



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

Isabel Rovisco Correia Gonçalves Monteiro

**DISFERLINOPATIAS: HETEROGENEIDADE CLÍNICA, GENÉTICA E
PROGNÓSTICO FUNCIONAL EM QUINZE DOENTES**

ARTIGO CIENTÍFICO
ÁREA CIENTÍFICA DE NEUROLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:
PROFESSOR DOUTOR ANTÓNIO FREIRE GONÇALVES
DOUTOR LUÍS NEGRÃO

MARÇO/2017

**DISFERLINOPATIAS: HETEROGENEIDADE CLÍNICA,
GENÉTICA E PROGNÓSTICO FUNCIONAL EM QUINZE
DOENTES**

Autores:

Isabel Rovisco Correia Gonçalves Monteiro ¹

António Freire Gonçalves ^{1,2}

Luís Negrão²

¹ Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

² Serviço de Neurologia, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

Endereço de correio eletrónico: Isabelroviscomonteiro@hotmail.com

Índice

Índice	3
Lista de Abreviaturas	4
Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
Metodologia	11
Resultados	12
Discussão	18
Conclusão	22
Agradecimentos	23
Referências Bibliográficas	25

Lista de Abreviaturas

CHUC – Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra

CK – Creatina Quinase

DEMI – Débito Expiratório Máximo Instantâneo

DM – Diagnóstico Molecular

DMC 2B – Distrofia Muscular das Cinturas tipo 2B

DYSF – Gene da disferlina

ECG – Eletrocardiograma

HiperCK – Hipercreatinémia

ICT – Índice Cardiorácico

MDCA – Miopatia Distal do Compartmento Anterior

MM – Miopatia de Miyoshi

PFR – Provas de Função Respiratória

PImax – Pressão inspiratória máxima

SAOS – Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono

Resumo

Introdução: As disferlinopatias são doenças musculares de transmissão autossômica recessiva provocadas por mutações no gene da disferlina (*DYSF*). Os fenótipos mais comuns são a Miopatia de Myoshi (MM) e a Distrofia Muscular das Cinturas 2B (DMC 2B).

Objetivos: Descrever as características clínicas, laboratoriais, moleculares e a evolução clínica de quinze doentes com disferlinopatia.

Metodologia: Registaram-se dados demográficos, clínicos, laboratoriais e moleculares de quinze doentes com diagnóstico de disferlinopatia. Foi avaliada a marcha, existência de sintomatologia cardiorrespiratória e resultados de eletrocardiograma, provas de função respiratória e radiografia torácica.

Resultados: Quinze doentes (oito do género masculino), com idade média atual de 47+/-16 anos. A idade média dos primeiros sintomas foi 24+/-14 anos e o tempo médio até ao diagnóstico molecular de 12+/-12 anos. Na observação inicial, o fenótipo DMC 2B observou-se em oito doentes, o de MM em três, hipercreatinémia (hiperCK) isolada em dois, proximodistal num doente e Miopatia Distal do Compartimento Anterior (MDCA) noutro doente. Atualmente, oito doentes apresentam generalização da fraqueza muscular (um DMC 2B e sete proximodistais) e sete doentes mantêm o fenótipo inicial (quatro DMC 2B, um hiperCK, um MDCA, um proximodistal). No momento do diagnóstico, todos os doentes tinham marcha autónoma, sendo que nove perderam capacidade de marcha e três fazem atualmente marcha com apoio (tempo médio até perda de marcha autónoma de 17+/-9 anos). Sete doentes referiram dispneia e/ou ortopneia. 18% das radiografias torácicas apresentaram aumento do índice cardiorácico (ICT) e foram encontradas anomalias em 50% das provas de função respiratória (PFR) e 54% dos eletrocardiogramas (ECG). Valores séricos de creatina quinase (CK) estavam elevados em todos os doentes. Observaram-se treze mutações diferentes no gene *DYSF*, dez em homozigotia e cinco em heterozigotia.

Conclusões: O reconhecimento da heterogeneidade fenotípica e molecular e da evolução clínica das disferlinopatias evidenciada nesta série poderá contribuir para o diagnóstico mais precoce e dirigido desta doença.

Palavras-chave: Distrofia muscular, Disferlina, Disferlinopatias, Distrofia muscular das cinturas 2B, Miopatia de Myoshi.

Abstract

Introduction: Dysferlinopathies are a group of autosomal recessive muscular dystrophies caused by mutations in the dysferlin gene (*DYSF*). Dysferlin deficiency leads to several phenotypes, with Myoshi Myopathy (MM) and Limb Girdle Muscular Dystrophy 2B (LGMD 2B) being the most common ones.

Aim: Describe the clinical, laboratorial and molecular findings of fifteen patients with muscle disease caused by pathogenic mutations in the *DYSF* gene, as well as the progression of the disease.

Methods: A total of fifteen patients with molecular confirmed dysferlinopathy were clinical and laboratory assessed. The initial and actual pattern of muscle weakness, the gait, the rate of progression and distribution of the muscle weakness, the presence of cardiorespiratory symptoms and the results of electrocardiogram, thoracic radiography and respiratory function were evaluated.

Results: Fifteen patients (eight males) with a mean age at the present evaluation of 47 ± 16 years old. The mean age of onset of the disease was 24 ± 14 years and the mean time until the molecular confirmation was 12 ± 12 years. At the initial evaluation, five different phenotypes were identified: eight patients with LGMD2B, three with MM, two with HiperCK, one with proximodistal phenotype (Mixed type) and one with distal anterior compartment myopathy (DACM). At the last clinical evaluation, eight of them presented generalization of the weakness (one LGMD2B and seven proximodistal phenotype) and seven maintained their initial phenotype (four LGMD2B, one hiperCK, one DACM and one proximodistal). At the first clinical examination, all patients were able to walk without support and presently nine became wheelchair-bound and three needed walking assistance (mean time to loss of autonomous walk of 17 ± 9 years). Seven patients referred dyspnea and/or orthopnea. 18% of thoracic x-rays presented an enlargement of the cardiothoracic index and abnormalities were

found in 50% of the respiratory function tests and in 54% of the electrocardiograms. All patients had elevated serum creatine kinase (CK) levels. Thirteen sequence variations were identified in *DYSF* gene. Ten patients carried a single homozygous mutation; five patients had two compound heterozygous mutations.

Conclusions: Dysferlinopathies are clinical and genetic heterogeneous muscle diseases with progression in the majority of the patients. The recognition of this features evidenced in this series, may contribute to the earlier and directed diagnosis of this disease.

Keywords: Muscular dystrophy, Dysferline, Dysferlinopathy, LGMD-2B, MM.

Introdução

As disferlinopatias são doenças musculares causadas por mutações no gene codificante da proteína transmembranar disferlina (*DYSF*) apresentando-se com um padrão de transmissão autossômico recessivo.¹

A disferlina é uma proteína presente principalmente no sarcolema das células musculares e está envolvida em processos de reparação da membrana Ca^{2+} -dependentes e no desenvolvimento do sistema tubular T.²

Na presença de mutações patogénicas no gene *DYSF*, a disferlina torna-se inexistente ou aparece em quantidades muito reduzidas, insuficientes para preservar o normal mecanismo de reparação da membrana muscular. Dois fenótipos principais foram identificados: a distrofia muscular das cinturas 2B (DMC 2B) e a Miopatia de Miyoshi (MM). Embora menos frequentes, são conhecidas outras formas de apresentação: a Hipercreatinémia (hiperCK) assintomática, a Miopatia do Compartimento Distal Anterior (MCDA) e a forma mista ou proximodistal associando a fraqueza muscular distal e proximal - cinturas pélvica e escapular - desde o início da doença.³⁻⁵

A utilização de técnicas de imunohistoquímica em amostras de tecido muscular que evidenciem a expressão reduzida ou ausente desta proteína é importante para o seu diagnóstico. No entanto, alterações semelhantes também foram encontradas em outras doenças musculares como sarcoglicanopatias, distrofinopatias, caveolinopatias ou calpainopatias (condicionam défices secundários de disferlina) pelo que a identificação da mutação no gene da disferlina se torna determinante para o diagnóstico definitivo.⁶

Estas doenças apresentam uma heterogeneidade clínica, nomeadamente no que respeita à idade de aparecimento dos primeiros sintomas, áreas musculares afetadas, grau de incapacidade inicial e ritmo de progressão da doença. O compromisso cardiorrespiratório com expressão clínica tem sido descrito raramente nos doentes com disferlinopatias e poucos

estudos foram realizados para a sua avaliação e registo da sua incidência.⁷ Alterações respiratórias, em particular a diminuição da capacidade vital respiratória, foram já reportadas em doentes com longa duração da doença. Por outro lado, várias anomalias eletrocardiográficas e ecocardiográficas foram também observadas, independentemente do estadio da doença.

Neste estudo, foi feita a avaliação de quinze doentes inscritos e observados regularmente na consulta externa de Doenças Neuromusculares do Serviço de Neurologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), com o diagnóstico confirmado de disferlinopatia.

Metodologia

Foram avaliados quinze doentes (oito do sexo masculino e sete do sexo feminino) da Consulta Externa de Doenças Neuromusculares do Serviço de Neurologia do CHUC com diagnóstico definitivo de disferlinopatia. Em todos os doentes o diagnóstico foi baseado na identificação de mutações patogénicas no gene *DYSF*, acompanhadas ou não de ausência ou redução de marcação da disferlina na avaliação imunohistoquímica de biópsias musculares.

Procedeu-se à recolha de informação demográfica, clínica, laboratorial e molecular. Registaram-se a idade, sexo, residência, idade de início dos primeiros sintomas, idade da primeira consulta e do diagnóstico molecular, existência de consanguinidade parenteral e de familiares com doença confirmada molecularmente.

Em termos funcionais, avaliou-se a distribuição da fraqueza muscular, as características da marcha e a elevação dos membros superiores relativamente ao plano o nível dos ombros, comparando-se a observação atual com os registos clínicos da primeira observação. Foi pesquisada a presença de sintomatologia cardiorrespiratória, particularmente dispneia e ortopneia.

No que diz respeito aos exames complementares de diagnóstico, doze dos doentes realizaram eletrocardiograma (ECG), onze doentes uma radiografia torácica e onze provas de função respiratória (PFR). Registou-se o valor mais elevado da determinação sérica da creatina quinase (CK) e o resultado do estudo molecular.

Para a análise estatística utilizou-se o Software SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) versão 20.0 para Windows. As variáveis numéricas foram resumidas através da média, valor mínimo e máximo e desvio padrão.

Obteve-se o consentimento informado por escrito de todos os doentes assim como o parecer da Comissão de ética do CHUC.

Resultados

A idade média dos primeiros sintomas foi de 24 ± 14 anos (de 15 a 64) e a mediana de 18 anos (Tabela 1). No sexo feminino a média foi 25 ± 12 anos e no sexo masculino 24 ± 15 anos. O tempo médio decorrido até ao estabelecimento do diagnóstico molecular (DM) foi de 12 ± 12 anos. Quatro doentes apresentavam consanguinidade parental em 1º grau e cinco em 2º grau. Três doentes têm outros familiares afetados com a mesma doença, sendo dois deles irmãos (doentes 1 e 4). Relativamente ao fenótipo de apresentação, oito doentes apresentavam DMC 2B, três o fenótipo MM, um o fenótipo proximodistal, um doente MDCA e dois hiperCK assintomática. Sete doentes mantinham o fenótipo inicial à data da última observação.

Tabela 1: Dados demográficos e evolução clínica.

Doente	Sexo	Idade atual	Idade 1º sintomas	Idade 1ª observação	Idade DM	Diferença 1º sintomas e DM	Naturalidade	Consanguinidade de parenteral	História Familiar	Fenótipo inicial	Fenótipo atual
1	F	70	16	30	60	44	Aveiro	1º grau	+	DMC2B	Misto
2	F	46	23	25	26	3	Leiria	2º grau	--	DMC2B	DMC2B
3	M	38	17	17	21	4	Leiria	--	--	DMC2B	Misto
4	F	60	26	45	46	20	Aveiro	1º grau	+	DMC2B	Misto
5	F	39	18	18	37	19	Aveiro	--	--	HiperCK	DMC2B
6	M	73	63	64	65	2	Viseu	--	--	MDCA	MDCA
7	M	34	18	22	22	4	Santarém	--	--	MM	Misto
8	F	64	25	39	56	31	Viseu	--	--	DMC2B	DMC2B
9	F	69	52	52	63	11	Guarda	1º grau	--	DMC2B	DMC2B
10	M	36	15	19	21	6	Guarda	--	--	DMC2B	Misto
11	M	33	21	21	23	2	Coimbra	2º grau	+	MM	Misto
12	M	40	17	17	25	8	Leiria	2º grau	--	Misto	Misto
13	M	24	21	21	21	--	Leiria	2º grau	--	MM	Misto
14	M	41	18	20	41	23	Torres Novas	1º grau	--	DMC2B	DMC2B
15	F	33	15	15	22	11	Caldas da Rainha	2º grau	--	HiperCK	HiperCK

DM – Diagnóstico Molecular; + - positiva; -- - ausência

Todos os doentes apresentavam marcha autónoma no início da doença. Mais tarde, três doentes passaram a necessitar de apoio na marcha: bilateral no doente 4 aos 55 anos e unilateral nos doentes 2 e 8, com as idades de 40 e 51 anos, respetivamente. Atualmente, seis doentes perderam a capacidade total de marcha, deslocando-se em cadeira de rodas (Tabela 2). Mantêm preservada a marcha autónoma seis doentes.

Na avaliação dos membros superiores, oito doentes elevam os membros superiores acima do nível dos ombros e sete não conseguem atingir este nível. No que diz respeito à presença atual de sintomatologia cardiorrespiratória, sete doentes apresentavam queixas de dificuldade respiratória: quatro do tipo dispneia e três do tipo ortopneia. De salientar que o doente 3 tem antecedentes de asma brônquica, o doente 5 apenas refere dispneia de esforço e o doente 7 é fumador (5 Unidades Maço/ ano desde os 21 anos) e apresenta Síndrome da Apneia Obstrutiva do sono (SAOS).

Tabela 2: Avaliação Funcional e de Sintomatologia Cardiorrespiratória.

Doente	Marcha inicial	Marcha atual	Idade da perda		Elevação dos braços	Dispneia	Ortopneia
			Marcha autónoma	Marcha com apoio			
1	Autónoma	Impossível	60	45	Inferior	+	+
2	Autónoma	Com apoio	--	40	Inferior	--	--
3	Autónoma	Impossível	34	24	Inferior	+	+
4	Autónoma	Com apoio bilateral	--	50-55	Acima	--	--
5	Autónoma	Marcha miopática	--	--	Acima	+	--
6	Autónoma	Autónoma	--	--	Acima	--	--
7	Autónoma	Impossível	27	26	Inferior	+	+
8	Autónoma	Com apoio	--	51	Inferior	--	--
9	Autónoma	Marcha miopática com hiperlordose	--	--	Acima	--	--
10	Autónoma	Impossível	22	19	Inferior	--	--
11	Autónoma	Stepagge	--	--	Acima	--	--
12	Autónoma	Impossível	38	37	Inferior	--	--
13	Autónoma	Autónoma	--	--	Acima	--	--
14	Autónoma	Impossível	35	30	Abaixo	--	--
15	Autónoma	Autónoma	--	--	Acima	--	--

+ - positiva; -- - ausência

Dos doze doentes que realizaram ECG, 50% apresentaram alterações. O doente 1 apresentou um bloqueio completo do ramo esquerdo do feixe de His; o doente 4 bradicardia sinusal e o doente 6 bloqueio completo do ramo esquerdo do feixe de His com desvio axial do eixo. Nos outros três, o doente 7 apresentava inversão da onda T em V5 e V6 associada a alterações inespecíficas da repolarização da parede inferior e lateral, o doente 8 sinais de disfunção diastólica tipo II associado a insuficiência mitral e tricúspide e derrame pericárdico circunferencial e o doente 9 uma anomalia auricular esquerda.

A radiografia torácica estava alterada em três doentes. No doente 7 observou-se um tórax ligeiramente assimétrico por escoliose torácica dextroconvexa com aparente exérese do arco posterior da 7ª e 8ª costelas à direita e um reforço das arborizações bronco-vasculares ao nível da região retro-cardíaca esquerda. O doente 8 tinha um ligeiro aumento do Índice Cardiotorácico (ICT) com reforço peri-hilar e o doente 9 apresentava um aumento do ICT associado a uma diminuição do volume do hemitórax direito e fratura em cunha do corpo de D7.

Relativamente às provas ventilatórias, foram encontradas alterações em seis doentes. No doente 1, apesar da espirometria se revelar normal, observou-se uma diminuição da pressão inspiratória máxima (P_{Imax}). No doente 2, identificou-se obstrução das pequenas vias respiratórias (débito expiratório máximo instantâneo – DEMI - 43%) com prova broncodilatação negativa e uma Síndrome Ventilatória Mista com prova de broncodilatação positiva no doente 3 (antecedentes de asma brônquica). O doente 7 evidenciou uma alteração ventilatória obstrutiva ligeira, sem resposta à broncodilatação e o doente 8 uma Síndrome Restritiva moderadamente grave associada a diminuição da P_{Imax}. O doente 9 apresentou uma Síndrome Mista sem resposta à broncodilatação, embora com pressões máximas respiratórias normais. A média dos valores de CK obtida foi 4694 U/L, com um valor mínimo de 255 U/L e máximo de 12650 U/L.

Tabela 3: Exames Complementares de Diagnóstico.

Doente	ECG	Radiografia de Tórax	PFR	CK (U/L)
1	+	X	+	605
2	--	X	+	5451
3	--	X	+	2614
4	+	--	--	2695
5	--	--	--	2964
6	+	--	--	255
7	+	+	+	11861
8	+	+	+	1023
9	+	+	+	3748
10	--	--	X	9721
11	X	X	X	3992
12	X	--	X	6923
13	X	--	X	12650
14	--	--	--	2398
15	--	--	--	3518

CK - Creatina Quinase; ECG - Eletrocardiograma; PFR - Provas de Função Respiratória; X - não realizou exame; + - exame com alterações; -- - exame sem alterações

Da análise molecular efetuada registaram-se treze variações no gene *DYSF* (Tabela 4). Dez doentes apresentaram uma mutação em homozigotia. Três doentes tinham duas mutações em heterozigotia. Em um foram identificadas mais do que duas variações na sequência genética e noutra apenas uma mutação em heterozigotia. As mutações 5509 G>A e 5979dupA foram observadas em mais do que um doente. A primeira e mais frequente, estava presente em sete alelos (23,3%) e a segunda em quatro (13,3%). Em três doentes foram também reconhecidos polimorfismos: no doente 4 c.3874-85G>T, c.5668-41C>T e c.5768-16T>C; no doente 10 c.1353+13C>T, c.1354-88A>G, c.1827T>C e c.2583^a>T; no doente 11 c.2583A>T, c.3874-85G>T, c.4887-37C>T, c.5768-16T>C, c.5859A>C e c.6204+15C>T; no doente 15 c.393C>T, c.1827T>C, c.2583A>T e 4008C>A.

Tabela 4: Sumário das mutações genéticas identificadas nos quinze doentes desta serie.

Doente	Exão	Mutação	Substituição nucleótido	Tipo de mutação
1	53	5979dupA Homozigotia	Glu1994Arfs	Frameshift
2	49	5509 G>A Homozigotia	Asp1837Asn	Missense
3	Intrão 26	2801+1G>A	Ivs26+1G>A	Missense Missense
	49	49: 5509 G>A	Asp1837Asn	
	53	53: 5999G>A	Arg2000Gln	
4	53	5979dupA Homozigotia	Glu1994Arfs	Frameshift
5	7	7: 701 G>A;	Gly234Glu	Missense Splice site
	25i	25i: 2643+1G>A	Tyr838_thr881del	
6	50	5626 G>A Heterozigotia	Asp1876Asn	Missense
7	49	5509G>A Homozigotia	Asp1987Asn	Missense
8	12_12i	1180_1180+7delAGTGC GTG Homozigotia	Glu353_Leu429del	
9	7	757 C>T Homozigotia;	Arg253Trp	Missense
10	12	12: 1179_1180+6del	Spl	
	15	15: 1379_1381del	Arg460del	
11	48	5429 G>A Homozigotia	Asp1837Asn	Missense
12	49	5509G>A Homozigotia	Asp1837Asn	Missense
13	50	5572G>A* Homozigotia	Asp1858Asn	Missense
14	45	5036G>T Homozigotia	Gly1679Val	Missense
15	29	29: 3115 C>T	Arg1039Trp	Missense
	52	52: 5813_5821 DupCAGCCAAGA	Thr1938_1940Lysdup	

Discussão

As distrofias musculares constituem um grupo de doenças musculares com grande heterogeneidade clínica e genética. A série de doentes apresentada reflete bem estas duas características. Outro aspeto também conhecido nestas doenças, incluindo as disferlinopatias, é o facto de a mesma mutação poder originar fenótipos distintos e de mutações diferentes poderem causar fenótipos idênticos. Por outro lado, a severidade, evolução clínica e distribuição da fraqueza muscular podem variar para a mesma mutação e para o mesmo fenótipo.⁸

Está estabelecido que a progressão da doença se relaciona com a duração e não com a idade no início dos sintomas. O doente 13, com início dos primeiros sintomas aos 21 anos de idade e 3 anos de evolução da doença, apresenta um bom desempenho funcional (marcha autónoma e elevação dos membros acima dos ombros), enquanto outros doentes (1, 3, 10, 12 e 14), igualmente com início precoce dos sintomas mas com longo tempo de evolução, apresentam marcha impossível e incapacidade de elevação dos membros superiores acima dos ombros. Ainda assim, alguma variação pode ser encontrada nos casos reportados. Os doentes 4 e 8, embora com longo tempo de evolução da doença, apresentam uma marcha possível com necessidade de apoio. Pelo contrário, o doente 10, com o início dos sintomas na adolescência, perdeu a capacidade da marcha autónoma no início da vida adulta.

No que respeita aos doentes com fenótipo de DMC 2B, os doentes 2, 8 e 14 são casos do seu perfil evolutivo típico com início da fraqueza muscular pelos membros inferiores e extensão aos membros superiores cerca de uma década mais tarde.

Porque a disponibilidade atual para o uso de rotina das técnicas de imunohistoquímica é maior, cada vez mais variantes clínicas têm sido descritas na literatura.^{3, 9-11} Entre elas, o designado padrão misto ou proximaldistal proposto por Nguyen *et al.*¹⁰ A crescente incidência deste fenótipo é facilmente evidenciada neste nosso estudo, uma vez que constitui cerca de

53% da totalidade dos casos. Também a variabilidade da idade de início dos sintomas é aqui demonstrada. O doente 15 apresenta o fenótipo de hiperCK assintomática com 11 anos de evolução. Estão também descritos casos de doentes com formas de início tardio de doença,¹² aqui representados pelos doentes 6 e 9. Mahjneh *et al.*¹⁶ verificaram que nas fases iniciais da doença, devido à relativa fraqueza ao nível do músculo quadrícipite, os doentes tendem a arranjar mecanismos de compensação que se refletem no padrão da marcha. Esta é tipicamente caracterizada por uma rotação interna ou externa da anca, perna e pé que lhes permite atenuar o efeito da gravidade. Cerca de 10 anos após o início dos sintomas, as anomalias tornam-se mais evidentes e a perda de força muscular ao nível dos calcanhares conduz a uma ineficácia no movimento de impulsão do chão. Nestas fases, o doente tem dificuldade em elevar o pé do chão e, logo após a flexão do joelho e anca, como apresenta limitações na extensão do joelho, embate fortemente com o pé novamente no chão. Os doentes 5 e 11 são casos ilustrativos destas alterações da marcha, encontrando-se já em fases avançadas da doença. Pela persistência deste padrão de marcha e pela adoção de posturas incorretas é possível evidenciar uma ligeira hiperlordose, de que é exemplo o doente 9.

Até recentemente muito poucos estudos fizeram a avaliação da função cardíaca de doentes com disferlinopatias. No presente estudo, seis doentes apresentaram alterações eletrocardiográficas, embora estas possam estar relacionadas com a idade dos doentes.¹³ No entanto, Nishikawa *et al.*⁷ reportaram outros casos de anomalias, como o prolongamento do complexo QRS, sem aparente relação com a idade. Tais atrasos na condução interventricular podem ser causados por alterações estruturais ou no sistema de condução cardíaco. Para além disso, Shinmura *et al.*¹⁴ observaram que a duração do complexo QRS não se altera significativamente nos indivíduos saudáveis à medida que vão envelhecendo.

Neste estudo, salienta-se o caso do doente 7, com 34 anos de idade e diagnóstico de cardiomiopatia dilatada. No ECG realizado observaram-se alterações da repolarização nas

paredes lateral e inferior (v5 e v6). Apresentava ainda valores muito elevados de CK e acabou por perder a capacidade de marcha autónoma muito precocemente (5 anos após o estabelecimento do diagnóstico molecular/ 9 anos após o surgimento dos primeiros sintomas), sugerindo uma evolução muito rápida da doença. Também Wenzel *et al.*¹⁵ reportaram casos semelhantes nos quais se observaram níveis muito elevados de CK, mas mantendo os doentes, apesar disto, a capacidade de marcha autónoma, levando os autores a concluir que a disfunção cardíaca pode ocorrer independentemente do estadió da doença.

Assim, uma vez que as anomalias estavam presentes em doentes com tempos de evolução muito diferentes, não é possível estabelecer-se uma relação entre disfunção cardíaca e duração da doença.

No que respeita à função respiratória também os dados existentes até à data não são suficientes para identificar os doentes mais suscetíveis a sofrer algum tipo de disfunção ou em que altura da doença os sinais e sintomas se tornam evidentes.⁷ Apesar disso, há estudos que sugerem uma relação entre o aparecimento de alterações respiratórias e a duração da doença.^{6,7,16} No nosso estudo os resultados obtidos apontam para a mesma conclusão, já que todos os doentes com alterações nas provas de função respiratória têm mais do que 15 anos de evolução da doença.

Uma vez que a perda de força ao nível do diafragma e músculos acessórios pode conduzir a algum grau de disfunção respiratória, seria previsível que esta surgisse mais precocemente no fenótipo proximal (DMC 2B). Nishikawa *et al.*⁷ procuraram avaliar estes aspetos nos fenótipos DMC 2B e MM, concluindo que as alterações apareciam mais tardiamente no fenótipo proximal, ao contrário do que seria expectável. Nesta série verificou-se que, à exceção do doente 1, os sintomas se manifestaram mais tardiamente no fenótipo DMC 2B, e que havia diferentes tipos e graus de disfunção respiratória.

Até à data, já foram identificadas mais de 300 variações no gene *DYSF*, distribuindo-se por toda a extensão da sequência codificadora (Leiden Muscular Dystrophy pages www.dmd.nl). Neste estudo identificámos várias mutações. A mais frequente, 5509 G>A, estava presente em três doentes: dois em homozigotia e um em heterozigotia. Curiosamente, uma mutação semelhante originou fenótipos diferentes (um DMC 2B e dois Proximodistais) sugerindo uma ausência de relação entre estes dois aspetos, também descrito noutros estudos^{9,10,17,18}. Por outro lado, a mutação 5979dupA em homozigotia encontrou-se em dois doentes que partilhavam uma ligação familiar (doentes 1 e 4). Contudo, apesar de mutações e fenótipo semelhantes, apresentaram diferentes graus de desempenho nos membros inferiores e superiores, bem como da função cardiorrespiratória (Tabela 2). Assim sendo, confirma-se a existência de uma heterogeneidade clínica secundária a mutações patogénicas idênticas no gene da disferlina. Agentes modificadores, genéticos e/ou ambientais podem explicar estes fenómenos.^{8, 19-20}

No doente 6 apenas se conseguiu detetar uma mutação em heterozigotia (5626 G>A). Nguyen *et al.*¹⁰ apresentaram argumentos na tentativa de explicar a ausência de uma segunda mutação. Por um lado pode dever-se à baixa sensibilidade da técnica de sequenciação utilizada. Por outro lado, a mutação pode estar presente fora das sequências analisadas, como por exemplo em intrões ou em regiões promotoras. Nestes casos, onde apenas uma mutação não considerada como causadora da doença é identificada deve-se recorrer a uma análise complementar no sentido de identificar os rearranjos genómicos que poderão ter passado despercebidos.²¹ A importância da identificação precisa do espectro de mutações prende-se não só com o facto de permitir o desenvolvimento de melhores estratégias de diagnóstico, mas também de novas abordagens terapêuticas.

Conclusão

Este estudo veio confirmar a heterogeneidade da evolução clínica das disferlinopatias nos doentes portugueses. Uma vez que estes doentes tendem a desenvolver disfunção respiratória à medida que a doença vai evoluindo, deve-se manter um acompanhamento regular desta componente, em particular nos doentes com mais idade ou em estadios avançados de doença. Por outro lado, também se observaram anomalias eletrocardiográficas, independentemente da idade ou tempo de evolução da doença, sendo portanto adequado vigiar a função cardíaca nestes doentes. Porque se trata de uma doença autossómica recessiva, é expectável que a restauração da função de um alelo deletério através de terapias genéticas, celulares ou farmacológicas traga benefícios terapêuticos. Nesta serie foram identificadas várias variações no gene *DYSF*, salientando-se assim a importância deste passo tanto para o diagnóstico e caracterização desta doença em Portugal como também no âmbito das opções de tratamento. Assim, a aposta em novas e mais específicas ferramentas de análise genética, tais como micro-arrays, tem-se demonstrado muito promissora, esperando-se que venha a ter um papel muito importante no futuro.

Agradecimentos

Nunca será suficiente pôr em palavras todo o agradecimento às várias pessoas que me ajudaram, direta ou indiretamente, ao longo desta etapa. Apesar de poucas carregam, contudo, um sentimento profundo e sincero.

Ao Professor Doutor António Freire Gonçalves expresso o meu profundo agradecimento pela orientação e apoio incondicionais que muito elevaram os meus conhecimentos. Pelo sentido de responsabilidade que em mim incutiu, assim como a humanidade que deixa transparecer e que não pôde deixar de me inspirar.

Ao meu co-orientador, Doutor Luís Negrão, devo-lhe toda a curiosidade e gosto que desenvolvi por este tema e por me ter proporcionado as condições necessárias para a elaboração deste trabalho de investigação. Agradeço toda ajuda prestada, partilha de saber e confiança que em mim depositou.

Ao Serviço de Neurologia do CHUC, no qual tive o privilégio de trabalhar e que desde o início me fez sentir integrada. Em especial à Doutora Ana Margarida Novo e Doutor Rui Araújo, que acompanharam de perto todo este processo. Pelas suas valiosas contribuições, conselhos e incentivos, um obrigada.

Expresso também a minha gratidão e solidariedade a todos os doentes envolvidos neste estudo e que prestaram uma contribuição fundamental para que fosse possível e para o avanço da investigação científica nesta área do conhecimento.

À minha família, em especial à minha mãe, por quem nutro a maior admiração. Pelas palavras certas na hora certa, pelo carinho que me dá, pela força e retidão de carácter que demonstra. À minha irmã, Mia, que me mostra todos os dias o significado da palavra “coragem” e da importância de seguirmos os nossos sonhos. Aos meus queridos avós e tios, um enorme obrigada por acreditarem sempre em mim e por todos os ensinamentos de vida.

À “família” que Coimbra uniu e que tornou estes seis anos inesquecíveis: um sincero obrigada aos meus amigos Sofia, Fábio, Joana, Xana, Rita, Bárbara, Romeu, João e Nazaré.

Ao Diogo, um beijinho especial, pela paciência, conselhos, por me arrancar um sorriso todos os dias.

Agora, terminada esta etapa, espero poder retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que, constantemente, me oferecem. A eles, dedico todo este trabalho.

“Põe quanto és no mínimo que fazes”. Este trabalho traz um pouco de mim.

Traz um pouco de todos eles.

Referências Bibliográficas

- ¹ Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C, et al. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Myoshi myopathy and limb-girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 1998; **20**:31-36.
- ² Matsuda C, Hayashi YK, Ogawa M, Aoki M, Murayama K, Nishino I, et al. The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. *Hum Mol Genet* 2001; **58**:323-5.
- ³ Okahashi S, Ogawa G, Suzuki M, Ogata K, Nishino I, Kawai M. Asymptomatic sporadic dysferlinopathy presenting with elevation of serum creatine kinase. Typical distribution of muscle involvement shown by MRI but not by CT. *Intern Med* 2008; **47**:305-307.
- ⁴ Illa I, Serrano-Munuera C, Gallardo E, Lasa A, Rojas-García R, Palmer J, et al. Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype. *Ann Neurol* 2001; **49**:130-134.
- ⁵ Paradas C, González-Quereda L, De Luna N, Gallardo E, García-Consuegra I, Gómez H, et al. A new phenotype of dysferlinopathy with congenital onset. *Neuromuscul Disord* 2009; **19**:21-25.
- ⁶ Takahashi T, Aoki M, Suzuki N, Tateyama M, Yaginuma C, Sato H, et al. Clinical features and a mutation with late onset of limb girdle muscular dystrophy 2B. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013; **84**:433-440.
- ⁷ Nishikawa A, Mori-Yoshimura M, Segawa K, Hayashi Y, Takahashi T, Saito Y, et al. Respiratory and cardiac function in Japanese patients with dysferlinopathy. *Muscle & Nerve* 2016; **53**:394-401.

- ⁸ Weiler T, Bashir R, Anderson LV, Davison K, Moss JA, Britton S, et al. Identical mutation in patients with limb-girdle muscular dystrophy 2B or Miyoshi myopathy suggested a role for modifier gene(s). *Hum Mol Genet* 1999; **8**:871-877.
- ⁹ Ueyama H, Kumamoto T, Horinouchi H, Fujimoto S, Aono H, Tsuda T. Clinical heterogeneity in dysferlinopathy. *Intern Med* 2002; **41**:532-6.
- ¹⁰ Nguyen K, Bassez G, Bernard R, Krahn M, Labelle V, Figarella-Branger D, et al. Dysferlin mutations in LGMD2B, Mioyshi myopathy, and atypical dysferlinopathies. *Hum Mutat* 2005; **26**:165.
- ¹¹ Guglieri M, Magri F, D'Angelo MG, Prella A, Morandi L, Rodolico C, et al. Clinical, molecular and protein correlations in a large sample of genetically diagnosed Italian limb girdle muscular dystrophy patients. *Hum Mutat* 2008; **29**:258-66.
- ¹² Linszen WH, Notermans NC, Van der Graaf Y, Wokke JH, Van Doorn PA, Howeler CJ, et al. Miyoshi-type distal muscular dystrophy. Clinical spectrum in 24 Dutch patients. *Brain* 1997; **120**:1989-1996.
- ¹³ Chow G, Marine J, Fleg J. Epidemiology of Arrhythmias and Conduction in Older People. *Clin Geriatr Med* 2012; **28**:539-553.
- ¹⁴ Shinmura K, Ebihara Y, Kawamura M, Tani M, Nakamura Y. Changes in eletrocardiographic findings with aging in a longitudinal study of 500 apparently healthy persons aged 60 years and older. *Jpn J Geriatr* 1994; **31**:366-373.
- ¹⁵ Wenzel K, Geier C., Qadri F, Hubner N, Schulz H, Erdmann B, et al. Dysfunction of dysferlin-deficient hearts. *J Mol Med (Berl)* 2007; **85**:1203-1214.

- ¹⁶ Mahjneh I, Marconi G, Bushby K, Anderson LV, Tolvanen-Mahjneh H, Somer H. Dysferlinopathy (LGMD2B): a 23-year follow-up study of 10 patients homozygous for the same frameshifting dysferlin mutations. *Neuromuscul Disord* 2001; **57**:271-8.
- ¹⁷ Argov Z, Sadeh M, Mazor K, Soffer D, Kahana E, Eisenberg I, et al. Muscular dystrophy due to dysferlin deficiency in Libyan Jews. Clinical and genetic features. *Brain* 2000; **123**:1229-37.
- ¹⁸ Takahashi T, Aoki M, Tateyama M, Kondo E, Mizuno T, Onodera Y, et al. Dysferlin mutations in Japanese Miyoshi myopathy: relationship to phenotype. *Neurology* 2003; **60**:1799-804.
- ¹⁹ Davis DB, Delmonte A, Ly C, McNally E. Myoferlin, a candidate gene and potential modifier of muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2000; **9**:217-26.
- ²⁰ Illarioshkin S, Ivanova-Smolenskaya I, Greenberg C, Nylen E, Sukhorukov VS, Poleshchuk V, et al. Identical dysferlin mutation in limb-girdle muscular dystrophy type 2B and distal myopathy. *Neurology* 2000; **55**:1931-3.
- ²¹ Krahn M, Béroun C, Labelle V, Nguyen K, Bernard R, Bassez G, et al. Analysis of the DYSF Mutational Spectrum in a Large Cohort of Patients, *Hum Mutat* 2008; **30**:345-375.
- ²² Leiden University Medical Centre: Centre for Human and Clinical Genetics (Base de dados em Página de Internet). Pesquisa efetuada de 10/10/2016 a 20/10/2016. Disponível em: <http://www.dmd.nl>.