in first trimester of pregnancy. **Lancet**, London, v. 351, n. 9116, p. 1624-1627, May 30. 1998.

GORDON, E. C. Arthrogryposis multiplex congenita. **Dev Med Child Neurol**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 80-83, Jan. 1996.

GRIFFET, J. *et al.* Amyoplasia and distal arthrogryposis. **Orthop Traumatol Surg Res**, Issy les Moulineaus, v.107, n.1S, p.1027-81, Feb. 2021.

HALL, J. G. An approach to congenital contractures (arthrogryposis). **Pediat Ann**, New York, v. 10, n. 7, p. 15-26, Jul. 1981.

HALL J.GREED S.D. Teratogens associated with congenital contractures in humans and in animals. **Teratology**, New York, v.25, n.2, p.173-91, Apr.1982.

HALL, J. G. Pena-Shokeir phenotype (Fetal akinesia deformation sequence) revisited. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, Hoboken, v. 85, n. 8, p. 677-694, Aug. 2009.

HALL, J. G. Arthrogryposis (multiple congenital contractures) associated with failed termination of pregnancy. **Am J Med Genet A**, Hoboken, v. 158A, n. 9, p. 2214-2220, Sep. 2012.

HALL, J. G; KIMBER A.A;TANAKA A.I. Amyoplasia Revisited. **Am J Med Genet A**, Hoboken, v. 164A, n. 3, p. 700-730, Mar. 2014.

HALL, J. G. Arthrogryposis (multiple congenital contractures): Diagnostic approach to etiology, classification, genetics, and general principles. **Eur J Med Genet**, Amsterdam, v. 57, n. 8, p. 464-472, Aug. 2014.

HALL, J. G.; KIMBER, E.; VAN BOSSE, H. J. P. Genetics and Classifications. **J Pediatr Orthop**, Philadelphia, v. 37, Suppl 1, p. S4-S8, Jul/ Aug. 2017.

HALL, J. G; KIMBER, E.; DIETERICH, K. Classification of arthrogyrosis. **Am J Med Genet C Semin Med Genet**, Hoboken, v. 181, n. 3, p. 300-303. Sep. 2019.

HANTAI, D. *et al.* Congenital myasthenic syndromes. **Curr Opin Neurol**, Philadelphia, v. 17, n. 5, p. 539-551, Oct. 2004.

HOFF, J. M. *et al.* Arthrogyrosis multiplexa congenita : an epidemiologic study of nearly 9 million births in 24 EUROCAT registers. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, Limerick, v. 159, n. 2, p. 347-350, Dec. 2011.

HOFMANN, K. *et al.* Myasthenia and arthrogyrosis multiplex congenita. **Neuromuscul Disord**, Oxford, v. 17, n. 9-10, p. 819-820, Oct. 2007.

HOFMANN, K. *et al.* 7 Mb de novo deletion within 8q21 in a patient with distal arthrogyrosis type 2B (DA2B). **Eur J Med Genet**, Amsterdam, v. 54, n. 5, p. 495-500, Sep-Oct. 2011.

HUNTER, J. M. *et al.* Review of X-linked syndromes with arthrogyrosis or early contractures – aid to diagnosis and pathway identification. **Am J Med Genet A**, Hoboken, v. 167A, n. 5, p. 931-973, May. 2015.

JACKSON M. *et al.* The genetics basis of diseases. **Essays Biochem**, London, v. 62, n. 5, p. 643-723, Dec 2. 2018.

JANECKE, A.R.*et al.* The phenotype of the musculocontractural type of Ehlers-Danlos syndrome due to CHST14 mutations. **Am J Med Genet A**, Hoboken, v. 170A, n 1, p. 103-115, Jan. 2016.

KANG P.B. *et al.* Diagnostic value of electromyography and muscle biopsy in arthrogyrosis multiplex congenita. **Ann Neurol**, Boston, v.54, n.6, p.790-5, Dec.2003.

KALAMPOKAS, E. *et al.* Diagnosing arthrogyrosis multiplex congenita: a review. **ISRN Obstet Gynecol**, New York, 2012;2012:264918. doi: 10.5402/2012/264918.

KIMBER, E. *et al.* Distal arthrogyrosis: clinical and genetic findings. **Acta Paediatr**, Oslo, v. 101, n. 8, p. 877-887, Aug. 2012.

LEUNG, D. G.; WAGNER, K. R. Therapeutic advances in muscular dystrophy. **Ann Neurol**, Boston, v. 74, n. 3, p. 404-411, Sep. 2013.

LOWRY, R. B. *et al.* Prevalence of multiple congenital contractures including arthrogryposis multiplex congenita in Alberta, Canada and a strategy for classification and coding. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, Hoboken, v. 88, n. 12, p. 1057-1061, Dec. 2010.

MENESES, J. A. *et al.* Lessons Learned at the Epicenter of Brazil's Congenital Zika Epidemic: Evidence From 87 Confirmed Cases. **Clin Infect Dis**, Chicago, v. 64, n. 10, p. 1302-1308, May15. 2017.

MIGNOT, C. *et al.* Perinatal-lethal Gaucher disease. **Am J Med Genet**, Hoboken, v. 120A, n. 3, p. 338-344, Jul 30. 2003.

MIKELL, C. B. *et al.* Muscle and nerve biopsies: Techniques for the neurologist and neurosurgeon. **Clinical Neurol Neurosurg**, Amsterdam, v. 115, n. 8, p. 1206-1214, Aug. 2013.

MOTTA, V. T. Enzimas. *In*: MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica para o laboratório – princípios e interpretações**. Rio de Janeiro; medBook Editora, 2009. cap. 9, p. 89 – 114.

NORTH, K. N. *et al.* Approach to the diagnosis of congenital myopathies. **Neuromuscul Disord**, Oxford, v. 24, n. 2, p. 97-116, Feb. 2014.

NUCCI, A. *et al.* Multi-minicore disease revisited. *Arq Neuropsiquiatr*, São Paulo, v. 62, n. 4, p. 935-939, dez. 2004.

OMIM[®] Online Mendelian Inheritance in Man[®]. **An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders**. Disponível em <https://www.omim.org/>. Acesso em: 25 abr.2021.

PEHLIVAN D. *et al.* The Genomics of Arthrogryposis, a Complex Trait: Candidate Genes and Further Evidence for Oligogenic Inheritance. **Am J Hum Genet**, Baltimore,v.105,n.1,p.132-150,jun.2019.

RIGGS E.R. *et al.* Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). **Genet Med**, Baltimore, v.22, n.2, p. 245-27,feb.2020.

RAMACHANDRAN, M.; ARONSON, J. K. The diagnosis of art: Arthrogryposis and Ribera's The Clubfoot. **J R Soc Med**, London, v. 99, n . 6, p. 321-322, Jun. 2006.

SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DA BAHIA. SESAB. **Plano Diretor de Regionalização**, Salvador 2020, 10 p. Disponível em <http://www.saude.ba.gov.br/municipios-e-regionalizacao/>. Acesso em: 02 abr. 2021.

SELLS, J. M.; JAFFE, K. M.; HALL, J.G. Amyoplasia, the most common type of arthrogryposis: the potential for good outcome. **Pediatrics**, Springfield, v. 97, n. 2, p. 225-231, Feb. 1996.

SHAIBANI, A. *et al.* Diagnostic outcome of muscle biopsy. **Muscle Nerve**, New York, v. 51, n. 5, p. 662-668, May. 2015.

SHAPIRO, B. E.; KARTIJI, B; PRESTON, D. C. Clinical electromyography (nerve conduction studies and needle electromyography). *In*: KARTIJI B, KAMINSKI HJ, RUFF RL. **Neuromuscular disorders in clinical practice**. London: Editora Springer 2014. Chapter 7, p. 89 – 152.

STAHOLI, L. T. *et al.* Arthrogryposis a text atlas. 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. 198p.

STROMME P. *et al.*, Apple peel intestinal atresia in siblings with ocular anomalies and microcephaly. *Clin Genet*, Copenhagen, v.44,n.4,p.208-10, Oct.1993.

SWINYARD, C. A. Concepts of multiple congenital contractures (arthrogryposis) in man and animals. **Teratology**, New York, v. 25, n. 2, p. 247-259, Apr. 1982.

TAYSHARGHI H. *et al.* Myopathies associated with β - tropomyosin mutations. **Neuromuscul Disord**, Oxford, v. 22, n. 11, p. 923-933, Nov. 2012.

TETREAULT, M.*et al.* Whole-exome sequencing as a diagnostic tool: current challenges and future opportunities. **Expert Rev Mol Diagn**, Oxford, v. 15, n. 6, p. 749-760, Jun. 2015.

TURNER, C; HILTON-JONES, D. Myotonic dystrophy: diagnosis, management and new therapies. **Curr Opin Neurol**, London, v. 27, n.5, p. 599-606, Oct. 2014.

UDD, B. *et al.* 1st ENMC European meeting: The EURO-NMD pathology working group Recommended Standards for Muscle Pathology Amsterdam, The Netherlands, 7 December 2018. **Neuromuscul Disord**, Oxford, v. 29, n. 6,p. 483-485, Jun. 2019.

VALDÉS-FLORES M. *et al.* Characterization of a group unrelated patients with arthrogryposis multiplex congênita. **J Pediatr**, Rio de Janeiro, v.92,n.1,p.58-64, Jan 2016.

VAN DER LINDEN, V. *et al.* Congenital *Zika* syndrome with arthrogryposis: retrospective case series study. **BMJ**, London, v. 354, i3899, Aug 9. 2016.

WALLACH, E. *et al.* Arthrogryposis in children: Etiological assessments and preparation of a protocol for etiological investigations. **Arch Pediatr**, Paris, v. 25, n. 5, p. 322-326, jun15. 2018.

ANEXOS

ANEXO 1 Lista dos principais genes, proteínas codificadas e suas funções, que podem estar associados a artrogripose e doenças neuromusculares

Gene	Proteína / função *
<i>ACTA1</i>	Codifica proteína alfa 1 actina, importante para contração muscular
<i>AGRN</i>	Codifica proteínas que são responsáveis pelo desenvolvimento da junção neuromuscular, como a agrina
<i>CFL2</i>	Codifica uma proteína intracelular envolvida com a regulação da dinâmica dos filamentos de actina
<i>CHAT</i>	Codifica a proteína colina acetiltransferase. Esta proteína está localizada nos terminais pré-sinápticos dos nervos periféricos
<i>CHRNA1</i>	Codifica a subunidade alfa do receptor de acetilcolina da membrana pós-sináptica
<i>CHRNB1</i>	Codifica a subunidade beta do receptor de acetilcolina da membrana pós-sináptica
<i>CHRND</i>	Responsável por manter a conformação em 5 subunidades do receptor de acetilcolina
<i>CHRNE</i>	Codifica a subunidade épsilon do receptor de acetilcolina da membrana pós-sináptica
<i>CHRNG</i>	Codifica a subunidade gama do receptor de acetilcolina da membrana pós-sináptica
<i>COL6A1</i>	Codifica a cadeia alfa 1 do colágeno tipo VI. Esta cadeia combina com cadeias produzidas a partir de outros genes para produzir uma molécula completa de colágeno tipo VI, que é uma proteína flexível encontrada no espaço que envolve as células
<i>COL6A2</i>	Codifica a cadeia alfa 2 do colágeno tipo VI.
<i>COL6A3</i>	Codifica a cadeia alfa 3 do colágeno tipo VI.
<i>DOK7</i>	Codifica a proteína Dok-7 que é responsável por ativar a proteína MuSK, que desempenha um papel fundamental na organização de várias proteínas importantes para o desenvolvimento e manutenção da junção neuromuscular.
<i>FCMD</i>	Codifica a proteína fukutina, que está ligada ao complexo de Golgi em músculos cardíaco e esquelético
<i>HSPG2</i>	Codifica a proteína perlecan, presente na matriz extracelular,
<i>KBTBD13</i>	Codifica uma proteína KBTB13, uma ubiquitina ligase, presente no músculo esquelético, de função desconhecida
<i>KLHL40</i>	Codifica uma proteína ubiquitina ligase, de função desconhecida
<i>LAMA2</i>	Lamina 2- proteína constituinte da membrana sináptica
<i>LAMB2</i>	Codifica a cadeia beta da laminina, uma glicoproteína de matriz extracelular
<i>LARGE</i>	Codifica a proteína LARGE1, envolvida em processos de glicosilação no músculo esquelético
<i>LRP4</i>	codifica um membro da família de proteínas relacionadas ao receptor de lipoproteína de baixa densidade, que participa da manutenção da junção neuromuscular

*Genetics Home references. National Institutes of Health and Gene reviews. University of Washington, Seattle

ANEXO 2 Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Estudo: **Caracterização clínica, morfológica e molecular das artrogiroses de causa neuromuscular**

Pesquisador Responsável: Marcela Câmara Machado Costa

O (A) Senhor (a) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa. Por favor, leia este documento com bastante atenção antes de assiná-lo. Caso haja alguma palavra ou frase que o (a) senhor (a) não consiga entender, converse com o pesquisador responsável pelo estudo ou com um membro da equipe desta pesquisa para esclarecê-los.

A proposta deste termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) é explicar tudo sobre o estudo e solicitar a sua permissão para participar do mesmo.

OBSERVAÇÃO: Caso o paciente não tenha condições de ler e/ou compreender este TCLE, o mesmo poderá ser assinado e datado por um membro da família ou responsável legal pelo paciente.

Objetivo do Estudo

Os objetivos do estudo são:

1. Realizar o diagnóstico da causa da artrogirose de causa muscular por biópsia muscular e análise molecular
 2. Estabelecer a frequência das principais causas das artrogiroses atendidas no ambulatório de referência em doenças neuromusculares do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES)
-

Duração do Estudo

A duração total do estudo é de 2 (dois) anos

A sua participação no estudo será de aproximadamente 2 (dois) anos

Descrição do Estudo

Participarão do estudo aproximadamente 30 indivíduos.

Este estudo será realizado (informar a unidade/órgão): Serviço de Genética Médica do Hospital Universitário Professor Edgard Santos e no Laboratório de Patologia e Biointervenção do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz- Fiocruz/Bahia

O (a) Senhor (a) foi escolhido (a) a participar do estudo porque apresenta clinicamente contraturas em mais de duas articulações do corpo, chamadas de artrogiroses, desde o nascimento. Muitas doenças causam essa artrogirose e estas causas devem ser esclarecidas para melhor tratamento clínico e aconselhamento genético, ou seja, para orientação dos riscos de novos familiares apresentarem a doença.

O (a) Senhor (a) não poderá participar do estudo se: não assinar o termo de consentimento livre e esclarecido

Procedimento do Estudo

Após entender e concordar em participar, serão realizados:

1. Avaliação clínica com exame neurológico: realizada pela pesquisadora, com informações sobre as contrações das articulações e exame neurológico;
-

-
2. Realização de eletroneuromiografia: exame realizado de rotina, por neurologista, onde são avaliados os nervos periféricos e músculos, por meio de realização de teste com eletrodos em pele e agulha estéril; este é um exame amplamente realizado de rotina;
 3. Realização de biópsia de músculo: é retirado um pedaço do músculo para avaliação no laboratório. As biópsias serão feitas no músculo deltoide esquerdo, localizado no braço ou em quadríceps, localizado na parte lateral da coxa. As biópsias serão realizadas após a aplicação de anestésico local, com a abertura da pele com um bisturi e retirada de três pedaços de músculo de cerca de 0,5 centímetros. Por fim, serão dados pontos para fechar o local da biópsia, o qual poderá ser retirado no ambulatório de doenças neuromusculares após 7 dias, pela pesquisadora Marcela Costa. Esse procedimento não é experimental, sendo utilizado na prática médica para o estudo do músculo;
 4. Coleta de sangue periférico para análise de DNA: coleta de sangue por punção periférica de 10 ml de sangue da veia do antebraço, e colocado em tubo com EDTA para avaliação do DNA.

Descrever como os resultados dos exames estarão disponíveis, por exemplo: Os resultados dos exames serão fornecidos aos pacientes após realização e processamento do material, de acordo com resultados encontrados na eletroneuromiografia, biópsia de músculo e análise de DNA e poderão ser entregues pelo próprio pesquisador ou retirado no Serviço de Genética Médica do 6 andar do Hospital Universitário Professor Edgard Santos

Riscos Potenciais, Efeitos Colaterais e Desconforto

Biópsia de músculo: O procedimento da biópsia pode ser um pouco doloroso, mas *tem riscos mínimos*, como o hematoma. Além disso, todo o material utilizado para a biópsia será *esterilizado*, de tal forma que o risco de infecção local é pequeno. Raramente ocorre desmaios no momento da coleta.

Coleta de sangue: dor, hematoma ou pequeno desconforto no local da coleta. Raramente desmaios ou infecções no local da punção podem ocorrer

Benefícios para o participante

Não há benefício direto para o participante desse estudo. Trata-se de estudo clínico testando a hipótese de que muitas causas de artrogriposes de devem a causa neuromuscular.

Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício. Porém, os resultados obtidos com este estudo poderão ajudar a conhecer melhor essas doenças e melhor tratamento a depender da causa da artrogripose.

Compensação

Você não receberá nenhuma compensação para participar desta pesquisa e também não terá nenhuma despesa adicional.

Participação Voluntária/Desistência do Estudo

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária, ou seja, você somente participa se quiser.

A não participação no estudo não implicará em nenhuma alteração no seu acompanhamento médico tão pouco alterará a relação da equipe médica com o mesmo. Após assinar o consentimento, você terá total liberdade de retirá-lo a qualquer momento e deixar de participar do estudo se assim o desejar, sem quaisquer prejuízos à continuidade do tratamento e acompanhamento na instituição.

Novas Informações

Quaisquer novas informações que possam afetar a sua segurança ou influenciar na sua decisão de continuar a participação no estudo serão fornecidas a você por escrito. Se você decidir continuar neste estudo, terá que assinar um novo (revisado) Termo de Consentimento Informado para documentar seu conhecimento sobre novas informações.

Em Caso de Danos Relacionados à Pesquisa

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Utilização de Registros Médicos e Confidencialidade

Todas as informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade (segredo) do paciente a todo o momento, ou seja, em nenhum momento os dados que o identifique serão divulgados, a menos que seja exigido por lei.

Os registros médicos que trazem a sua identificação e esse termo de consentimento assinado poderão ser inspecionados por agências reguladoras e pelo CEP.

Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em reuniões ou publicações, contudo, sua identidade não será revelada nessas apresentações.

Quem Devo Entrar em Contato em Caso de Dúvida

Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os responsáveis pelo estudo nesta instituição são Marcela Câmara Machado Costa, Angelina Xavier Acosta, Sócrates Bezerra de Matos, Emília Katiane Embiruçu Leão, que poderão ser encontrados no endereço: Rua Augusto Viana S/N, 6º andar do Hospital Universitário Professor Edgard Santos ou nos respectivos telefones: 71 32838109 ou 7188922458.

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar:

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: MARCELA CÂMARA MACHADO COSTA
ENDEREÇO: SERVIÇO DE GENÉTICA MÉDICA- RUA AUGUSTO VIANA, S/N
ANDAR: 6º ANDAR HORÁRIOS DE ATENDIMENTO: SEGUNDA A SEXTA FEIRA DAS 7:00 ÀS 16 H
SALVADOR (BA) - CEP: 40110060
FONE: (71) 32838109 / E-MAIL: MARCELACMCOSTA@GMAIL.COM

CEP/HUPES- COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROF. EDGARD SANTOS- UFBA
SALVADOR (BA) - CEP: 4011060
FONE: (71) 3283-8043 / E-MAIL: cep.hupes@gmail.com

Declaração de Consentimento

Concordo em participar do Estudo intitulado: "**Caracterização clínica, morfológica e molecular das artrogrupos múltiplas de causa neuromuscular**"

Li e entendi o documento de consentimento e o objetivo do estudo, bem como seus possíveis riscos e benefícios. Tive a oportunidade de perguntar sobre o estudo e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Entendo que estou livre para decidir não participar desta pesquisa. Entendo que ao assinar este documento, não estou abdicando de nenhum dos meus direitos legais.

Eu autorizo a utilização dos meus registros médicos (prontuário médico) pelo pesquisador, autoridades regulatórias e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição.

Nome do Sujeito de Pesquisa Letra de Forma ou à Máquina

Data

Assinatura do Sujeito de Pesquisa

Nome do Representante Legal do Sujeito de Pesquisa Letra de Forma ou à Máquina (quando aplicável)

Data

Assinatura do Representante Legal do Sujeito de Pesquisa (quando aplicável)

Nome da pessoa obtendo o Consentimento

Data

Assinatura da Pessoa Obtendo o Consentimento

Nome do Pesquisador Principal

Data

Assinatura e Carimbo do Pesquisador Principal

ANEXO 3 TCLE pais /responsáveis por menores

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pais/responsáveis por menores

Título do Estudo: **Caracterização clínica, morfológica e molecular das artrogrupos de causa neuromuscular**

Pesquisador Responsável: Marcela Câmara Machado Costa

O (A) seu filho (a) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa. Por favor, leia este documento com bastante atenção antes de assiná-lo. Caso haja alguma palavra ou frase que o (a) senhor (a) não consiga entender, converse com o pesquisador responsável pelo estudo ou com um membro da equipe desta pesquisa para esclarecê-los.

A proposta deste termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) é explicar tudo sobre o estudo e solicitar a sua permissão para que seu filho (a) possa participar do mesmo, após a sua aceitação e do seu filho (a) , através da assinatura da criança do TERMO DE ASSENTIMENTO PARA MENORES

OBSERVAÇÃO: Caso o paciente não tenha condições de ler e/ou compreender este TCLE, o mesmo poderá ser assinado e datado por um membro da família ou responsável legal pelo paciente.

Objetivo do Estudo

Os objetivos do estudo são:

1. Realizar o diagnóstico da causa da artrogrupos de causa muscular por biópsia muscular e análise molecular
 2. Estabelecer a frequência das principais causas das artrogrupos atendidas no ambulatório de referência em doenças neuromusculares do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES)
-

Duração do Estudo

A duração total do estudo é de 2 (dois) anos. A participação do seu filho(a) no estudo será de aproximadamente 2 (dois) anos

Descrição do Estudo

Participarão do estudo aproximadamente 30 indivíduos.

Este estudo será realizado no Serviço de Genética Médica do Hospital Universitário Professor Edgard Santos e no Laboratório de Patologia e Biointervenção do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz- Fiocruz/Bahia

O (a) seu filho (a) foi escolhido (a) a participar do estudo porque apresenta clinicamente contraturas em mais de duas articulações do corpo, chamadas de artrogrupos, desde o nascimento. Muitas doenças causam essa artrogrupos e estas causas devem ser esclarecidas para melhor tratamento clínico e aconselhamento genético, ou seja, para orientação dos riscos de novos familiares apresentarem a doença.

O (a) seu filho (a) não poderá participar do estudo se: não assinar o termo de consentimento livre e esclarecido e seu filho(a) não concordar em participar do estudo ou assinar o termo de assentimento para menores

Procedimento do Estudo

Após entender e concordar em participar, serão realizados:

1. Avaliação clínica com exame neurológico: realizada pela pesquisadora, com informações sobre as contrações das articulações e exame neurológico;
 2. Realização de eletroneuromiografia: exame realizado de rotina, por neurologista, onde são avaliados os nervos periféricos e músculos, por meio de realização de teste com eletrodos em pele e agulha estéril; este é um exame amplamente realizado de rotina;
 3. Realização de biópsia de músculo: é retirado um pedaço do músculo para avaliação no laboratório. As biópsias serão feitas no músculo deltoide esquerdo, localizado no braço ou em quadríceps, localizado na parte lateral da coxa. As biópsias serão realizadas após a aplicação de anestésico local, com a abertura da pele com um bisturi e retirada de três pedaços de músculo de cerca de 0,5 centímetros. Por fim, serão dados pontos para fechar o local da biópsia, o qual poderá ser retirado no ambulatório de doenças neuromusculares após 7 dias, pela pesquisadora Marcela Costa. Esse procedimento não é experimental, sendo utilizado na prática médica para o estudo do músculo;
 4. Coleta de sangue periférico para análise de DNA: coleta de sangue por punção periférica de 10 ml de sangue da veia do antebraço, e colocado em tubo com EDTA para avaliação do DNA.
-

Os resultados dos exames serão fornecidos aos pacientes após realização e processamento do material, de acordo com resultados encontrados na eletroneuromiografia, biópsia de músculo e análise de DNA e poderão ser entregues pelo próprio pesquisador ou retirado no Serviço de Genética Médica do 6 andar do Hospital Universitário Professor Edgard Santos

Riscos Potenciais, Efeitos Colaterais e Desconforto

Biópsia de músculo: O procedimento da biópsia pode ser um pouco doloroso, mas tem riscos mínimos, como o hematoma. Além disso, todo o material utilizado para a biópsia será esterilizado, de tal forma que o risco de infecção local é pequeno. Raramente ocorre desmaios no momento da coleta.

Coleta de sangue: dor, hematoma ou pequeno desconforto no local da coleta. Raramente desmaios ou infecções no local da punção podem ocorrer

Benefícios para o participante

Não há benefício direto para o participante desse estudo. Trata-se de estudo clínico testando a hipótese de que muitas causas de artrogiroses de devem a causa neuromuscular. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício. Porém, os resultados obtidos com este estudo poderão ajudar a conhecer melhor essas doenças e melhor tratamento a depender da causa da artrogirose.

Compensação

Você não receberá nenhuma compensação para participar desta pesquisa e também não terá nenhuma despesa adicional.

Participação Voluntária/Desistência do Estudo

A participação do seu filho (a) neste estudo é totalmente voluntária, ou seja, ele (a) somente participa se o senhor (a) ou seu filho (a) quiserem.

A não participação no estudo não implicará em nenhuma alteração no seu acompanhamento médico tão pouco alterará a relação da equipe médica com o mesmo. Após assinar o consentimento, você terá total liberdade de retirá-lo a qualquer momento e deixar de participar do estudo se assim o desejar, sem quaisquer prejuízos à continuidade do tratamento e acompanhamento na instituição.

Novas Informações

Quaisquer novas informações que possam afetar a sua segurança ou influenciar na sua decisão de continuar a participação no estudo serão fornecidas a você por escrito. Se você decidir continuar neste estudo, terá que assinar um novo (revisado) Termo de Consentimento Informado para documentar seu conhecimento sobre novas informações.

Em Caso de Danos Relacionados à Pesquisa

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Utilização de Registros Médicos e Confidencialidade

Todas as informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade (segredo) do paciente a todo o momento, ou seja, em nenhum momento os dados que o identifique serão divulgados, a menos que seja exigido por lei.

Os registros médicos que trazem a sua identificação e esse termo de consentimento assinado poderão ser inspecionados por agências reguladoras e pelo CEP.

Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em reuniões ou publicações, contudo, sua identidade não será revelada nessas apresentações.

Quem Devo Entrar em Contato em Caso de Dúvida

Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os responsáveis pelo estudo nesta instituição são Marcela Câmara Machado Costa, Angelina Xavier Acosta, Sócrates Bezerra de Matos, Emília Katiane Embiruçu Leão, que poderão ser encontrados no endereço: Rua Augusto Viana S/N,60 andar do Hospital Universitário Professor Edgard Santos ou nos respectivos telefones: 71 32838109 ou 71988922458.

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar:

PESQUISADORA RESPONSÁVEL: MARCELA CÂMARA MACHADO COSTA

ENDEREÇO: SERVIÇO DE GENÉTICA MÉDICA- RUA AUGUSTO VIANA, S/N

ANDAR: 60 ANDAR HORÁRIOS DE ATENDIMENTO: SEGUNDA A SEXTA FEIRA DAS 7 ÀS 19 H.

SALVADOR (BA) - CEP: 40110060

FONE: (71) 32838109 ou (71) 988922458 (24 h) / E-MAIL: MARCELACMCOSTA@GMAIL.COM

OU

PESQUISADOR: SÓCRATES BEZERRA DE MATOS

ENDEREÇO: SERVIÇO DE GENÉTICA MÉDICA- RUA AUGUSTO VIANA, S/N

ANDAR: 6^o ANDAR HORÁRIOS DE ATENDIMENTO: SEGUNDA A SEXTA FEIRA DAS 7:00 ÀS 19H

LABORATÓRIO DE CITOGENÉTICA

SALVADOR (BA) - CEP: 40110060

FONE: (71) 32838107 / (71) 987060591 E-MAIL: SBIOMATOS@YAHOO.COM.BR

CEP/HUPES- COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROF. EDGARD SANTOS- UFBA

SALVADOR (BA) - CEP: 4011060

FONE: (71) 3283-8043 / E-MAIL: cep.hupes@gmail.com

Declaração de Consentimento

Concordo em meu filho (a) participar do Estudo intitulado: "Caracterização clínica, morfológica e molecular das artrogrupos de causa neuromuscular"

Li e entendi o documento de consentimento e o objetivo do estudo, bem como seus possíveis riscos e benefícios. Tive a oportunidade de perguntar sobre o estudo e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Entendo que estou livre para decidir não participar desta pesquisa. Entendo que ao assinar este documento, não estou abdicando de nenhum dos direitos legais do meu filho (a)

Eu autorizo a utilização dos meus registros médicos (prontuário médico) pelo pesquisador, autoridades regulatórias e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição

Nome do Sujeito de Pesquisa Letra de Forma ou à Máquina

Data

Nome do Representante Legal do Sujeito de Pesquisa (quando aplicável)

Data

Nome do Representante Legal do Sujeito de Pesquisa (quando aplicável)

Nome do Pesquisador Principal

Data

Assinatura e Carimbo do Pesquisador Principal

ANEXO 4 Termo de Assentimento de menores

TERMO DE ASSENTIMENTO (no caso do menor)

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa “**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, MORFOLOGICA E MOLECULAR DAS ARTROGRIPOSES DE CAUSA NEUROMUSCULAR**”. Neste estudo pretendemos como objetivos:

1. Realizar o diagnóstico da causa da artrogrípese, que são contraturas de mais de duas articulações no corpo, de causa muscular, por biópsia do músculo e análise de DNA do sangue;
2. Estabelecer quais as causas principais das artrogrípeses atendidas no ambulatório de referência em doenças neuromusculares do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES)

O motivo que nos leva a estudar esse assunto é realizar o correto diagnóstico da causa da artrogrípese para melhor tratamento, além de conhecer quais as causas mais frequentes que levam a artrogrípese em nosso meio.

Para este estudo adotaremos o(s) seguinte(s) procedimento(s):

1. Avaliação médica com neurologista, realizada pela pesquisadora, com realização de exame neurológico;
2. Realização de eletroneuromiografia: exame feito com eletrodos (placas) colocadas sobre a pele e agulha estéril, que vai avaliar seus nervos e músculos.
3. Realização de biópsia de músculo: é retirado um pedaço do músculo para avaliação no laboratório. As biópsias serão feitas no braço esquerdo, ou na parte lateral da coxa. Será realizada anestesia local, com agulha fina, em seguida um corte com um bisturi e retirada de três pedaços de músculo de cerca de 0,5 centímetros. Por fim, serão dados pontos para fechar o local da biópsia, o qual poderá ser retirado no ambulatório de doenças neuromusculares após 7 dias, pela pesquisadora Marcela Costa
4. Coleta de sangue periférico para análise de DNA: coleta de sangue por punção de veia periférica de 10 ml de sangue da veia do antebraço, para avaliação do DNA.

Para participar deste estudo, o responsável por você deverá autorizar e assinar um termo de consentimento. Você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido(a) em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se. O responsável por você poderá retirar o consentimento ou interromper a sua participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido(a) pelo pesquisador que irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Você não será identificado em nenhuma publicação. Este estudo apresenta risco mínimo (risco da biópsia de músculo: O procedimento da biópsia pode ser um pouco doloroso, mas tem riscos mínimos, como o hematoma. Além disso, todo o material utilizado para a biópsia será esterilizado, de tal forma que o risco de infecção local é pequeno. Raramente ocorre desmaios no momento da coleta. Risco da coleta de sangue: dor, hematoma ou pequeno desconforto no local da coleta. Raramente desmaios ou infecções no local da punção podem ocorrer) isto é, o mesmo risco existente em atividades rotineiras como conversar, tomar banho, ler etc. Apesar disso, você tem assegurado o direito a ressarcimento ou indenização no caso de quaisquer danos eventualmente produzidos pela pesquisa.

Os resultados estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a permissão do responsável por você. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 anos, e após esse tempo serão destruídos. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida a você.

Eu, _____, portador(a) do documento de Identidade _____ (se já tiver documento), fui informado(a) dos objetivos do presente estudo de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações, e o meu responsável poderá modificar a decisão de participar se assim o desejar. Tendo o consentimento do meu responsável já assinado, declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo assentimento e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Salvador, ____ de _____ de _____

Assinatura do(a) menor

Assinatura do(a) pesquisador(a)

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar:

PESQUISADORA RESPONSÁVEL: MARCELA CÂMARA MACHADO COSTA
ENDEREÇO: SERVIÇO DE GENÉTICA MÉDICA- RUA AUGUSTO VIANA, S/N
ANDAR: 60 ANDAR HORÁRIOS DE ATENDIMENTO: SEGUNDA A SEXTA FEIRA DAS 7:00 ÀS 19 H
SALVADOR (BA) - CEP: 40110060
FONE: (71)32838109 ou (71) 988922458 (24 horas)/ E-MAIL: MARCELACMCOSTA@GMAIL.COM

OU

PESQUISADOR: Sócrates Bezerra de Matos
ENDEREÇO: SERVIÇO DE GENÉTICA MÉDICA- RUA AUGUSTO VIANA, S/N
ANDAR: 6^o ANDAR HORÁRIOS DE ATENDIMENTO: SEGUNDA A SEXTA FEIRA DAS 7:00 ÀS 19H
LABORATÓRIO DE CITOGENÉTICA
SALVADOR (BA) - CEP: 40110060
FONE: (71) 32838107 / (71) 987060591 E-MAIL: SBIOMATOS@YAHOO.COM.BR

CEP/HUPES- COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROF. EDGARD SANTOS- UFBA
SALVADOR (BA) - CEP: 4011060
FONE: (71) 3283-8043 / E-MAIL: cep.hupes@gmail.com

ANEXO 5 Parecer Comitê de Ética em Pesquisa

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
 PROF. EDGARD SANTOS-
 UFBA - HUPES



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização clínica, morfológica e molecular das artrogrupos de causa neuromuscular.

Pesquisador: Marcela Câmara Machado Costa

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 3

CAAE: 48551015.3.0000.0049

Instituição Proponente: Hospital Universitário Prof. Edgard Santos-UFBA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.510.521

Apresentação do Projeto:

O estudo avaliará pacientes provenientes do ambulatório de doenças neuromusculares, do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, encaminhados para este ambulatório por pediatras, ortopedistas, neuropediatras, neurologistas e geneticistas de todo o Estado da Bahia, para definição diagnóstica. A casuística será formada por pacientes ou representantes legais que concordarem em participar do estudo, após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Estima-se uma casuística de 30 pacientes para o presente estudo, com faixa etária desde o nascimento até idade adulta, incluindo casos com abordagem ortopédica prévia das contraturas múltiplas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Definir a etiologia das artrogrupos de origem neuromuscular, e classificar a doença de acordo com o local de lesão: nervo periférico, junção neuromuscular ou músculo.

Objetivo Secundário:

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar
 Bairro: Canela CEP: 40.110-060
 UF: BA Município: SALVADOR
 Telefone: (71)3283-8043 Fax: (71)3283-8140 E-mail: cep.hupes@gmail.com

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
 PROF. EDGARD SANTOS-
 UFBA - HUPES



Continuação do Parecer: 1.510.521

- Caracterizar os achados clínicos e demográficos, estabelecendo o perfil epidemiológico das artrogrupos;
- Descrever os principais achados em biópsia muscular nos pacientes com artrogrupos múltipla de causa neuromuscular;
- Investigar presença de mutação em genes candidatos associados às artrogrupos de causa neuromuscular;
- Estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo, de modo a direcionar o estudo molecular baseado em achados clínicos e de biópsia muscular.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos envolvidos para os participantes são os relacionados a coleta de sangue e tecido muscular, com explicação pelo pesquisador no momento da coleta dos mesmos, com riscos de pequenos hematomas locais e infecção local, de rara ocorrência, que apresentam baixa gravidade e facilmente manejados pelo profissional médico.

O presente protocolo de pesquisa será realizado seguindo fielmente as instruções dos guias de Boas Práticas Laboratoriais (BPL), dessa forma reduzindo ao máximo as possibilidades de risco durante o processamento do tecido biopsiado e os ensaios imunohistoquímicos

Benefícios:

Diagnóstico da causa da artrogrupos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Vide conclusões.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide conclusões.

Recomendações:

Vide conclusões.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O presente estudo atendeu a todas as solicitações descritas abaixo conforme solicitado no parecer número: 1.426.482:

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar
 Bairro: Canela CEP: 40.110-060
 UF: BA Município: SALVADOR
 Telefone: (71)3283-8043 Fax: (71)3283-8140 E-mail: cep.hupes@gmail.com

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
PROF. EDGARD SANTOS-
UFBA - HUPES



Continuação do Parecer: 1.510.521

1- Lembramos que o Termo de assentimento deve ser elaborado em uma linguagem que permita a compreensão pelo menor do protocolo de pesquisa ao qual será submetido.

PENDÊNCIA ATENDIDA

2- Além disso, segundo a Resolução CNS 466/12 o TCLE e o termo de assentimento deverão conter informações de contato do pesquisador responsável, tais como endereço e telefone sem restrições de horário.

PENDÊNCIA ATENDIDA

O protocolo atende portanto aos requisitos da Res CNS 466/12, tendo sido considerado aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar
Bairro: Canela CEP: 40.110-060
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71)3283-8043 Fax: (71)3283-8140 E-mail: cep.hupes@gmail.com

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
 PROF. EDGARD SANTOS-
 UFBA - HUPES



Continuação do Parecer: 1.510.521

sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, durante e ao término do estudo.

Situação: Projeto Aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_542364.pdf	24/03/2016 18:00:30		Aceito
Outros	Assentimento_Para_Menores2.doc	24/03/2016 17:59:52	Marcela Câmara Machado Costa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE2.pdf	24/03/2016 17:59:17	Marcela Câmara Machado Costa	Aceito
Orçamento	TCLEpais2.doc	24/03/2016 17:57:56	Marcela Câmara Machado Costa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE2.doc	24/03/2016 17:56:39	Marcela Câmara Machado Costa	Aceito
Outros	Polyanna.pdf	21/08/2015 13:00:43	Marcela Câmara Machado Costa	Aceito
Outros	Emilia.pdf	21/08/2015 13:00:24	Marcela Câmara Machado Costa	Aceito
Outros	Marco.pdf	21/08/2015 13:00:02	Marcela Câmara Machado Costa	Aceito
Outros	Angelina.pdf	21/08/2015 12:59:40	Marcela Câmara Machado Costa	Aceito
Outros	Luiz.pdf	21/08/2015 12:58:58	Marcela Câmara Machado Costa	Aceito
Outros	Marcele.pdf	21/08/2015 12:58:20	Marcela Câmara Machado Costa	Aceito
Outros	Socrates.pdf	21/08/2015 12:58:02	Marcela Câmara Machado Costa	Aceito
Outros	Marcela.pdf	21/08/2015 12:57:41	Marcela Câmara Machado Costa	Aceito
Outros	Equipe.pdf	21/08/2015 12:57:17	Marcela Câmara Machado Costa	Aceito

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar
 Bairro: Canela CEP: 40.110-060
 UF: BA Município: SALVADOR
 Telefone: (71)3283-8043 Fax: (71)3283-8140 E-mail: cep.hupes@gmail.com

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
 PROF. EDGARD SANTOS-
 UFBA - HUPES



Continuação do Parecer: 1.510.521

Outros	anuencia.pdf	21/08/2015 12:56:53	Marcela Câmara Machado Costa	Aceito
Outros	compromisso_pesquisador.pdf	21/08/2015 12:55:45	Marcela Câmara Machado Costa	Aceito
Outros	Encaminhamento.pdf	21/08/2015 12:37:22	Marcela Câmara Machado Costa	Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto assinada.pdf	24/07/2015 07:14:28		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Artrogrupos-CEP.pdf	22/06/2015 11:56:40		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SALVADOR, 15 de Abril de 2016

Assinado por:
REGINA SANTOS
 (Coordenador)

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar
 Bairro: Canela CEP: 40.110-060
 UF: BA Município: SALVADOR
 Telefone: (71)3283-8043 Fax: (71)3283-8140 E-mail: cep.hupes@gmail.com

APÊNDICE

Apêndice 1. Ficha de coleta de dados

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROF. EDGARD SANTOS - UFBA

FICHA DE ATENDIMENTO ARTROGRIPOSE /AMBULATÓRIO DE DOENÇAS MUSCULOESQUELÉTICAS	
IDENTIFICAÇÃO:	
Nome: _____ Data da consulta: ____/____/____	
Nº Registro: _____ Data Nascimento: ____/____/____ Idade: _____	
Cor/raça referida: () Branca () Preta () Amarela () Parda () Indígena Gênero: () F () M () Indeterminado	
Estado civil () Casado () Solteiro () Divorciado () Viúvo Religião: _____	
Naturalidade: _____ Procedência: _____	
Endereço: _____	
Telefone contato: _____ Escolaridade: _____ Profissão: _____	
FILIAÇÃO:	
Pai: _____ Naturalidade: _____	
Idade: _____ Religião: _____ Raça: _____	
Escolaridade: _____ Ocupação: _____	
Mãe: _____ Naturalidade: _____	
Idade: _____ Religião: _____ Raça: _____	
Escolaridade: _____ Ocupação: _____	
Informante: _____	
MOTIVO DO ENCAMINHAMENTO: (marcar com um ou mais "x")	
PADRÃO DE HERANÇA	TÉCNICAS DE ESTUDO
<input type="checkbox"/> Gênica: <input type="checkbox"/> AD <input type="checkbox"/> AR <input type="checkbox"/> LXR <input type="checkbox"/> () Não Clássica (Qual?) _____ <input type="checkbox"/> Cromossômica <input type="checkbox"/> Ambiental <input type="checkbox"/> Multifatorial <input type="checkbox"/> Não definido	<input type="checkbox"/> Cariótipo N° _____ Resultado: _____ <input type="checkbox"/> Biologia Molecular <input type="checkbox"/> FISH <input type="checkbox"/> aCGH <input type="checkbox"/> Histopatológico <input type="checkbox"/> Necrópsia <input type="checkbox"/> Outro _____

Nome:

Registro:

ORIGEM DO PEDIDO DE CONSULTA: () HUPES () Externo

Especialidade: _____ Nome: _____

HISTÓRIA CLÍNICA:

DESENVOLVIMENTO NEUROPSICOMOTOR (especificar a idade em meses nos eventos listados):

Sustento cefálico:	Sentar c/ apoio:	Sentar s/ apoio:	Engatinhar:
Em pé c/ apoio:	Andar c/ apoio:	Andar s/ apoio:	Lalação:
Primeiras palavras:	Falar frases:	Primeiro dente:	Fechamento FA:
Controle de esfíncteres diurno:		Controle de esfíncteres noturno:	
Regressão do DNPM () Sim () Não. Detalhar: _____			
Desempenho Escolar:		Reforço escolar: () Sim () Não	
Desenvolvimento sexual: Pubarca: _____ Telarca: _____ Menarca: _____ Menopausa: _____ Obs.: _____			

ANTECEDENTES MÉDICOS:

Cirurgias () Sim () Não. Detalhar: _____

Internações () Sim () Não. Detalhar: _____

Fraturas () Sim () Não. Detalhar: _____

Alergias () Sim () Não. Detalhar: _____

Doenças e Medicamentos de uso crônico: _____

Acompanhamento multidisciplinar: _____

Nome: _____

Registro: _____

ANTECEDENTES MATERNO-OBSTÉTRICOS (DA MÃE DO PROPÓSITO):

Gestações: _____ Partos: _____ Abortos espontâneos: _____ Abortos provocados: _____

Caso necessário, Detalhar Gestações Anteriores: _____

_____**ANTECEDENTES PRÉ-NATAIS DA GESTAÇÃO DO PROPÓSITO:**

Idade materna: _____ Nº da gestação: _____ Duração da gestação: _____ () Pré-termo () A termo () Pós-termo

Realizou Pré-natal: () Sim () Não Local: () Rede pública () Rede particular Nº consultas: _____

Sorologias: () Não fez () Negativas () Positivas Detalhar: _____

Realizou US gestacional? () Sim () Não - () Normal () Alterado. Detalhar: _____

Mês do início dos movimentos fetais: _____ ° Intensidade: () Normal () Aumentada () Diminuída

Diferenças de outras gestações: () Sim () Não Detalhar: _____

Intercorrências: () DHEG () DMG () Sangramento vaginal () Infecções () Febre () Perda de LA

Detalhar: _____

Uso de medicamentos: () Sim () Não. Detalhar: _____

Misoprostol ()

Exposição a teratógenos (agente teratogênico/ período de exposição/ quantidade):

() Álcool () Tabaco () Maconha () Cocaína () Crack () Agentes abortivos () Outros

Detalhar em casos positivos: _____
_____**ANTECEDENTES PERINATAIS:**

Parto: () Vaginal () Fórceps () Cesárea Indicação: _____

Local: _____ Assistência: () médico () enfermeiro () parteira () outro () nenhuma

Apresentação: () Cefálica () Pélvica () Córmica Duração do trabalho de parto: _____ Alta com _____ dias de vida

Peso: _____ g Comp.: _____ cm PC: _____ cm PT: _____ cm Apgar: 1º min _____ 5º min _____ 10º min _____

Ventilação mecânica	() Sim () Não	Por quantos dias?
Berçário	() Sim () Não	Por quantos dias?
CTI neonatal	() Sim () Não	Por quantos dias?
Infecções/febre	() Sim () Não	Qual? Idade:
Convulsões	() Sim () Não	Idade início:
Icterícia	() Sim () Não	Idade início: Fototerapia:
Cianose	() Sim () Não	Idade início:
Alteração na sucção	() Sim () Não	Descreva:
Alterações no choro	() Sim () Não	Descreva:
Alteração suor/ urina	() Sim () Não	Descreva:
Hipotonia	() Sim () Não	Descreva:
Hérnias	() Sim () Não	Descreva:
Contraturas	() Sim () Não	Descreva:

Nome: _____

Registro: _____

EXAME FÍSICO**DADOS ANTROPOMÉTRICOS:**

ITEM	Medida	P%	ITEM	Medida	P%
Peso			Mão total (MT)		
Estatuta			Dedo Médio (DM)		
Envergadura			Distância intercantal interna (DII)		
Vértex-púbis			Distância intercantal externa (DIE)		
Relação SS/SI			Fenda Palpebral		
Perímetro cefálico (PC)			Orelha		
Crânio DBP			Pés		
Crânio DAP			Pênis		
Índice cefálico					

Geral: _____

Cabeça e pescoço: _____

Tórax: _____

Ap. respiratório: _____

Ap. Cardiovascular: _____

Abdome: _____

Genitália: () Feminina () Masculina () Indeterminado. Descreva: _____

Tanner: Feminina: M ____ P: ____ Masculina: G: ____ P: ____

Membros: _____

Neurológico: _____

Nome:

Registro:

HEREDOGRAMA

Consanguinidade parental: () Sim () Não Grau de parentesco: _____

Ascendência Materna:

Ascendência Paterna:



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
COMPLEXO HOSPITALAR UNIVERSITÁRIO PROFESSOR EDGARD SANTOS



Termo de Consentimento para Autorização de Registro de Fotos, Exames de Imagem ou Vídeos

Data:

Nome do Paciente:

Data de Nascimento:

Prontuário:

Médico Assistente:

Concordo que as fotos, resultados de exames de imagem e/ou vídeos de:

(nome) _____

(parentesco) _____

(a) podem ser armazenados como parte do prontuário médico confidencial e utilizados para auxílio no diagnóstico e acompanhamento clínico do paciente:

Sim / Não

(b) podem ser apresentados para outros profissionais de saúde para auxiliar no ensino médico e pesquisa, assegurando o anonimato do paciente:

Sim / Não

(c) podem ser publicados em trabalhos científicos, assegurando o anonimato do paciente:

Sim / Não

O tipo de permissão que você dá não afeta o seu acompanhamento no serviço ou tratamento de forma alguma. Você ou a equipe assistente não receberá nenhum tipo de remuneração por isto. Se no futuro você mudar de idéia, você tem o direito de fazê-lo a qualquer momento.

Assinatura(s):

 Responsável pelo paciente

 Médico Assistente

Rua Augusto Viana, s/n, Canela, CEP: 40.110-060, Salvador Bahia
 Serviço de Genética Médica, 6º andar
 Tel.: ++55 71 3283.8109
 Home Page: www.genetica.hupes.ufba.br

Apêndice 2 Tabela Dados Demográficos dos 41 pacientes

Paciente	Idade 1ª consulta (anos)	Sexo	Cor	Procedencia	Especialidade De origem	Casos semelhantes	Consaguinidade
1	0,28	F	Branca	Jacobina	geneticista	N	N
2	0,53	F	Branco	Salvador	ortopedia	S	N
3	1,80	M	Pardo	Salvador	ortopedia	N	N
4		F		Lauro de			
	3,16		Pardo	Freitas	geneticista	N	N
5	40,97	M	Branco	Monte Santo	geneticista	N	N
6	17,85	M	Pardo	Salvador	cardiologista	N	N
7	12,31	M	Pardo	Jaguaripe	ortopedia	N	N
8	26,04	F	Parda	Caldeirao	geneticista	N	N
9	43,65	F	Branca	Salvador	espontânea	N	N
10	0,21	M	Pardo	Monte Santo	neuropediatra	N	N
11	0,44	F	Pardo	Salvador	ortopedia	N	S
12	33,72	F	Pardo	Salvador	geneticista	S	S
13	12,91	M	Pardo	Irecê	pediatra	S	N
14	4,01	M	Pardo	Dias D'Avila	pediatria	S	N
15	4,12	M	Branco	Barrocas	fisioterapia	S	N
16	0,90	M	Pardo	Feira Santana	fisioterapia	N	N
17	0,47	F	Branca	Feira Santana	neuropediatra	N	N
18	0,23	F	Branca	Mundo Novo	fisioterapia	N	N
19		M		Oliveira dos			
	6,72		Branca	Brejinhos	não lembra	N	N
20	8,13	M	Negro	Simões Filho	fisioterapia	N	S
21	1,13	M	Pardp	Salgueiro	geneticista	S	N
22	11,03	F	Branca	Salvador	pediatria	N	N
23		M		Campo			
	0,18		Branca	Formoso	ortopedia	N	N
24	49,08	F	Preta	alagoinhas	ortopedista	N	N
25	1,44	F	Parda	Salvador	fisioterapia	N	N
26	9,70	F	Branca	Itiuba	ortopedia	S	N
27	7,31	F	Parda	Jacobina	fisioterapia	N	N
28	4,04	F	Preta	Salgueiro	ortopedia	S	N
29	0,53	F	Branca	Salvador	ortopedia	S	N
30	0,84	F	Parda	Salvador	fisioterapia	N	N
31	4,12	F	Branca	Salvador	neuropediatra	S	N
32	2,62	M	Branco	Jaguaquara	pediatra	N	N
33	10,25	M	Branco	Juazeiro	neuropediatra	N	N
34	8,18	M	Branco	Salvador	geneticista	N	N
35	1,25	M	Preto	Salvador	geneticista	N	N
36	8,13	M	Pardo	Salvador	neuropediatra	S	N
37	5,09	F	Preta	Salvador	ortopedista	S	N
38	5,05	F	Preta	Feira Santana	ortopedista	NÃO SABE	NÃO SABE
39	4,20	F	Parda	Salvador	ortopedia	N	N
40	7,67	M	Pardo	Salvador	geneticista	N	N
41	1,24	M	Branco	Valente	neuropediatra	S	N

Apêndice 2. Principais dados clínicos dos 41 pacientes continua

Paciente	N. articulações	Diagnóstico clínico	Hipotonia- S/N	Sentar (meses)	Andar sem apoio (meses)	(Linguagem/fala
1	12	Miopatia?sem diag	S	12	0	0
2	4	miopatia congénita? MYH14	S	5	13	9
3	7	Artrogripose distal + Ptose- sem diag.	N	8	15	10
4	4	miopatia congénita?sem diag.	S	9	38	7
5	14	Amioplasia	N	84	0	8
6	4	Miopatia com agregados	N	não sabe	14	14
7	6	Freeman- Sheldon	N	6	13	9
8	4	miopatia congénita- desproporção congénita	S	9	24	12
9	6	distrofia muscular congénita	S	36	84	12
10	8	<i>zika</i>	N	0	0	0
11	10	amioplasia	N	6	18	15
12	8	Miopatia? Sem diag.	N	8	24	12
13	8	SNC	N	12	0	36
14	10	SNC	N	0	0	0
15	10	miopatia congenita- mini core	S	12	72	12
16	10	distrofia muscular congenita merosina negativa	S	11	0	7
17	8	amioplasia	N	5	0	10
18	10	<i>Zika</i>	N	0	0	0
19	4	Beals	N	7	18	24
20	4	amioplasia MMII	S	5	84	10
21	8	amioplasia	S	12	50	9
22	8	amioplasia	N	5	20	9

23		artrogripose distal-sem diag.				
	4	congênita?	N	8	26	11
24	4	Neuropatia	N	não sabe	não sabe	não sabe
25	10	SNC	S	36	0	0
26	10	Escobar	S	8	48	8
27		Amioplasia				
	4	MMII	N	7	0	7
28		miopatia congênita?				
	3	Sem diag	S	15	18	12
29		miopatia				
	4	congenita	S	5	13	9
30		distrofia muscular ? Miopatia? Sem diag	N	5	0	0
31		miopatia congenita- desproporção				
	4	congênita	S	8	24	11
32		Ehlers-Danlos musculo				
	3	contractural	S	7	24	12
33	4	SNC	S	15	39	36
34	8	Amioplasia	N	8	0	12
35		amioplasia membros				
	6	inferiores	N	5	0	12
36		distrofia muscular congenita merosina				
	4	negativa	S	15	0	30
37	6	amioplasia	N	8	0	9
38	10	amioplasia	N	14	0	11
39		amioplasia membros				
	5	inferiores	N	8	0	9
40	6	Beals	N	8	24	12
41	4	CLIFHADD	N	9	26	0
