Danielle Ayub de Barros Guerrieri Pinheiro

**Análise da expressão das glicosiltransferases relacionadas com a
via de glicosilação da proteína α -distroglicana nas Distrofias**

Musculares humanas e murinas

**Expression analysis of α -dystroglycan glycosyltransferases in
human and murine Muscular Dystrophies**

São Paulo

2013

Danielle Ayub de Barros Guerrieri Pinheiro

**Análise da expressão das glicosiltransferases relacionadas com a
via de glicosilação da proteína α -distroglicana nas Distrofias**

Musculares humanas e murinas

**Expression analysis of α -dystroglycan glycosyltransferases in
human and murine Muscular Dystrophies**

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção do Título de
Doutora em Ciências, na Área de
Biologia/Genética.

Versão corrigida. Original encontra-se
disponível no Instituto de Biociências
da USP.

Orientador(a): Prof^a Dr^a Mariz Vainzof

São Paulo

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Ayub-Guerrieri, Danielle

Análise da expressão das glicosiltransferases relacionadas com a via de glicosilação da proteína α -distroglicana nas Distrofias Musculares humanas e murinas / Danielle Ayub de Barros Guerrieri Pinheiro – São Paulo: D. Ayub-Guerrieri, 2013.

98 p.: il.

Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, 2013.

1. Distrofias Musculares 2. Glicosilação 3. Expressão gênica
I. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

COMISSÃO JULGADORA

Prof (a). Dr (a).

Prof (a). Dr (a).

Prof (a). Dr (a).

Prof (a). Dr (a).

Prof (a). Dr (a). Mariz Vainzof

Orientador (a)

DEDICATÓRIA

Ao meu querido marido Max, por todo amor e tudo de bom que me proporcionou ao longo da nossa vida juntos.

Aos amores da minha vida, minhas filhinhas Júlia e Luísa, por muitas vezes, ter deixado de compartilhar com elas alguns ótimos momentos para que a finalização desse trabalho fosse possível.

Aos meus pais, Ricardo e Nélia, que sempre acreditaram nas minhas escolhas.

EPÍGRAFE

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho foi possível graças ao apoio e ajuda de várias pessoas. Gostaria de agradecer, em especial:

À minha orientadora, Dra Mariz Vainzof, por ter continuado a acreditar no meu potencial e novamente ter me dado a oportunidade de estar em seu laboratório, compartilhando dos seus conhecimentos de Biologia Molecular e de vida;

Às Dras Mayana Zatz e Maria Rita Passos-Bueno, pelo exemplo de pesquisadoras e pela convivência harmoniosa;

À minha querida amiga Poliana que sempre me apoiou, tanto nos meus experimentos, quanto na vida pessoal;

À Dra. Lydia Yamamoto e Marta Canovas, que sempre me ensinaram muito e me ajudaram em todas as partes deste trabalho;

Aos meus outros amigos de laboratório: Paula, Letícia, Dinorah, André, Aurea, Camila, Stephanie e Amanda que sempre me ajudaram na prática e discussão de cada um dos experimentos;

Aos colegas dos outros laboratórios: Natássia, Tatiana, Eder, Viviane, Mari, Fanga, Bruno, Denise, Marcos, Fanga, Daniela que sempre colaboraram conosco;

Ao pessoal do CEGH: Márcia, Vanessa Sato, Fernando, Neide, Roberto, Lílian, Vanessa, Kátia, Camila, por sempre estarem ajudando quando possível;

À minha irmã, meu cunhado, aos meus sogros e toda minha família, que sempre me apoiaram e torceram por mim;

À Universidade de São Paulo onde desenvolvi meu mestrado e doutorado, especialmente ao Centro de Estudos do Genoma Humano, obrigada pela formação científica e acadêmica.

À FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa.

.

Muito obrigada a todos!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -MEM: *Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification*

AFS: Células tronco derivadas de líquido amniótico

C57black6 : Camundongo normal

cDNA: DNA codificante total

C-terminal: Região carboxi terminal

Cy3: Cianina 3

DGC: Complexo de Glicoproteínas associadas a distrofina

DMB: Distrofia Muscular de Becker

DMD: Distrofia Muscular de Duchenne

DMEM: *Dubecco's Modified Eagles Medium*

DMP: Distrofia Muscular

DMSO: Dimetil sulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucléico

dNTP: Dinucleotídeo

EB: Corpos embrióides

ES: Células tronco embrionárias

FEEDER: Fibroblastos embrionários de camundongos inativados mitoticamente

FGF: Fator de Crescimento de Fibroblastos

FITC: Fluoresceína isotiocianato

GDF-8: Miostatina

GFP: Proteína fluorescente verde

HEPES: N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico

hESC: Células tronco embrionárias humanas

HGF: Fator de Crescimento de Hepatócitos

HLH: Família protéica *helix-loop-helix*

ICM: Massa de células interna

IF: Imunohistoquímica

IGF-I e IGF-II: Fatores de Crescimento Insulina-*like* I e II

IL-6: Interleucina 6

LIF: Fator Inibidor de Leucemia

Mdx: Camundongo distrófico

MPC: Células precursoras musculares

MSC: Células tronco mesenquimais

Myf4: Miogenina

MyoD: Antígeno de Diferenciação Miogênico

N-terminal: Região amino terminal

Pax7: *Paired box transcription factor 7*

PBS: Solução tampão fosfato

PCR: Reação da polimerase em cadeia

RNA: Ácido ribonucléico

SFB: Soro fetal bovino

TBE: Tampão Tris-borato EDTA

TGFβ: Fator de Crescimento Transformador β

Xp21: Braço curto do cromossomo X

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação do Complexo Distrofina-Glicoproteínas e de outras proteínas musculares associadas.....	03
Figura 2: Representação esquemática da participação das enzimas responsáveis pela glicosilação da proteína α -DG.....	04
Figura 3: Curvas de amplificação de quantificação absoluta de <i>Real time PCR</i> do cDNA de camundongo normal para os genes de glicosilação e <i>Gapdh</i> , e suas respectivas curvas-padrão. No eixo X temos o número de ciclos e no eixo Y temos a fluorescência emitida na amplificação.....	25
Figura 4: Comparação da expressão dos genes de glicosilação na pata traseira dos camundongos <i>C57Black6</i> recém-nascidos.....	27
Figura 5: Comparação da expressão dos genes de glicosilação no músculo gastrocnêmio de camundongos <i>C57Black6</i> de 3 meses.....	27
Figura 6: Comparação da expressão dos genes de glicosilação no músculo gastrocnêmio dos camundongos <i>C57black6</i> de 6 meses.....	27
Figura 7: Comparação da média dos Δ Ct dos genes de glicosilação na pata traseira dos camundongos <i>C57Black6</i> recém-nascidos.....	28
Figura 8: Comparação da média dos Δ Ct dos genes de glicosilação no músculo gastrocnêmio dos camundongos <i>C57Black6</i> de 3 meses.....	28
Figura 9: Comparação da média dos Δ Ct dos genes de glicosilação no músculo gastrocnêmio dos camundongos <i>C57black6</i> de 6 meses.....	28

Figura 10: Comparação da média dos ΔCt dos genes de glicosilação na pata traseira e no músculo gastrocnêmio dos camundongos <i>C57black6</i> recém-nascidos, de 3 meses e de 6 meses.....	29
Figura 11: Comparação por linhagem da média dos ΔCt dos genes de glicosilação na pata traseira e no músculo gastrocnêmio dos camundongos distróficos recém-nascidos, de 3 meses e de 6 meses.....	30
Figura 12: Comparação por gene da média dos ΔCt dos genes de glicosilação na pata traseira e no músculo gastrocnêmio dos camundongos distróficos recém-nascidos, de 3 meses e de 6 meses.....	31
Figura 13: Valores de expressão de <i>Pomt1</i> obtidos com Q-PCR para as amostras de pata traseira (PT) de todos os animais recém-nascidos.....	33
Figura 14: Valores de expressão de <i>Pomgnt1</i> obtidos com Q-PCR para as amostras de pata traseira (PT) de todos os animais recém-nascidos.....	34
Figura 15: Valores de expressão de <i>Large</i> obtidos com Q-PCR para as amostras de pata traseira (PT) de todos os animais recém-nascidos.....	34
Figura 16: Valores de expressão de <i>Fkrp</i> obtidos com Q-PCR para as amostras de pata traseira (PT) de todos os animais recém-nascidos.....	34
Figura 17: Valores de expressão de <i>Pomt1</i> obtidos com Q-PCR para as amostras de músculo gastrocnêmio de todos os animais de 3 meses.....	35
Figura 18: Valores de expressão de <i>Pomgnt1</i> obtidos com Q-PCR para as amostras de músculo gastrocnêmio de todos os animais de 3 meses.....	35
Figura 19: Valores de expressão de <i>Large</i> obtidos com Q-PCR para as amostras de músculo gastrocnêmio de todos os animais de 3 meses.....	36

Figura 20: Valores de expressão de <i>Fkrp</i> obtidos com Q-PCR para as amostras de músculo gastrocnêmio de todos os animais de 3 meses.....	36
Figura 21: Valores de expressão de <i>Pomt1</i> obtidos com Q-PCR para as amostras de gastrocnêmio de todos os animais de 6 meses.....	37
Figura 22: Valores de expressão de <i>Pomgnt1</i> obtidos com Q-PCR para as amostras de gastrocnêmio de todos os animais de 6 meses.....	37
Figura 23: Valores de expressão de <i>Large</i> obtidos com Q-PCR para as amostras de gastrocnêmio de todos os animais de 6 meses.....	38
Figura 24: Valores de expressão de <i>Fkrp</i> obtidos com Q-PCR para as amostras de gastrocnêmio de todos os animais de 6 meses.....	38
Figura 25: Perfil de expressão gênica na pata traseira dos camundongos recém-nascidos (RN), e do músculo gastrocnêmio dos camundongos de 3 meses (3m) e de 6 meses (6m), analisados para os genes da via de glicosilação.....	40
Figura 26: Comparação da expressão dos genes de glicosilação no músculo diafragma de camundongos <i>C57Black6</i> de 3 meses.....	41
Figura 27: Valores de expressão de <i>Pomt1</i> obtidos com Q-PCR para as amostras de músculo diafragma de todos os animais de 3 meses.....	42
Figura 28: Valores de expressão de <i>Pomgnt1</i> obtidos com Q-PCR para as amostras de músculo diafragma de todos os animais de 3 meses.....	42
Figura 29: Valores de expressão de <i>Large</i> obtidos com Q-PCR para as amostras de músculo diafragma de todos os animais de 3 meses.....	43

Figura 30: Valores de expressão de <i>Fkrp</i> obtidos com Q-PCR para as amostras de músculo diafragma de todos os animais de 3 meses.....	43
Figura 31: Média de expressão gênica no músculo diafragma dos camundongos de 3 meses analisados para os genes da via de glicosilação e a sua comparação com a expressão do músculo gastrocnêmio dos animais de mesma idade.....	44
Figura 32: Coloração de Hematoxilina-Eosina mostrando cortes transversais de musculatura esquelética, visualizando-se a diferença entre o grau de afecção dos músculos gastrocnêmio e diafragma de camundongos <i>C57Black6</i> de 3 meses.....	45
Figura 33: Comparação da média dos ΔCt dos genes de glicosilação nos músculos gastrocnêmio e diafragma dos camundongos <i>C57Black6</i> de 3 meses.....	46
Figura 34: Curvas de amplificação de quantificação absoluta de <i>Real time PCR</i> do cDNA de músculo humano controle normal para os genes de glicosilação e <i>GAPDH</i> , e suas respectivas curvas-padrão. No eixo X temos o número de ciclos e no eixo Y temos a fluorescência emitida na amplificação.....	48
Figura 35: Comparação da expressão dos genes de glicosilação no músculo dos controles normais humanos.....	49
Figura 36: Comparação da média dos ΔCt dos genes de glicosilação no músculo dos controles normais humanos.....	50
Figura 37: Valores de expressão de <i>POMT1</i> obtidos com Q-PCR para as amostras de músculo de indivíduos controles normais e pacientes distróficos.....	51

Figura 38: Valores de expressão de <i>POMGnT1</i> obtidos com Q-PCR para as amostras de músculo de indivíduos controles normais e pacientes distróficos.....	52
Figura 39: Valores de expressão de <i>LARGE</i> obtidos com Q-PCR para as amostras de músculo de indivíduos controles normais e pacientes distróficos.....	52
Figura 40: Valores de expressão de <i>FKRP</i> obtidos com Q-PCR para as amostras de músculo de indivíduos controles normais e pacientes distróficos.....	53
Figura 41: Média de expressão gênica no músculo de pacientes analisados para os genes da via de glicosilação.....	53
Figura 42: Perfil de expressão gênica no músculo dos indivíduos controles normais e pacientes distróficos analisados para os genes da via de glicosilação.....	54
Figura 43: <i>Western Blotting</i> para a tentativa de detecção das proteínas da via de glicosilação, em pata-traseira e músculos gastrocnêmio dos camundongos utilizados neste trabalho. A figura mostra a presença de uma banda correspondente ao tamanho da banda esperada de 31 kDa e outra de aproximadamente 200 kDa somente na amostra de camundongos recém-nascidos Colunas: (PM) Peso molecular de 29 kDa e de 200 kDa; (FEM) Amostra de músculo normal humano; e demais amostras de músculo murino de várias linhagens e idades. Todas as amostras foram reagidas com o anticorpo Anti-POMT1. Gel de acrilamida 12%.....	56
Figura 44: <i>Western Blotting</i> para a tentativa de detecção das proteínas da via de glicosilação, em pata-traseira e músculos gastrocnêmio dos camundongos utilizados neste trabalho. Colunas: (PM) Peso molecular de 29 kDa; (FEM) Amostra de músculo normal humano; e demais amostras de músculo murino de varias linhagens e idades. Todas as amostras foram reagidas com o anticorpo Anti-POMGnT1 (35 kDa). Gel de acrilamida 12%.....	57

Figura 45: Gráficos mostrando os valores de quantificação das bandas relativas às proteínas POMT1 e POMGnT1 em comparação com a banda de miosina apresentadas pelos experimentos de *Western Blotting* em amostras de músculo de camundongos normais e distróficos. Não se verificou nenhuma variação significativa na intensidade das bandas, independente da linhagem murina ou da idade analisada..... 58

Figura 46: *Western Blotting* para a tentativa de detecção das proteínas da via de glicosilação, em pata-traseira e músculos gastrocnêmio dos camundongos utilizados neste trabalho. Colunas: (PM) Peso molecular de 97kDa; (FEM) Amostra de músculo normal humano; e demais amostras de músculo murino de varias linhagens e idades. Todas as amostras foram reagidas com o anticorpo Anti-LARGE (88 kDa). Gel de acrilamida 12%..... 60

Figura 47: *Western Blotting* mostrando a presença de uma banda de aproximadamente 100kDa somente na amostra de camundongos recém-nascidos, exemplificado nessa figura pelos camundongos *SJL/J*. Colunas: (PM) Peso molecular de 97kDa; (FEM) Amostra de músculo normal humano; e demais amostras de músculo murino de camundongos *SJL/J* recém-nascidos, de 3 meses e de 6 meses. Todas as amostras foram reagidas com o anticorpo Anti-FKRP. Gel de acrilamida 12%..... 61

Figura 48: *Western Blotting* para a tentativa de detecção das proteínas da via de glicosilação, em músculo de controles normais e pacientes com distrofias utilizados neste trabalho. Colunas: (PM) Peso molecular de 29 e 97kDa; e demais amostras de músculo controles normais e pacientes com distrofias. Todas as amostras foram reagidas com o anticorpo Anti-POMT1 (31 kDa), Anti-POMGnT1 (35 kDa), Anti-LARGE (88 kDa) e Anti-FKRP (60 kDa). Gel de acrilamida 12%..... 62

Figura 49: Gráfico mostrando os valores de quantificação das bandas relativas às proteínas POMT1 e POMGnT1 em comparação com a banda de miosina apresentadas pelos experimentos de *Western Blotting* em amostras de músculo normal e de pacientes distróficos. Não se verificou nenhuma variação significativa na intensidade das bandas, independente do músculo analisado..... 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo das formas de DMC geneticamente reconhecidas, agrupadas em categorias baseado nas suas principais características clínicas e defeitos bioquímicos.....	07
Tabela 2: Genes ligados às distroglicanopatias.....	08
Tabela 3: Amostras processadas de músculo de camundongos normais e distróficos.....	16
Tabela 4: Correlação entre o tipo de distrofia e os modelos murinos correspondentes selecionados para esse estudo.....	18
Tabela 5: Número das biópsias de indivíduos normais e portadores de miopatias presentes no banco de biópsias do Centro de Estudos do Genoma Humano selecionadas para esse estudo.(CN: Controles Normais, DMD: Distrofia Muscular de Duchenne, LGMD 2I: Distrofia Muscular de Cinturas 2I – mutações no gene <i>FKRP</i> , DMC 1A: Distrofia Muscular Congênita 1A – mutações no gene da $\alpha 2$ -laminina, LGMD 2B: Distrofia Muscular de Cinturas 2B – mutações no gene da disferlina.....	19
Tabela 6: Pares de <i>primers</i> de genes de camundongos da via de glicosilação da proteína α -distroglicana e do controle endógeno.....	21
Tabela 7: Pares de <i>primers</i> de genes de humanos da via de glicosilação da proteína α -distroglicana e do controle endógeno.....	22
Tabela 8: Programa seguido pelo equipamento de <i>Real time PCR</i>	22
Tabela 9: Valores de <i>threshold</i> padronizados para as quantificações em <i>Real time PCR</i> . <i>Slope</i> : inclinação da curva de amplificação e respectivo R2.....	26
Tabela 10: Valores de expressão gênica, média e desvio padrão obtidos com Q-PCR da pata traseira (PT) de diferentes animais distróficos recém-nascidos.....	Anexo 1

Tabela 11: Valores de expressão gênica, média e desvio padrão obtidos com Q-PCR de músculo gastrocnêmio (G) de diferentes animais distróficos de 3 meses..... Anexo 1

Tabela 12: Valores de expressão gênica, média e desvio padrão obtidos com Q-PCR de músculo diafragma (D) de diferentes animais distróficos de 3 meses..... Anexo 1

Tabela 13: Valores de expressão gênica, média e desvio padrão obtidos com Q-PCR de músculo gastrocnêmio (G) de diferentes animais distróficos de 6 meses..... Anexo 1

Tabela 14: Valores de p obtidos com o teste de *Mann-Whitney* aplicado às amostras de pata traseira (PT) de diferentes animais distróficos recém-nascidos..... 32

Tabela 15: Valores de p obtidos com o teste de *Mann-Whitney* aplicado às amostras de músculo gastrocnêmio (G) de diferentes animais distróficos de 3 meses..... 32

Tabela 16: Valores de p obtidos com o teste de *Mann-Whitney* aplicado às amostras de músculo gastrocnêmio (G) de diferentes animais distróficos de 6 meses..... 33

Tabela 17: Valores de p obtidos com o teste de *Mann-Whitney* aplicado às amostras de músculo diafragma (D) de diferentes animais distróficos de 3 meses..... 42

Tabela 18: Valores de p obtidos com o teste de *Mann-Whitney* aplicado às amostras de músculo gastrocnêmio e diafragma de camundongos *C57Black6* de 3 meses..... 46

Tabela 19: Valores de *threshold* padronizados para as quantificações em *Real time PCR* dos genes humanos. *Slope*: inclinação da curva de amplificação e respectivo *R2*..... 49

Tabela 20: Valores de expressão gênica, média e desvio padrão obtidos com Q-PCR de músculo de diferentes pacientes distróficos..... Anexo 2

Tabela 21: Valores de p obtidos com o teste de *Mann-Whitney* aplicado às amostras de músculo de indivíduos normais e pacientes com distrofias..... 51

Tabela 22: Valores de os valores de quantificação das bandas relativas às proteínas POMT1 e POMGnT1 em comparação com a banda de miosina apresentadas pelos experimentos de *Western Blotting* em amostras de músculo de camundongos normais e distróficos recém-nascidos..... Anexo 3

Tabela 23: Valores de os valores de quantificação das bandas relativas às proteínas POMT1 e POMGnT1 em comparação com a banda de miosina apresentadas pelos experimentos de *Western Blotting* em amostras de músculo de camundongos normais e distróficos de 3 meses..... Anexo 3

Tabela 24: Valores de os valores de quantificação das bandas relativas às proteínas POMT1 e POMGnT1 em comparação com a banda de miosina apresentadas pelos experimentos de *Western Blotting* em amostras de músculo de camundongos normais e distróficos de 6 meses..... Anexo 3

Tabela 25: Valores de p obtidos com o teste de *Mann-Whitney* aplicado às amostras de pata traseira (PT) de diferentes animais distróficos recém-nascidos..... 59

Tabela 26: Valores de p obtidos com o teste de Mann-Whitney aplicado às amostras de músculo gastrocnêmio (G) de diferentes animais distróficos de 3 meses..... 59

Tabela 27: Valores de p obtidos com o teste de Mann-Whitney aplicado às amostras de músculo gastrocnêmio (G) de diferentes animais distróficos de 6 meses..... 59

Tabela 28: Valores de os valores de quantificação das bandas relativas às proteínas POMT1 e POMGnT1 em comparação com a banda de miosina apresentadas pelos experimentos de *Western Blotting* em amostras de músculo de controles normais humanos e pacientes distróficos..... Anexo 4

Tabela 29: Valores de p obtidos com o teste de <i>Mann-Whitney</i> aplicado às amostras de músculo de indivíduos normais e pacientes com distrofias.....	63
---	----

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Distrofias Musculares.....	01
1.2 Mecanismo de glicosilação e as Glicosiltransferases.....	03
1.3 Distrofias Musculares Congênitas e mutações em genes com função de Glicosiltransferases.....	05
1.4 Modelos murinos para as distrofias musculares.....	08
1.5 Outros modelos animais no estudo das distroglicanopatias.....	11
1.6 Estratégia terapêutica: Superexpressão de <i>LARGE</i>	12
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Estabelecimento de banco de tecidos de camundongos.....	16
3.2 Seleção de biópsias musculares de indivíduos normais e de pacientes com Distrofias Musculares.....	18
3.3 Estudo histopatológico e detecção das proteínas de interesse.....	19
3.3.1 Coloração de Hematoxilina-Eosina (HE).....	19
3.3.2 <i>Western blotting</i>	20
3.3.3 <i>Real-Time PCR (Q-PCR)</i>	21
4. RESULTADOS.....	24
4.1 Estudo de expressão gênica.....	24
4.1.1 Experimentos com camundongos.....	24

4.1.1.1	Elaboração da curva-padrão nas amostras de músculo de camundongos.....	24
4.1.1.2	Comparação da expressão dos genes de glicosilação através dos valores de ΔC_t nos camundongos.....	26
4.1.1.2.1	Controles normais de diferentes idades.....	26
4.1.1.2.2	Camundongos distróficos de diferentes idades.....	30
4.1.1.3	Avaliação da expressão relativa dos genes de glicosilação no músculo gastrocnêmio de camundongos normais e distróficos nas diferentes idades.....	32
4.1.1.4	Comparação da expressão dos genes de glicosilação em 2 músculos diferentemente afetados: gastrocnêmio e diafragma – análise realizada nos animais controles normais de 3 meses.....	41
4.1.2	Experimentos em músculo normal e distrófico humano.....	47
4.1.2.1	Elaboração da curva-padrão nas amostras de músculo normal e distrófico humano.....	47
4.1.2.2	Comparação da expressão dos genes de glicosilação através dos valores de ΔC_t nos controles normais humanos.....	49
4.1.2.3	Avaliação da expressão dos genes de glicosilação nos músculos humanos distróficos.....	50
4.2	Estudo de proteínas por <i>Western Blotting</i>	55
4.2.1	Experimentos com camundongos.....	55
4.2.1.1	Reação com o anticorpo Anti-POMT1 e Anti-POMGnT1.....	55

4.2.1.2 Reação com o anticorpo Anti-LARGE.....	60
4.2.1.3 Reação com o anticorpo Anti-FKRP.....	61
4.2.2 Experimentos com amostras humanas.....	61
5. DISCUSSÃO.....	64
6. CONCLUSÕES.....	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
8. ANEXO 1.....	84
9. ANEXO 2.....	92
10. ANEXO 3.....	94
11. ANEXO 4.....	97
12. ANEXO 5.....	98

1. INTRODUÇÃO

1.1 Distrofias Musculares

As Distrofias Musculares (DMs) constituem um grupo heterogêneo de doenças genéticas em que ocorre degeneração progressiva e irreversível da musculatura esquelética. O processo distrófico se caracteriza por repetidos ciclos de degeneração e regeneração muscular, onde, a partir de certa fase, esta capacidade de regeneração se exaure e a degeneração predomina. Com a perda de massa muscular, ocorre infiltração de tecidos conjuntivo e adiposo, causando a fraqueza e perda de habilidade motora (BUSHBY & BECKMANN, 1995).

Até o presente momento, já foram identificados os genes responsáveis por mais de 30 formas de DMPs e, além disso, sabe-se que existem formas ainda não identificadas (ZATZ, 2001). Mutações em diferentes genes que codificam proteínas musculares resultam na deficiência ou perda de função das mesmas, levando a alterações de importância significativa para o bom funcionamento do músculo.

Dentre as diferentes formas de distrofias, a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é a mais freqüente, com uma incidência de 1 em cada 3000 nascimentos de sexo masculino. Já a sua forma alélica e mais benigna do tipo Becher (BMD), é cerca de 10 vezes mais rara. O gene responsável pela DMD/BMD localiza-se no braço curto do cromossomo X (Xp21). O produto do gene é uma proteína de 427 kDa, denominada distrofina, localizada no citoesqueleto de músculos esqueléticos e cardíacos. Acredita-se que a função da distrofina seria a de manter o tráfego de informações através da membrana da célula muscular, além de manter a sua estabilidade (HOFFMAN *et al.*, 2001). A distrofina interage com um complexo de proteínas integrais da membrana sarcolemal denominado Complexo Distrofina-Glicoproteínas associadas (DGC) que liga o citoesqueleto miofibrilar com a matriz extracelular (ERVASTI & CAMPBELL, 1993; OZAWA *et al.*, 1995). Assim como a deficiência de distrofina leva à distrofia de Duchenne, alterações nas proteínas do complexo DGC causam as distrofias musculares tipo Cinturas (*Limb Girdle Muscular Dystrophy* - LGMD). As formas autossômicas recessivas mais graves, e de início mais precoce são as sarcoglicanopatias, causadas por mutações nos genes que codificam as 4 proteínas sarcoglicanas (α -, β -, γ - e δ -SG). Dentre as formas de distrofias das Cinturas mais benignas, deficiência da enzima calpaína 3 causa LGMD 2A, a deficiência da proteína

sarcolemal disferlina causa a forma LGMD 2B e deficiência da proteína sarcomérica teletonina causa LGMD 2G. Além disso, mutações no gene LAMA2 que codifica a cadeia $\alpha 2$ da laminina muscular (laminina2) causam uma forma de distrofia muscular congênita muito grave, DMC 1A. A ausência de distrofina no músculo distrófico resulta na deficiência secundária dos componentes do DGC (OHLENDIECK & CAMPBELL, 1991; ERVASTI & CAMPBELL, 1993).

As proteínas que formam o DGC são do tipo integrais e periféricas, organizadas em subcomplexos distintos: distrofina-sintrofina, o subcomplexo distroglicano (α - e β -distroglicanas) e o subcomplexo sarcoglicano (α -, β -, γ - e δ -sarcoglicanas) (COHN & CAMPBELL, 2000). A distrofina e as sintrofina são proteínas do citoesqueleto, a β -distroglicana (β -DG), as sarcoglicanas (SG) e o sarcospan são proteínas transmembrânicas e a α -distroglicana (α -DG) é componente da matriz extracelular (COHN & CAMPBELL, 2000) (FIGURA 1).

As glicoproteínas α -, β -, γ -, δ -SG formam o complexo sarcoglicano. Elas se encontram fortemente interligadas, e a deficiência primária de qualquer uma delas geralmente leva à deficiência secundária do complexo todo. Mutações nos genes que codificam essas proteínas acarretam às formas mais graves de DMs denominadas sarcoglicanopatias, com herança autossômica recessiva.

O complexo distroglicano é formado pelas proteínas α - e β -DG que são codificadas por um único gene DAG1, localizado no cromossomo 3q (COHN, 2005). A α -distroglicana interage com a matriz extracelular através da porção externa da proteína $\alpha 2$ -laminina (merosina), formando desta maneira uma conexão entre a matriz extracelular e o citoesqueleto (ERVASTI & CAMPBELL, 1993). A laminina 2 é a principal proteína da matriz extracelular na membrana basal da fibra muscular. Forma um heterotrímero em forma de cruz com as cadeias $\alpha 2$, $\beta 1$ e $\gamma 1$. Mutações no gene LAMA2, que codifica a cadeia $\alpha 2$ da laminina muscular, causam uma forma de distrofia muscular congênita muito grave, DMC 1A. A proteína β -DG está ligada à α -DG e ao complexo sarcoglicano na membrana (COHN & CAMPBELL, 2000), e também interage com outras proteínas citoplasmáticas, incluindo a região C-terminal da distrofina, utrofina e actina (DOLATSHAD *et al.*, 2005). Alterações na β -DG não estão associadas à miopatias conhecidas. No entanto, alterações na α -DG estão envolvidas com várias formas de

distrofias ligadas a mutações em genes que codificam enzimas glicosiltransferases responsáveis pela sua glicosilação. A análise de proteínas em biópsias musculares de pacientes com distroglicanopatias mostra uma hipoglicosilação da α -DG e redução significativa de numerosos ligantes da matriz extracelular (MUNTONI *et al.*, 2004a). Portanto, o estudo da via de glicosilação de proteínas musculares se tornou muito importante na compreensão de novos mecanismos causadores de doenças neuromusculares humanas.

FIGURA 1: Representação do Complexo Distrofina-Glicoproteínas e de outras proteínas musculares associadas (CAMPBELL, 2006).

1.2 Mecanismo de glicosilação e as Glicosiltransferases

O mecanismo de glicosilação é um processo que consiste na adição de açúcares em regiões específicas das proteínas. Este mecanismo pós-traducional é essencial para a moldagem, estrutura e atividade protéica, bem como para a sua distribuição e endereçamento nas células. As glicoproteínas recebem inicialmente os oligossacarídeos no Retículo Endoplasmático (RE) e na sequência são acondicionadas no Complexo de Golgi (CG) onde seus açúcares são modulados pelas glicosiltransferases.

As glicoproteínas podem ser N- ou O- glicosiladas, dependendo do tipo de ligação dos carboidratos à cadeia lateral do aminoácido. Na N-glicosilação, o carboidrato se liga ao

átomo de nitrogênio da cadeia lateral da asparagina e na O-glicosilação, o carboidrato se liga ao átomo de oxigênio de cadeia lateral da treonina ou serina. Estes carboidratos são potencialmente hidrofílicos e alteram a polaridade e solubilidade das proteínas às quais estão conjugadas. Além disso, a cadeia de oligossacarídeos adicionada à proteína pode influenciar a sequência de eventos do enovelamento que determinam a estrutura terciária da proteína.

A proteína α -DG é altamente glicosilada e estudos relacionados a este processo sugerem que este mecanismo teria importante função na ligação e interação dessa proteína na matriz extracelular (MUNTONI & VOIT, 2004). Na presença de mutações nos genes que codificam as glicosiltransferases, a proteína α -DG é identificada com tamanho menor (Glicosilada: 150 kDa e hipoglicosilada: 70 a 120 kDa). A hipoglicosilação da α -DG resulta em uma diminuição na ligação e interação desta proteína com as proteínas da matriz extracelular, provocando uma diminuição da resistência mecânica da fibra muscular, sua degeneração e necrose, com conseqüente fraqueza muscular (MUNTONI *et al.*, 2004).

A adição de açúcares à proteína α -DG se inicia no RE pelas glicosiltransferases POMT1 e POMT2 (*O-Mannosyltransferase* I e II). Na sequência, o mecanismo de glicosilação continua no CG, sendo modulado pelas glicosiltransferases POMGnT1 (*O-mannose* β 1,2-*N-acetylglucosaminyltransferase*), Fukutina (FKTN), *Fukutin Related Protein* (FKRP) e Large (LARGE), respectivamente. Finalmente as B4GALTs (β -1,4-*galactosyltransferases*) e as ST3GALs (ST3 β -*galactoside* α -2,3-*sialyltransferases*) terminam o mecanismo de glicosilação no citoplasma (BELTRÁN-VALERO de BERNABÉ *et al.*, 2002) (FIGURA 2).

FIGURA 2: Representação esquemática da participação das enzimas responsáveis pela glicosilação da proteína α -DG (BELTRÁN-VALERO de BERNABÉ *et al.*, 2002).

1.3 Distrofias Musculares Congênitas e mutações em genes com função de Glicosiltransferases

As distrofias musculares congênitas (DMC) são um grupo de doenças musculares clinicamente heterogêneas, caracterizadas pela presença de fraqueza muscular difusa no período neonatal, grau variável de contraturas nas articulações e possível associação com anormalidades no sistema nervoso central ou olhos. A biópsia muscular invariavelmente apresenta alterações histopatológicas distróficas (DUBOWITZ, 1985; 1996; 1997; 1999).

Primeiramente, os pacientes foram agrupados em categorias específicas, baseado nas suas principais características clínicas. Atualmente, com os avanços dos estudos moleculares, os pacientes são classificados de acordo aos defeitos genéticos e bioquímicos (MUNTONI & VOIT, 2004). Cerca de 50% dos casos com a forma clássica grave de DMC, apresentam ausência da proteína merosina, devido a mutações no gene *LAMA2*. Estudos posteriores identificaram uma deficiência parcial de merosina em pacientes com outros fenótipos clínicos, incluindo quadro de distrofias musculares tipo Cinturas (LGMD) (MARTIN, 2003).

Estudos recentes têm demonstrado casos de DMC com mutações em genes envolvidos ao mecanismo de glicosilação da α -DG. Até o momento foram descritas na literatura algumas formas de distrofias que estão associadas a mutações nos genes que codificam as glicosiltransferases. São elas:

Síndrome de Walker-Warburg (WWS): uma forma grave de DMC, com anormalidades oculares e encefálicas como lisencefalia tipo II (GREWAL *et al.*, 2003), provocada por mutações no gene *POMT1*.

Muscle-eye-brain (MEB): doença autossômica recessiva com fenótipo semelhante à WWS, porém mais brando (GREWAL *et al.*, 2003). Mutações no gene *POMGnT1* estão associadas a essa doença.

Fukuyama Congenital Muscular Dystrophy (FCMD): Sabe-se que mutações no gene da proteína fukutina estão associadas a essa forma de DMC. Os pacientes diagnosticados com essa distrofia apresentam fraqueza muscular e retardo mental graves. Ao contrário dos genes citados anteriormente e estabelecidos como sintetizadores de glicosiltransferases conhecidas, o gene da Fukutina não codifica proteínas com funções

estritamente comprovadas. Estudos indicam que a fukutina apresenta via de funcionamento semelhante à do gene *POMT1* (GREWAL *et al.*, 2003).

Distrofia Muscular Congênita tipo 1C (DMC 1C): Mutações no gene *FKRP* estão associadas a essa doença e também a uma forma branda de distrofia de cinturas do tipo 2I. *FKRP* é uma proteína de membrana tipo II, que apesar de ter função ainda desconhecida, de acordo com estudos comparativos da sequência de aminoácidos dessa proteína, atribui-se a ela uma provável função de fosfoligante-transferase, assim como à proteína fukutina (GREWAL *et al.*, 2003).

Distrofia Muscular Congênita tipo 1D (DMC 1D): Uma nova forma de DMC, a forma DMC 1D, também foi associada a mutações no gene *LARGE*. Até pouco tempo, não se tinha certeza de função dessa proteína, mas hoje já se sabe que ela atua diretamente na glicosilação, pois sua ausência na célula está associada a falhas na estrutura glicosilada da α -DG (BROWNING *et al.*, 2005). Da mesma maneira, estudos conseguiram promover uma superexpressão desse gene, resultando em reestruturação do funcionamento da α -DG (BARRESI *et al.*, 2004). Possui uma forma paráloga denominada *LARGE2*, com papel semelhante (GREWAL *et al.*, 2005).

Por outro lado, mutações nos genes codificadores das glicosiltransferases *B4GALTs* e *ST3GALs* ainda não foram relacionadas a nenhuma forma conhecida de distrofia (TABELA 1).

TABELA 1: Resumo das formas de DMC geneticamente reconhecidas, agrupadas em categorias baseado nas suas principais características clínicas e defeitos bioquímicos.

Distrofia Muscular Congênita	Herança	Localização	Gene	Proteína
1- Com comprometimento de SNC				
a- Fukuyama (FCMD)	AR	9q31-33	<i>FCMD</i>	Fukutina
b- <i>Muscle-Eye-Brain</i> (MEB)	AR	1p32.34	<i>POMGnT1</i>	O-mannoseb-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase
c- <i>Walker-Warburg</i> (WWW)	AR	9q34.1	<i>POMT1</i>	O-mannosyltransferase
2- Sem comprometimento do SNC (Formas clássicas ou puras)				
a. Merosina deficiente (DMC 1A)	AR	6q2	<i>LAMA2</i>	α 2-Laminina
b. Merosina positiva ou Parcial				
Integrina-deficiente	AR	12q13	<i>ITG α-7</i>	α 7 β 1-Integrina
Com Espinha Rígida	AR	1p35-36	<i>SEPNI</i>	Selenoproteína
DMC 1C	AR	19q13.3	<i>FKRP</i>	<i>Fukutin related protein</i>
DMC 1B	AR	1q42	?	?
DMC 1D	AR	22q	<i>LARGE</i>	Large
Síndrome de Ullrich	AR	21q22.3	<i>COL6A2</i>	Colágeno 6

Nos últimos anos, o grupo de distrofias musculares causadas pela glicosilação anormal da proteína α -distroglicana tem sido foco de muitos estudos. Devido a sua grande importância, em 2008 foi realizado o primeiro *workshop* internacional de defeitos de glicosilação em distrofias musculares, que teve como objetivo principal discutir as pesquisas em andamento ligadas ao diagnóstico desse tipo de doença, assim como verificar as tentativas terapêuticas e o uso de diferentes modelos animais para essa investigação (CHAN *et al.*, 2008).

Já se conhece um número maior de doenças associadas com este defeito e fica cada vez mais claro que a maioria das distroglicanopatias é geneticamente heterogênea e que a relação entre mutações em algum gene em particular e o fenótipo resultante é muito complexa (TABELA 2).

TABELA 2: Genes ligados às distroglicanopatias (MOORE & HEWITT, 2009).

Gene	Doença associada
<i>POMT1</i>	WWS, MEB, DMC+DC, LGMD 2K
<i>POMT2</i>	WWS, MEB, DMC+DC, LGMD 2N
<i>POMGnT1</i>	MEB, LGMD
<i>Fukutina</i>	WWS, FCMD, DMC (sem DC), LGMD 2I
<i>FKRP</i>	WWS, MEB, DMC+DC, DMC (sem DC), DMC 1C, LGMD 2I
<i>LARGE</i>	WWS, DMC 1D

WWS Síndrome de Walker-Walburg, *MEB* doença de Muscle-eye-brain, *DMC* Distrofia Muscular Congênita, *DC* deficit cognitivo, *LGMD* Distrofia Muscular de Cinturas, *DMC1C* Distrofia Muscular Congênita tipo 1C, *DMC1D* Distrofia Muscular Congênita tipo 1D.

Atualmente, cada vez mais se observa que não existe correlação entre o grau de glicosilação da proteína α -DG e a severidade da doença. Em 2008, MUNTONI *et al.*, através de experimentos de imunomarcagem e co-precipitação da proteína α -DG com anticorpos específicos, demonstraram mais uma vez que, na ausência de glicosilação, a proteína se apresenta em menor quantidade, causando uma instabilidade do complexo, e conseqüentemente provocando fraqueza muscular. Por outro lado, JIMENEZ-MALLEBRERA *et al.* (2008) verificaram uma relação direta em pacientes com mutações em *POMT1*, *POMT2* e *POMGnT1*, entretanto, em pacientes com mutações nos genes da *fukutina* e *FKRP*, a relação entre os níveis de glicosilação da proteína α -DG e os sinais clínicos não foram aparentes.

1.4 Modelos murinos para as distrofias musculares

Modelos murinos para diversos tipos de doenças podem ocorrer naturalmente ou serem criados por engenharia genética. Estes modelos fornecem valiosas informações para o entendimento da patogênese de cada doença (ALLAMAND *et al.*, 2000). Estudos clínicos e neurológicos em animais com fraqueza muscular têm ajudado a identificar alguns modelos animais tais como camundongos, cães e gatos, deficientes para diferentes proteínas musculares. Os estudos realizados nestes animais são cruciais para aumentar nossos conhecimentos a respeito de doenças genéticas humanas e para a investigação de

terapias experimentais (VAINZOF *et al.*, 2008). A facilidade com que o genoma murino pode ser manipulado faz do camundongo uma ferramenta bastante utilizada em testes moleculares e na avaliação de complexos protéicos musculares.

Camundongo Dmd^{mdx} – Distrofia Muscular de Duchenne

O camundongo Dmd^{mdx} é o modelo molecular e bioquímico para a distrofia humana de Duchenne (DMD). O defeito molecular no camundongo Dmd^{mdx} consiste em uma mutação de ponto no exon 23 do gene da distrofina, que forma um códon de parada prematuro (BULFIELD *et al.*, 1984). Como em pacientes com DMD, o músculo de camundongos Dmd^{mdx} é afetado por degeneração e necrose. Entretanto, o camundongo Dmd^{mdx} exibe um curso clínico mais brando (PASTORET *et al.*, 1995). Além disso, a fraqueza muscular não é característica e o tempo de vida não é reduzido. Apesar de inicialmente as células satélites se replicarem para repor e regenerar a injúria, essas células tornam-se gradualmente escassas com a idade e o camundongo passa a demonstrar deterioração muscular (PASTORET *et al.*, 1995; REIMANN *et al.*, 2000). Esse camundongo também apresenta um grande número de fibras revertentes, da ordem de 2 a 3% (ou seja, fibras que passam a expressar novamente a distrofina, de forma espontânea). Como nos pacientes com DMD, a deficiência de distrofina leva a deficiência de todo o DGC. Por isso, a via de glicosilação da proteína α -DG nesse modelo pode eventualmente também estar envolvida e merece mais estudos.

Camundongo $Lama2^{dy}/J$ e $Lama2^{dy2J}/J$ – Distrofia Muscular Congênita tipo 1A

Outros modelos murinos naturais de grande aplicação clínica são os da DMC com deficiência de α 2-laminina (VILQUIN *et al.*, 1999). Existem inúmeras linhagens de camundongos com mutações espontâneas no gene $Lama2$, incluindo os tipos $Lama2^{dy}/J$ e $Lama2^{dy2J}/J$, identificadas em 1955 e 1970, respectivamente.

O camundongo $Lama2^{dy}/J$ expressa um polipeptídeo de α 2-laminina de tamanho aparentemente normal, porém em quantidade muito reduzida e o animal apresenta um fenótipo bastante grave de distrofia muscular, com fraqueza significativa e ciclo de vida reduzido (GUO *et al.*, 2002). A mutação neste camundongo ainda não foi identificada. No camundongo $Lama2^{dy2J}/J$ foi identificada uma mutação de ponto, a troca de uma guanina por uma adenina, em sítio de emenda do RNA, que leva à tradução de uma molécula α 2-

laminina onde falta o domínio VI N-terminal (XU *et al.*, 1994; SUNADA *et al.*, 1995). Esta mutação cria um sítio de restrição para a enzima NDE1, importante em sua genotipagem. A proteína truncada aparece em quantidade ligeiramente reduzida, quando comparado a um camundongo normal, no músculo esquelético do afetado e este apresenta um quadro clínico menos grave do que o camundongo *Lama2^{dy}/J* (GUO *et al.*, 2002).

Os camundongos homozigotos para as mutações *Lama2^{dy}/J* e *Lama2^{dy2J}/J* são caracterizados por fraqueza e paralisia progressivas, começando por volta das 3 ½ semanas de vida. Os membros posteriores são afetados primeiro. No caso do camundongo *Lama2^{dy}/J*, a sobrevivência geralmente não ultrapassa os 6 meses de idade, e são freqüentemente estéreis. Os camundongos *Lama2^{dy2J}/J* homozigotos possuem expectativa de vida comparável a de camundongos normais e alguns afetados podem chegar a se reproduzir. O peso e tamanho corporal também são semelhantes a de um camundongo normal, mas estes camundongos exibem um comportamento de flexão de patas traseiras de encontro ao tronco, quando levantados pela cauda, a partir de 2 a 3 semanas de idade. Além disso, desenvolvem uma grave paralisia dos membros posteriores, que passam a arrastar a partir de 3 a 4 semanas de vida. Esses apresentam também alterações no sistema nervoso periférico, com atraso na mielinização (Jackson Laboratories Database, 2007). O músculo esquelético mostra-se degenerado, com aumento de tecido conjuntivo intersticial, variação de calibre de fibras, necrose e fibrose.

Camundongo *Large^{myd}* – Distrofia Muscular Congênita tipo 1D

O modelo murino *Large^{myd}* é um modelo natural e foi identificado em 1963 pelo laboratório da Jackson nos Estados Unidos. Este camundongo possui uma deleção no gene que codifica a proteína Large. Em humanos, mutações no gene *LARGE* causam a DMC 1D. A deleção nos camundongos remove os exons 5, 6 e 7, abrangendo cerca de 100kb do tamanho total do gene. A deleção no gene *Large*, nos modelos murinos gera um fenótipo miopático no qual o camundongo tem marcha anormal, tamanho reduzido e postura anormal da cintura posterior. Essas características já podem ser observadas a partir do 12 dias de vida. Alterações na expressão desta proteína geram deficiências na glicosilação da proteína α -DG de modo a desestruturar o DGC, impedindo que ele se ligue corretamente aos componentes da matriz extracelular e às proteínas internas da fibra muscular, gerando o padrão miopático. Desta maneira este modelo é utilizado para investigação dos mecanismos

moleculares, bioquímicos e clínicos das distroglicanopatias. Além disso, ele é um excelente modelo histopatológico, pois apresenta significativa fraqueza muscular, associada a alterações musculares, que refletem os achados observados em pacientes humanos.

Camundongo *SJL/J* – Distrofia Muscular de Cinturas tipo 2B

O camundongo *SJL/J* é um modelo natural para diferentes doenças humanas. Recentemente identificou-se nele uma deleção de 171pb no gene da disferlina, que causa a deleção de 57 amino ácidos, resultando numa molécula 6.5 kDa menor que a proteína normal de aproximadamente 230 kDa (BITTNER *et al.*, 1999), provocando sua instabilidade. O *SJL/J* apresenta uma redução média de 85% nos níveis de disferlina, tornando-o um bom modelo para LGMD 2B (VAINZOF *et al.*, 2003). Ele desenvolve uma miopatia espontânea caracterizada por progressão lenta de perda muscular (BITTNER *et al.*, 1999) e força correspondente a um aumento da patologia do músculo incluindo fibras musculares com núcleos centrais, variação de calibre, *splitting*, infiltração inflamatória, necrose e eventual substituição de músculo por tecido gorduroso (VAINZOF *et al.*, 2003). Este quadro afeta primeiramente os músculos proximais enquanto os músculos distais permanecem menos afetados. Cruzamentos subsequentes de *SJL/J* X *C57BL/10* revelaram que o fenótipo muscular apresentado é herdado como caráter autossômico recessivo (BITTNER *et al.*, 1999). Este camundongo é extremamente suscetível a doenças autoimune, linfoma e infecções virais. Geralmente os machos tem um comportamento agressivo (HO *et al.*, 2004).

1.5 Outros modelos animais no estudo das distroglicanopatias

Além dos modelos naturais, está sendo gerado um grande número de modelos animais, com a finalidade de proporcionar maior conhecimento a respeito do desenvolvimento das distroglicanopatias. Um modelo que se tornou bastante atrativo para estudos funcionais dos genes das distroglicanopatias foi o *zebrafish*. Todos os genes envolvidos com a glicosilação são conservados nesse peixe e estão presentes em uma simples cópia no seu genoma. Sendo assim, todos os epitopos da proteína α -DG também são conservados (MOORE *et al.*, 2008; TRORNHILL *et al.*, 2008; KAWAHARA *et al.*, 2010). Esses trabalhos demonstraram que a inibição de *FKRP* em embriões *zebrafish*

resultou em uma série de anormalidades, também observados em humanos com distrofias musculares associadas a mutações nesse gene. Adicionalmente, eles apresentavam redução da glicosilação da proteína α -dystroglicana e um comprimento menor das miofibras. KAWAHARA *et al.* (2010) também observaram que a co-injeção de mRNA de *FKRP* humano ou de peixe com o morfolino restaura o desenvolvimento normal, a glicosilação e a atividade de ligação da proteína laminina. Já a co-injeção de mRNA de *FKRP* humano contendo a mutação encontrada em pacientes com Síndrome de Walker-Walburg, Distrofia Muscular Congênita 1C e Distrofia Muscular de Cinturas 2D não restauram o seu fenótipo de maneira significativa. Esses mutantes mostraram um fenótipo similar ao observado em humanos.

A similaridade da glicosilação entre humanos e drosófilas faz desse organismo um modelo também muito atrativo (WAIRKAR *et al.*, 2008).

Por outro lado, apesar de identificados somente 6 genes causadores de dystroglicanopatias, têm se observado que muitos pacientes não possuem mutações em nenhum deles e provavelmente outras proteínas ainda venham a ser identificadas. É provável que nem todas sejam relacionadas com o processo de glicosilação, mas podem ser importantes para o processamento ou estabilidade da α -DG. O modelo de galinha mutante com distrofia muscular e perda da α -DG mostrou ter uma mutação em um gene de ligase da ubiquitina WWP1 (MATSUMOTO *et al.*, 2008), enquanto um modelo felino mostrou uma redução nos níveis de dystroglicana, mas não apresentou mudanças na glicosilação (MARTIN *et al.*, 2008).

1.6 Estratégia terapêutica: Superexpressão de *LARGE*

Atualmente, tem-se investigando a possibilidade de se utilizar *LARGE* em terapia genética para todos os tipos de distrofia muscular congênita causada por defeito de glicosilação da α -DG. Já tinha sido demonstrado que a superexpressão de *LARGE* pode funcionar como tratamento para vários tipos de dystroglicanopatias (BARRESI *et al.*, 2004; MUNTONI *et al.*, 2004b). Atualmente um estudo *in vivo* confirmou essa hipótese, mostrando que a eletroporação do gene *LARGE* em músculo pode resgatar parcialmente a glicosilação da α -DG em camundongos mutantes para *fukutina* e *POMGnT1*

(KANAGAWA *et al.*, 2009). Além disso, os mesmos autores demonstraram que uma pequena quantidade da proteína α -DG intacta já é suficiente para a integridade muscular, mantendo a ligação com a proteína laminina e prevenindo a progressão da doença. Sendo assim, sugerem que o tratamento das distroglicanopatias não requer a total reconstituição da glicosilação. Esse trabalho é a primeira evidência *in vivo* que a transferência do gene *LARGE* pode corrigir defeitos de glicosilação em outros modelos animais que não o camundongo *Large^{myd}*.

Por outro lado, ZANG *et al.* verificaram que *LARGE* regula a glicosilação de proteínas não relacionadas à distroglicana (ZANG *et al.*, 2011). Fizeram isso superexpressando *LARGE* em células deficientes em distroglicana e analisaram as proteínas glicosiladas por *Western blot*. Surpreendentemente, a superexpressão de *LARGE* nessas células levou a glicosilação dependente da imunorreatividade com IIIH6C4 e VIA4-1 (anteriormente só se sabia que estes anticorpos reconheciam a região glicosilada da α -DG). Além disso, as proteínas hiperglicosiladas apresentaram a capacidade funcional para ligar à proteína laminina na matriz extracelular e promover a estabilidade da superfície da célula. Entretanto, ainda não se sabe se esses outros alvos representam uma ou várias proteínas.

Outro estudo verificou os efeitos da superexpressão de *LARGE* em célula do ovário de hamster chinês (CHO) com mutações diferentes, mas todas provocando deficiência de glicosilação (HU *et al.*, 2011). Verificaram que em 1 mutante deficiente em O-manosilação, a superexpressão de *LARGE* não induz a incorporação de glicanos na DG. Quando se introduz o cDNA selvagem, as células deficientes restauram totalmente a glicosilação, sugerindo que *LARGE* somente participa da O-manosilação. Também verificaram pela análise quantitativa dos glicanos ligados à α -DG que as células superexpressando *LARGE* podem induzir efetivamente a ligação dos açúcares na N-glicosilação.

No entanto, antes de ser colocada como uma estratégia terapêutica, torna-se necessária uma avaliação do quão seguro é a superexpressão de *LARGE* a longo prazo *in vivo*. BROCKINGTON *et al.* comprovaram que esta técnica é segura, tanto por meio de intervenção genética quanto farmacológica no músculo, e poderia melhorar a força muscular em pacientes afetados por distroglicanopatias (BROCKINGTON *et al.*, 2001). Os autores geraram 4 linhagens de camundongos expressando o transgene humano *LARGE*. Observando-se os camundongos gerados, eles eram indistinguíveis dos tipo selvagem. A

análise dos tecidos dos camundongos jovens mostrou um padrão variável de expressão do transgene: maior nos músculos esqueléticos e cardíacos, e menor nos rins, cérebro e fígado. No músculo estriado, a expressão do transgene estava correlacionada com a hiperglicosilação da α -distroglicana, conforme determinado pela imunorreatividade ao anticorpo IIH6 e aumento da ligação da laminina. Os outros componentes da matriz extracelular eram normalmente expressos, e histologia muscular era indistinguível dos controles de tipo selvagem. A análise fisiológica mais detalhada do músculo demonstrou uma perda de força em resposta ao exercício excêntrico nos animais mais velhos, mas não nos mais jovens, sugerindo que este déficit ocorria ao longo do tempo. No entanto, esta característica manteve-se subclínica uma vez que nenhuma patologia foi observada nos músculos de camundongos mais velhos, incluindo o diafragma, que é sensível a danos mecânicos de carga induzida.

Portanto, alterações no processo de glicosilação da proteína α -distroglicana constituem um novo mecanismo patogênético nas doenças neuromusculares, abrindo novas possibilidades de estudo. Neste sentido, uma melhor caracterização das proteínas envolvidas neste processo, bem como a elucidação destas se apresenta de extrema relevância para a compreensão das diferentes formas de distrofias.

Para melhor avaliar o efeito das alterações no processo de glicosilação da proteína α -distroglicana no funcionamento do músculo esquelético, e o quanto esse processo interfere no quadro clínico da doença, estamos realizando estudos de expressão por *Real-time PCR* dos genes codificantes das glicosiltransferases, em músculo de pacientes e de camundongos distróficos para doenças neuromusculares.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar o perfil de expressão dos genes envolvidos na glicosilação da proteína α -distroglicana *in vivo*, e relacionar com os diferentes processos distróficos.

2.2 Objetivos Específicos:

1-) Estudar a expressão do RNA dos transcritos dos genes que atuam na via de glicosilação da α -DG, *POMT1*, *POMGnT1*, *LARGE* e *FKRP*, em tecido muscular de pacientes e de diferentes modelos murinos para doenças musculares degenerativas;

2-) Avaliar o respectivo produto proteico destes mesmos genes nos grupos de pacientes e modelos murinos;

3-) Relacionar o mecanismo de glicosilação da α -DG com as alterações histopatológicas apresentado pelos diferentes processos distróficos em diferentes idades de manifestação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estabelecimento de banco de tecidos de camundongos

As linhagens de camundongos utilizadas neste projeto foram mantidas em nosso biotério, no Centro de Estudos do Genoma Humano. Foram estabelecidas as técnicas de genotipagem e seleção de animais para acasalamento ou experimentação, sendo o projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais Vertebrados em Experimentação do Instituto de Biologia da USP, segundo o protocolo 075/2008 (ANEXO 5). Nosso objetivo foi formar um banco de tecidos com 10 animais de diversas idades (TABELA 3): Recém-nascidos, 3 meses e 6 meses, das linhagens de camundongo normal *C57black6* e camundongos distróficos *Dmd^{mdx}* (BULFIELD *et al.*, 1984), *Lama2^{dy2J}/J* (MEIER & SOUTHARD, 1970), *Large^{myd}* (GREWAL *et al.*, 2001), *SJL/J* (BITTNER *et al.*, 1999).

TABELA 3: Amostras processadas de músculo de camundongos normais e distróficos.

Linhagem	Idades		
	Recém-nascidos	3 meses	6 meses
<i>C57Black6</i>	C57Black 26	C57Black 19	C57Black 1
	C57Black 27	C57Black 20	C57Black 2
	C57Black 28	C57Black 21	C57Black 3
	C57Black 29	C57Black 22	C57Black 4
	C57Black 40	C57Black 23	C57Black 5
	C57Black 41	C57Black 24	C57Black 6
	C57Black 42	C57Black 25	C57Black 7
	C57Black 43	C57Black 46	C57Black 8
	C57Black 44	C57Black 47	C57Black 49
	C57Black 45	C57Black 48	C57Black 50
<i>Dmd^{mdx}</i>	MDX 42	MDX 8	MDX 1
	MDX 43	MDX 9	MDX 2
	MDX 44	MDX 10	MDX 3
	MDX 45	MDX 11	MDX 4
	MDX 46	MDX 18	MDX 5
	MDX 47	MDX 25	MDX 6
	MDX 49	MDX 26	MDX 7
	MDX 50	MDX 27	MDX 35
	MDX 51	MDX 28	MDX 36
	MDX 52	MDX 29	MDX 37
	LG 80	LG A118	PL2A
	LG 99	LG A121	PL2B
	LG 100	LG A123	PL2C

<i>Large^{myd}</i>	LG B102	LG A124	LG 13
	LG B104	LG A125	LG 14
	LG B106	LG A129	LG 15
	LG B107	LG A130	LG A141
	LG C14	LG A131	
	LG C15	LG A132	
		LG A133	
<i>Lama2^{dy2J}/J</i>	2J 7D	2J 16	2J 10
	2J 9D	2J 17	2J 12
	2J 13D	2J 61B	2J 13
	2J 14D	2J 69B	2J 15
	2J 15D	2J 70B	2J 18
	2J 16D	2J 79B	2J 19
	2J 17D	2J 88B	2J 20
	2J 18D	2J 92B	2J IP20
	2J 19D	2J 63C	2J IP21
	2J 20D	2J 68C	2J 126B
		2J 69C	
<i>SJL/J</i>	SJL 19	SJL 1	SJL 11
	SJL 20	SJL 2	SJL 12
	SJL 21	SJL 3	SJL 13
	SJL 22	SJL 4	SJL 14
	SJL 23	SJL 5	SJL 15
	SJL 24	SJL 6	SJL 16
	SJL 25	SJL 7	SJL 17
	SJL 38	SJL 28	SJL 18
	SJL 39	SJL 29	SJL 33
	SJL 40	SJL 30	

Os músculos avaliados, que foram coletados e processados para as diferentes técnicas são: gastrocnêmio, quadríceps e diafragma. Para o estudo imunohistoquímico, fragmentos musculares de camundongos, imediatamente colhidos de, em média, 0,5 cm³ foram fixados em blocos de cortiça, de modo que seu corte apresente disposição transversal das fibras nas lâminas onde foram fixados, e congelados em nitrogênio líquido. Os fragmentos musculares foram cortados em criostato refrigerado à temperatura de -25°C e armazenadas em freezer -70°C. Já para a análise por *Western blotting* e *Real-Time PCR*, os fragmentos musculares de mesmo tamanho foram também congelados em nitrogênio líquido e macerados com a finalidade de preparação de extrato de proteínas e de extração de RNA.

3.2 Seleção de biópsias musculares de indivíduos normais e de pacientes com Distrofias Musculares

O nosso laboratório já dispõe de biópsias musculares de pacientes diagnosticados como portadores de Distrofias Musculares. Para a extração de tecido muscular, os pacientes foram avaliados pelo serviço de atendimento do Centro de Estudos do Genoma Humano, na Universidade de São Paulo, cujos médicos procederam à retirada de um pouco de tecido, sob condições assépticas.

Esses pacientes foram classificados através do estudo de proteínas no músculo e da análise de DNA, confirmando uma miopatia (VAINZOF *et al.*, 1996) e o seu material foi selecionado para a utilização neste projeto.

Na tentativa de se comparar o mecanismo de glicosilação do músculo de camundongos e humanos, selecionaram-se as biópsias musculares de 10 indivíduos normais e de 10 pacientes diagnosticados como portadores de diferentes Distrofias Musculares (TABELA 5) contidas no banco de biópsias do Centro de Estudos do Genoma Humano, pacientes esses com miopatias equivalentes às distrofias encontradas nos modelos murinos utilizados nesse trabalho (TABELA 4).

TABELA 4: Correlação entre o tipo de distrofia e os modelos murinos correspondentes selecionados para esse estudo.

Linhagem de camundongos	Indivíduos normais e pacientes com distrofias
<i>C57black6</i>	Controle normal humano (CN)
<i>Dmd^{mdx}</i>	Distrofia Muscular de Duchenne (DMD)
<i>Large^{myd}</i>	Distrofia Muscular de Cinturas 2I (LGMD 2I)
<i>Lama2^{dy2J/J}</i>	Distrofia Muscular Congênita 1A (CMD 1A)
<i>SJL/J</i>	Distrofia Muscular de Cinturas 2B (LGMD 2B)

TABELA 5: Número das biópsias de indivíduos normais e portadores de miopatias presentes no banco de biópsias do Centro de Estudos do Genoma Humano selecionadas para esse estudo. (CN: Controles Normais, DMD: Distrofia Muscular de Duchenne, LGMD 2I: Distrofia Muscular de Cinturas 2I – mutações no gene *FKRP*, CMD 1A: Distrofia Muscular Congênita 1A – mutações no gene da α 2-laminina, LGMD 2B: Distrofia Muscular de Cinturas 2B – mutações no gene da disferlina).

CN	DMD	LGMD 2I	CMD 1A	LGMD 2B
B 1311	B 1161	B 621	B 193	B 922
B 1313	B 1195	B 745	B 266	B 944
B 1361	B 1348	B 752	B 479	B 1125
B1362	B1358	B 861	B 502	B 1129
B 1363	B 1421	B 964	B 622	B 1130
B 1364	B 1422	B 965	B 983	B 1297
B 1365	B 1423	B 996	B 1173	B 1305
B 1366	B 1427		B 1199	B 1322
B 1379	B 1441			B 1393
B 1386	B 1449			B 1402

A escolha dessas biópsias foi realizada devido à disponibilidade de material necessário para todas as análises que foram realizadas nesse projeto (presença de lâminas já cortadas ou material suficiente para a preparação das mesmas e de blocos para a extração de RNA e de extrato de proteínas).

3.3 Estudo histopatológico e detecção das proteínas de interesse

3.3.1 Coloração de Hematoxilina-Eosina (HE)

A coloração pela hematoxilina e pela eosina, corantes universais, permite analisar a morfologia das fibras musculares e dos tecidos adjacentes, podendo-se observar a presença de regeneração/degeneração, presença e distribuição de tecido conjuntivo e adiposo endomisial e perimisial, infiltrado inflamatório, entre outros aspectos. Os núcleos das fibras adquirem uma coloração azulada, as fibras musculares são róseas e o tecido conjuntivo é

corado de rosa claro. Retira-se com o material cortado do freezer -70°C e secam-nas por aproximadamente 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, cora-se com hematoxilina por 10 minutos e lava-se em água corrente por 10 minutos. Por fim, cora-se com eosina por 3 minutos e lava-se até sair todo o corante. Procede-se a fixação em ácido acético, desidrata-se e montam-se as lâminas com Bálsamo do Canadá.

3.3.2 Western blotting

A metodologia descrita a seguir foi realizada no trabalho de ZUBRZYCKA-GAARN *et al.* (1988): O macerado de tecido muscular foi homogeneizado e preparados os extratos de proteínas, através do seu contato com tampão de solubilização fervente. As alíquotas foram misturadas na proporção 1:1 ao tampão de amostra e submetidas à fervura. Para a determinação das bandas das proteínas em estudo, o experimento foi realizado, aplicando-se um volume de extrato de proteínas totais em gel de poliacrilamida. A corrida foi realizada sob voltagem de 100V, por 2 a 3 horas. Após a eletroforese, o gel é eletro-transferido para uma membrana de nitrocelulose, sob corrente 350-450 mA, durante 1 hora a temperatura de 4°C . A membrana foi seca, lavada, e submetida à reação com anticorpos primários, seguindo as diluições sugeridas pelos fabricantes. Os anticorpos secundários utilizados são ligados à fosfatase alcalina e a reação foi revelada com NBT e BCIP, evidenciando uma banda de coloração roxa. Uma amostra de peso molecular padrão é incluída em cada blot para construção de curva de peso molecular.

A identificação das proteínas foi feita através dos anticorpos primários:

- **ANTI-POMT1 AB-83558 (ABCAM):** Anticorpo policlonal produzido em coelho.
- **ANTI-POMGnT1 AB-57589 (ABCAM):** Anticorpo monoclonal produzido em camundongo.
- **ANTI-FKRP (C-16): sc-48503 (SANTA CRUZ):** Anticorpo policlonal produzido em cabra.
- **ANTI-LARGE (Y-14): sc-33435 (SANTA CRUZ):** Anticorpo policlonal produzido em cabra.

As bandas obtidas pela reação com os anticorpos em questão, foram quantificadas com relação à banda de miosina no programa ImageJ e comparados quanto à sua

significância estatística com o auxílio do programa Minitab. O teste realizado foi o não-paramétrico de *Mann-Whitney*.

3.3.3 Real-Time PCR (Q-PCR)

Foram selecionados para este estudo os seguintes genes:

- Via de glicosilação: *POMT1*, *POMGnT1*, *LARGE* e *FKRP*.
- Gene endógeno: *GAPDH* – gene endógeno, cuja expressão não varia nos diferentes tecidos e diferentes idades, necessário para a normalização dos dados obtidos.

O RNA total foi extraído dos músculos coletados, a partir de material macerado com pistola em banho de nitrogênio líquido e estocado também em nitrogênio líquido. A extração de RNA do material pulverizado foi realizada com o reagente Trizol® (INVITROGEN), conforme as especificações do fabricante. O RNA foi diluído em água tratada com dietilpirocarbonato 0,01% (DEPC) (livre de ribonucleases) e guardado em freezer -70°C . Para a síntese de DNA complementar (cDNA), o RNA foi quantificado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm, e 1 μg de RNA total foi utilizado para a síntese de cDNA. Após a sua quantificação, sintetizou-se o cDNA total (com *Random Primer* e oligo dT), utilizando-se o protocolo da enzima MMLV (INVITROGEN), seguindo-se então para o protocolo de Q-PCR conforme descrito em GOSSELIN (2004) (GOSSELIN *et al.*, 2004). As amostras de cDNA foram aplicadas em triplicata em placa de 96 poços. A cada amostra foi adicionado o par de *primers* do gene de interesse (TABELAS 6 e 7) e o *MasterMix* contendo *SYBER Green* (Applied Biosystems), num volume total de 25 μL .

TABELA 6: Pares de *primers* de genes de camundongos da via de glicosilação da proteína α -distroglicana e do controle endógeno.

Gene	Seqüência Forward	Seqüência Reverse
<i>Pomt1</i>	5'— GGACACCAACATCGCCTATTGG — 3'	5'— TGTAGACCACTGTGGCAAGGC — 3'
<i>Pomgnt1</i>	5'— CTGGAAGAGGACCTGGACATTGC — 3'	5'— CCAGGCAGAGATGCAGTACAGG — 3'
<i>Large</i>	5'— CACCTGTACTTCCTGCACTACGA — 3'	5'— CAGATGGCCTCCAGCATCTG — 3'
<i>Fkrp</i>	5'— AGTGAGAACAAACCACCTGCACG — 3'	5'— TGCTCTGGGAACCAACATCCTG — 3'
<i>Gapdh</i>	5'— AGGTCGGTGTGAACGGATTTG — 3'	5'— TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA — 3'

TABELA 7: Pares de *primers* de genes de humanos da via de glicosilação da proteína α -distroglicana e do controle endógeno.

Gene	Seqüência <i>Forward</i>	Seqüência <i>Reverse</i>
<i>POMT1</i>	5'— ATGTCCATGACCTCCCTCAGG — 3'	5'— CCATCAGGAAGAACGGGAGGTAG — 3'
<i>POMGnT1</i>	5'— AGCTCAGCAGAAGAGGCAGAG T — 3'	5'— AGCTGCATACACTTCCATAGCC — 3'
<i>LARGE</i>	5'— CCTGTCGTGAGCCAGAGAGT — 3'	5'— AGCATCCTCTCAGAAGTGGCA — 3'
<i>FKRP</i>	5'— GTGGACCTGGGCATCTACTTGG — 3'	5'— GCCTCTCCCATACGAAGCC — 3'
<i>GAPDH</i>	5'— CAGGGCTGCTTTTAACTCTGGTA — 3'	5'— GGGTGGAATCATATTGGAACATG — 3'

Cada placa foi corrida no termociclador para *Real-Time 7500* da *Applied Biosystems* segundo o seguinte programa (TABELA 8):

TABELA 8: Programa seguido pelo equipamento de *Real time PCR*.

Perfil de Ciclagem Térmica			
Etapa	Repetições	Temperatura	Tempo
1	1	50.0 °C	2 minutos
2	1	95.0 °C	10 minutos
3	40	95.0 °C	15 segundos
		60.0 °C	1 minuto

Para cada amostra, foi plotado um gráfico de amplificação mostrando o aumento da fluorescência do *SYBER Green* em cada ciclo da PCR. Ao término de cada PCR, foi realizada a análise da curva de dissociação dos fragmentos amplificados. A reação de amplificação será específica quando a curva de dissociação apresentar um único pico, mostrando que os produtos amplicados apresentaram o mesmo tamanho e, portanto, desnaturou na mesma temperatura, de acordo com a queda brusca de fluorescência do *Sybr Green* observada nessa curva (*Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR, Applied Biosystems, 2004*).

Antes da quantificação relativa, é necessário que seja feita uma curva-padrão para cada gene estudado, onde será calculada a eficiência daquela reação. Esta curva-padrão determina o limiar (*threshold*), valor arbitrário de sinal de fluorescência para que seja possível a determinação do Ct (ciclo onde é medida a fluorescência em cada reação). O

limiar deve estar acima da linha basal de fluorescência e suficientemente baixo para estar na região de crescimento exponencial da região de amplificação de uma curva de amplificação por PCR. O limiar é a linha cuja intersecção com a curva de amplificação define o Ct para cada reação.

Para a análise relativa, o valor de Ct para uma curva de amplificação específica depende de dois fatores: número de cópias inicial do template e eficiência da amplificação pelo sistema de PCR. O programa calcula o ΔCt , que é a diferença entre a média das triplicatas do Ct de um gene alvo e a média das triplicatas do Ct do gene endógeno:

$$\Delta Ct = Ct (target) - Ct (endogenous control)$$

Em seguida, o programa calcula o $\Delta\Delta Ct$, que é a diferença entre a média dos ΔCt de uma amostra alvo com a média dos ΔCt de uma amostra chamada de calibrador, que será a unidade de expressão:

$$\Delta\Delta Ct (test sample) = Avg\Delta Ct(test sample) - Avg\Delta Ct(calibrator sample).$$

E este valor é utilizado para calcular o valor da expressão:

$$Expression\ fold\ value = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

O valor final corresponde ao nível de expressão para cada gene relativo ao nível de expressão na amostra calibradora. O *software* do equipamento mostra os resultados das quantificações relativas numa escala logarítmica onde cada incremento corresponde a uma diferença de 10 vezes na expressão gênica. Os valores obtidos foram comparados quanto à sua significância estatística com o auxílio do programa Minitab. O teste realizado foi o não-paramétrico de *Mann-Whitney*.

4. RESULTADOS

4.1 Estudo de expressão gênica

4.1.1 Experimentos com camundongos

4.1.1.1 Elaboração da curva-padrão nas amostras de músculo de camundongos

Para os experimentos de *Real-Time PCR* sintetizou-se um par de *primers* específico para a PCR em cDNA de quatro genes de camundongo: *Pomt1*, *Pomgnt1*, *Large* e *Fkrp* com o uso dos programas *Primer 3* e *IDT Oligo Analyzer*, com o objetivo de se estudar a expressão desses genes atuando na via de glicosilação da proteína α -DG. As características dos *primers* foram listados na TABELA 6.

Todos os pares de *primers* passaram por uma padronização prévia para a confirmação de sua especificidade e determinação da concentração ideal a ser utilizada no equipamento de Q-PCR.

Na figura abaixo (FIGURA 3) se pode observar as curvas de amplificação do cDNA controle, em que, o primeiro ponto da curva corresponde ao cDNA puro (1ng RNA), o segundo ponto corresponde à diluição na ordem de 1:2 do ponto anterior (0,5ng RNA), e assim, sucessivamente, até completarem-se seis diluições (0,25ng; 0,125ng; 0,0625ng e 0,03125ng), assim como a curva-padrão para *Gapdh* e para os genes de glicosilação.

FIGURA 3: Curvas de amplificação de quantificação absoluta de *Real time PCR* do cDNA de camundongo normal para os genes de glicosilação e *Gapdh*, e suas respectivas curvas-padrão. No eixo X temos o número de ciclos e no eixo Y temos a fluorescência emitida na amplificação.

Ficou estabelecido a concentração ideal de 1:3 para o uso dos cDNAs nas placas de quantificação relativa de *Real time* PCR.

O gene *Gapdh* foi utilizado como controle endógeno e os valores ótimos de *threshold* obtidos foram utilizados nas quantificações seguintes (TABELA 9).

TABELA 9: Valores de *threshold* padronizados para as quantificações em *Real time* PCR. *Slope*: inclinação da curva de amplificação e respectivo R2.

	<i>Threshold</i>	<i>Slope</i>	R2
<i>Gapdh</i>	0.1188279	-3.140	0.998823
<i>Pomt1</i>	0.09595878	-3.333	0.986352
<i>Pomgnt1</i>	0.0605005	-3.345	0.996546
<i>Fkrp</i>	0.09851114	-3.375	0.921648
<i>Large</i>	0.04601151	-3.327	0.985300

Em seguida, iniciaram-se os estudos de expressão relativa das amostras de músculo gastrocnêmio de camundongos recém-nascidos, de 3 meses e 6 meses de idade, sendo eles: controles normais *C57Black6* e distróficos *DMD^{mdx}*, *Large^{myd}*, *Lama^{dy2J/J}* e *SJL/J*. As amostras e sua identificação estão listadas na TABELA 3.

4.1.1.2 Comparação da expressão dos genes de glicosilação através dos valores de ΔC_t nos camundongos

4.1.1.2.1 Controles normais de diferentes idades

Para se verificar como os genes de glicosilação se comportam nos controles normais, avaliaram-se os valores de ΔC_t obtidos na análise das patas traseiras (recém-nascidos) e do músculo gastrocnêmio (3 meses e 6 meses) dos camundongos *C57 Black6*, cujos resultados estão apresentados nas FIGURAS 4, 5 e 6. Como o valor de ΔC_t representa o número de ciclos de PCR, espera-se que, quanto maior o seu valor, menor a expressão do gene em estudo.

FIGURA 4: Comparação da expressão dos genes de glicosilação na pata traseira dos camundongos *C57Black6* recém-nascidos.

FIGURA 5: Comparação da expressão dos genes de glicosilação no músculo gastrocnêmio de camundongos *C57Black6* de 3 meses.

FIGURA 6: Comparação da expressão dos genes de glicosilação no músculo gastrocnêmio dos camundongos *C57black6* de 6 meses.

Também se realizou a análise da expressão gênica para cada gene (FIGURAS 7, 8 e 9) e a comparação entre eles (FIGURA 10), utilizando a média dos valores de ΔCt de todas as amostras de controles normais.

FIGURA 7: Comparação da média dos ΔCt dos genes de glicosilação na pata traseira dos camundongos *C57Black6* recém-nascidos.

FIGURA 8: Comparação da média dos ΔCt dos genes de glicosilação no músculo gastrocnêmio dos camundongos *C57Black6* de 3 meses.

FIGURA 9: Comparação da média dos ΔCt dos genes de glicosilação no músculo gastrocnêmio dos camundongos *C57black6* de 6 meses.

FIGURA 10: Comparação da média dos ΔCt dos genes de glicosilação na pata traseira e no músculo gastrocnêmio dos camundongos *C57black6* recém-nascidos, de 3 meses e de 6 meses.

Os resultados apresentados nas FIGURAS 7, 8, 9 e 10 mostram a variação nos níveis de amplificação observada nos camundongos *C57black6*, o que representa a variabilidade normal da população nessas idades. No músculo dos animais normais recém-nascidos, de 3 meses e de 6 meses observa-se a mesma variação no nível de expressão dos genes codificantes das enzimas relacionadas com o processo de glicosilação, com uma grande expressão de *Pomgnt1*, seguido da expressão de *Large*, *Fkrp* e *Pomt1*, com exceção dos animais de 6 meses, em que o nível de *Fkrp* encontra-se um pouco mais elevado que o de *Pomt1*. Também se verificou que a expressão de quase todos os genes de glicosilação encontra-se um pouco elevada nos animais normais recém-nascidos e que, nos músculos dos camundongos adultos, *Pomt1*, *Pomgnt1* e *Large* encontram-se ligeiramente aumentados nos animais de 6 meses, o mesmo não ocorrendo para *Fkrp*.

Portanto, de uma forma geral, pode-se inferir que, independentemente da idade, os valores de expressão dos genes de glicosilação apresentam-se da seguinte maneira: *Pomgnt1* > *Large* > *Fkrp* > *Pomt1*. Além disso, realizando-se a análise da expressão desses genes com a idade, nos animais normais, verificou-se que a expressão de *Pomt1* encontra-se equivalente em todas as idades, enquanto a expressão dos outros genes é menor nos animais em idade adulta.

4.1.1.2.2 Camundongos distróficos de diferentes idades

Realizaram-se as mesmas análises das médias dos valores de ΔCt com todos os camundongos distróficos de todas as idades na tentativa de se verificar como os genes de glicosilação se comportam nesses animais (FIGURAS 11 e 12).

FIGURA 11: Comparação por linhagem da média dos ΔCt dos genes de glicosilação na pata traseira e no músculo gastrocnêmio dos camundongos distróficos recém-nascidos, de 3 meses e de 6 meses.

FIGURA 12: Comparação por gene da média dos Δ Ct dos genes de glicosilação na pata traseira e no músculo gastrocnêmio dos camundongos distróficos recém-nascidos, de 3 meses e de 6 meses.

Esses dados corroboraram com os resultados apresentados pela análise somente das amostras de camundongos normais, em que o valor da expressão do gene *Pomgnt1* apresentou-se maior, seguido de *Large*, *Fkrp* e *Pomt1*.

4.1.1.3 Avaliação da expressão relativa dos genes de glicosilação no músculo gastrocnêmio de camundongos normais e distróficos nas diferentes idades

Os valores de expressão obtidos para as amostras dos músculos gastrocnêmio dos camundongos distróficos são calculados em função de um único controle normalizador para cada idade. Escolhemos como controle normalizador para cada grupo de camundongos os seguintes animais: *C57Black* 26 (recém-nascidos), *C57black* 23 (3 meses) e *C57black* 4 (6 meses), pois estes possuem um valor de expressão médio da maioria dos genes de glicosilação no grupo controle. Esses dados brutos foram organizados em tabelas apresentados no ANEXO 1 (TABELA 10, 11 e 13) e comparados ao grupo controle com auxílio do teste de *Mann-Whitney* (TABELA 14, 15 e 16).

TABELA 14: Valores de p obtidos com o teste de *Mann-Whitney* aplicado às amostras de pata traseira (PT) de diferentes animais distróficos recém-nascidos. As células coloridas representam $p < 0.05$.

	<i>Pomt1</i>	<i>Pomgnt1</i>	<i>Large</i>	<i>Fkrp</i>
<i>C57Black6 X Dmd^{mdx}</i>	0.0007	0.2364	0.0128	0.0080
<i>C57Black6 X Large^{myd}</i>	0.6588	0.0934	0.2164	0.0027
<i>C57Black6 X Lama2^{dy2j}/J</i>	0.0062	0.0305	0.0128	0.4379
<i>C57Black6 X SJL/J</i>	0.0027	0.0217	0.0273	0.0637

TABELA 15: Valores de p obtidos com o teste de *Mann-Whitney* aplicado às amostras de músculo gastrocnêmio (G) de diferentes animais distróficos de 3 meses. As células coloridas representam $p < 0.05$.

	<i>Pomt1</i>	<i>Pomgnt1</i>	<i>Large</i>	<i>Fkrp</i>
<i>C57Black6 X Dmd^{mdx}</i>	0.1405	0.1212	0.0058	0.9097
<i>C57Black6 X Large^{myd}</i>	0.6776	0.9698	0.0004	0.7913
<i>C57Black6 X Lama2^{dy2j}/J</i>	0.0035	0.7513	0.1300	0.0317
<i>C57Black6 X SJL/J</i>	0.0539	0.0028	0.5205	0.0452

FIGURA 14: Valores de expressão de *Pomgnt1* obtidos com Q-PCR para as amostras de pata traseira (PT) de todos os animais recém-nascidos.

FIGURA 15: Valores de expressão de *Large* obtidos com Q-PCR para as amostras de pata traseira (PT) de todos os animais recém-nascidos.

FIGURA 16: Valores de expressão de *Fkrp* obtidos com Q-PCR para as amostras de pata traseira (PT) de todos os animais recém-nascidos.

Camundongos de 3 meses

POMT1

FIGURA 17: Valores de expressão de *Pomt1* obtidos com Q-PCR para as amostras de músculo gastrocnêmio de todos os animais de 3 meses.

POMGnT1

FIGURA 18: Valores de expressão de *Pomgnt1* obtidos com Q-PCR para as amostras de músculo gastrocnêmio de todos os animais de 3 meses.

FIGURA 19: Valores de expressão de *Large* obtidos com Q-PCR para as amostras de músculo gastrocnêmio de todos os animais de 3 meses.

FIGURA 20: Valores de expressão de *Fkrp* obtidos com Q-PCR para as amostras de músculo gastrocnêmio de todos os animais de 3 meses.

Camundongos de 6 meses

FIGURA 21: Valores de expressão de *Pomt1* obtidos com Q-PCR para as amostras de gastrocnêmio de todos os animais de 6 meses.

FIGURA 22: Valores de expressão de *Pomgnt1* obtidos com Q-PCR para as amostras de gastrocnêmio de todos os animais de 6 meses.

FIGURA 23: Valores de expressão de *Large* obtidos com Q-PCR para as amostras de gastrocnêmio de todos os animais de 6 meses.

FIGURA 24: Valores de expressão de *Fkrp* obtidos com Q-PCR para as amostras de gastrocnêmio de todos os animais de 6 meses.

Em seguida, reuniram-se todos esses dados na FIGURA 25 para uma melhor visualização. A figura mostra então a análise da expressão gênica para cada gene individualmente separados pela linhagem dos camundongos, realizada na pata traseira dos camundongos recém-nascidos (RN), e do músculo gastocnêmio dos camundongos de 3 meses (3m) e de 6 meses (6m), evidenciando os valores que apresentaram diferença significativa quando comparados com seus controles normais.

Observou-se uma grande variação no perfil de expressão gênica dos genes da via de glicosilação em todas as idades. Entretanto, notou-se que as diferenças de expressão foram mais significantes em animais recém-nascidos, havendo principalmente uma expressão aumentada das enzimas de glicosilação nos camundongos *Dmd^{mdx}* e *Large^{myd}* e uma queda na expressão em *Lama2^{dy2J/J}* e *SJL/J*. Já nos animais adultos, o perfil de expressão foi mais parecido com o perfil dos camundongos controles normais da mesma idade, havendo um aumento na expressão de *Pomtl* e *Fkrp* em *Lama2^{dy2J/J}* e *Pomgnt1* em *SJL/L*. O fato que chamou mais a atenção foi de que o gene *Large* aparece com a expressão diminuída em quase todos os animais em estudo, com exceção do *DMD^{mdx}* recém-nascido.

FIGURA 25: Perfil de expressão gênica na pata traseira dos camundongos recém-nascidos (RN), e do músculo gastocnêmio dos camundongos de 3 meses (3m) e de 6 meses (6m), analisados para os genes da via de glicosilação. Os (*) representam os valores de $p < 0.05$.

4.1.1.4 Comparação da expressão dos genes de glicosilação em 2 músculos diferentemente afetados: gastrocnêmio e diafragma – análise realizada nos animais controles normais de 3 meses

Para se verificar como os genes de glicosilação se comportam em diferentes músculos, avaliaram-se os valores de ΔCt obtidos na análise de diafragma em camundongos normais de 3 meses (FIGURA 26).

FIGURA 26: Comparação da expressão dos genes de glicosilação no músculo diafragma de camundongos *C57Black6* de 3 meses.

Para a análise de expressão relativa, utilizou-se o mesmo controle normalizador escolhido anteriormente para o músculo gastrocnêmio (*C57black* 23). Esses dados estão presentes na TABELA 12 no ANEXO 1, e foram comparados ao grupo controle com auxílio do teste de *Mann-Whitney* (TABELA 17).

Também se realizou a análise da expressão gênica para cada gene individualmente (FIGURAS 27, 28, 29 e 30) e a média de cada gene, comparando-se esse resultado com os dados já apresentados para o músculo gastrocnêmio de camundongos de 3 meses (FIGURA 31) e com grau de afecção dos diferentes músculos, nas diferentes linhagens, através da coloração de Hematoxilina-Eosina (FIGURA 32).

TABELA 17: Valores de p obtidos com o teste de *Mann-Whitney* aplicado às amostras de músculo diafragma (D) de diferentes animais distróficos de 3 meses. As células coloridas representam $p < 0.05$.

	<i>Pomt1</i>	<i>Pomgnt1</i>	<i>Large</i>	<i>Fkrp</i>
<i>C57Black6</i> X <i>Dmd^{mdx}</i>	0.6800	0.6800	0.0157	0.6800
<i>C57Black6</i> X <i>Large^{myd}</i>	0.6892	0.1824	0.0077	0.7897
<i>C57Black6</i> X <i>Lama2^{dy2l}/J</i>	0.4437	0.7683	0.0875	0.2159
<i>C57Black6</i> X <i>SJL/J</i>	0.4437	0.3768	0.9062	0.5169

FIGURA 27: Valores de expressão de *Pomt1* obtidos com Q-PCR para as amostras de músculo diafragma de todos os animais de 3 meses.

FIGURA 28: Valores de expressão de *Pomgnt1* obtidos com Q-PCR para as amostras de músculo diafragma de todos os animais de 3 meses.

LARGE

FIGURA 29: Valores de expressão de *Large* obtidos com Q-PCR para as amostras de músculo diafragma de todos os animais de 3 meses.

FKRP

FIGURA 30: Valores de expressão de *Fkrp* obtidos com Q-PCR para as amostras de músculo diafragma de todos os animais de 3 meses.

FIGURA 31: Média de expressão gênica no músculo diafragma dos camundongos de 3 meses analisados para os genes da via de glicosilação e a sua comparação com a expressão do músculo gastrocnêmio dos animais de mesma idade. Os (*) representam os valores de $p < 0.05$.

FIGURA 32: Coloração de Hematoxilina-Eosina mostrando cortes transversais de musculatura esquelética, visualizando-se a diferença entre o grau de afecção dos músculos gastrocnêmio e diafragma de camundongos *C57Black6* de 3 meses.

Pode-se, também, verificar que os mesmos genes encontram-se com um valor diferenciado na sua expressão a depender do músculo analisado, como se constatou nos resultados apresentados na comparação dos músculos gastrocnêmio e diafragma dos camundongos *C57Black6* de 3 meses (FIGURA 33). Também se calculou a sua significância com o auxílio do teste de *Mann-Whitney* (TABELA 18).

FIGURA 33: Comparação da média dos ΔCt dos genes de glicosilação nos músculos gastrocnêmio e diafragma dos camundongos *C57Black6* de 3 meses.

TABELA 18: Valores de p obtidos com o teste de *Mann-Whitney* aplicado às amostras de músculo gastrocnêmio e diafragma de camundongos *C57Black6* de 3 meses. Não houve valores de $p < 0.05$.

	<i>Pomt1</i>	<i>Pomgnt1</i>	<i>Large</i>	<i>Fkrp</i>
<i>C57Black6 G X C57Black6 D</i>	0,9349	1,000	0,4624	0,4624

Esses resultados demonstram que a expressão de *Pomt1* e *Pomgnt1* encontra-se ligeiramente diminuída no diafragma desses animais quando comparado com o músculo gastrocnêmio, enquanto *Fkrp* e *Large* aparecem com o valor da expressão um pouco aumentado. Entretanto, os níveis de expressão crescendo de forma equivalente, independentemente do músculo estudado, com $Pomgnt1 > Large > Fkrp > Pomt1$.

4.1.2 Experimentos em músculo normal e distrófico humano

4.1.2.1 Elaboração da curva-padrão nas amostras de músculo normal e distrófico humano

Como realizado anteriormente para as amostras de camundongos, sintetizou-se um par de *primers* específico para a PCR em cDNA de quatro genes humanos: *POMT1*, *POMGnT1*, *LARGE* e *FKRP* com o uso dos programas *Primer 3* e *IDT Oligo Analyzer*, com o objetivo de se estudar a expressão desses genes atuando na via de glicosilação da proteína α -DG. As características dos *primers* foram listadas na TABELA 7.

Todos os pares de *primers* passaram por uma padronização prévia para a confirmação de sua especificidade e determinação da concentração ideal a ser utilizada no equipamento de Q-PCR.

Na figura abaixo (FIGURA 34) pode-se observar as curvas de amplificação do cDNA controle, em que, o primeiro ponto da curva corresponde ao cDNA puro (1ng RNA), o segundo ponto corresponde à diluição na ordem de 1:2 do ponto anterior (0,5ng RNA), e assim, sucessivamente, até completarem-se seis diluições (0,25ng; 0,125ng; 0,0625ng e 0,03125ng), assim como a curva-padrão para *GAPDH* e para os genes de glicosilação.

FIGURA 34: Curvas de amplificação de quantificação absoluta de *Real time PCR* do cDNA de músculo humano controle normal para os genes de glicosilação e *GAPDH*, e suas respectivas curvas-padrão. No eixo X temos o número de ciclos e no eixo Y temos a fluorescência emitida na amplificação.

O gene *GAPDH* foi utilizado como controle endógeno e os valores ótimos de *threshold* obtidos foram utilizados nas quantificações seguintes (TABELA 19).

TABELA 19: Valores de *threshold* padronizados para as quantificações em *Real time* PCR dos genes humanos. *Slope*: inclinação da curva de amplificação e respectivo R2.

	<i>Threshold</i>	<i>Slope</i>	R2
GAPDH	0.1521985	-3.25438	0.99334
POMT1	0.06821442	-3.343834	0.988227
POMGnT1	0.1521985	-3.283454	0.995681
FKRP	0.162827	-3.478826	0.998842
LARGE	0.2468926	-3.008093	0.962114

Em seguida, iniciaram-se os estudos de expressão relativa das amostras de músculo selecionadas para esse estudo, sendo elas: Indivíduos normais e de pacientes com distrofias (listados na TABELA 5).

4.1.2.2 Comparação da expressão dos genes de glicosilação através dos valores de ΔCt nos controles normais humanos

Verificou-se como os genes de glicosilação se comportam nos controles normais, avaliando os valores de ΔCt obtidos na análise de músculo de controles normais humanos (FIGURA 35).

FIGURA 35: Comparação da expressão dos genes de glicosilação no músculo dos controles normais humanos.

Realizou-se, também, a análise da expressão gênica para cada gene, utilizando a média dos valores de ΔCt de todas as amostras de controles normais (FIGURA 36).

FIGURA 36: Comparação da média dos ΔCt dos genes de glicosilação no músculo dos controles normais humanos.

Esses resultados mostram a variação nos níveis de amplificação observada nos humanos, o que representa a variabilidade normal da população. Nesse caso, pode-se observar uma maior expressão de *POMT1*, seguidas da expressão de *POMGnT1*, *FKRP* e *LARGE*.

4.1.2.3 Avaliação da expressão dos genes de glicosilação nos músculos humanos distróficos

Os valores de expressão obtidos para as amostras dos músculos de pacientes distróficos são calculados em função de um único controle normalizador para cada grupo. Escolheu-se para tal o indivíduo cuja biópsia tem a numeração B- 1311, pois esse possui um valor de expressão médio da maioria dos genes de glicosilação. Esses dados foram organizados no ANEXO 2 (TABELA 20) e comparados ao grupo controle com auxílio do teste de *Mann-Whitney* (TABELA 21).

TABELA 21: Valores de p obtidos com o teste de *Mann-Whitney* aplicado às amostras de músculo de indivíduos normais e pacientes com distrofias. As células coloridas representam $p < 0.05$.

	<i>POMT1</i>	<i>POMGnT1</i>	<i>LARGE</i>	<i>FKRP</i>
Normal X DMD	0.0005	0.0003	0.0027	0.0004
Normal X LGMD 2I	0.1791	0.1304	0.0113	0.6605
Normal X CMD 1A	0.0004	0.0561	0.7363	0.0012
Normal X LGMD 2B	0.3075	0.7913	0.0305	0.2730

Realizou-se a análise da expressão gênica para cada gene individualmente e a média de cada gene para todos os pacientes (FIGURAS 37, 38, 39, 40 e 41), onde as amostras marcadas em amarelo, expressaram uma quantidade muito pequena de RNAm que o *threshold* não cortou a curva de amplificação.

FIGURA 37: Valores de expressão de *POMT1* obtidos com Q-PCR para as amostras de músculo de indivíduos controles normais e pacientes distróficos.

FIGURA 38: Valores de expressão de *POMGnT1* obtidos com Q-PCR para as amostras de músculo de indivíduos controles normais e pacientes distróficos.

FIGURA 39: Valores de expressão de *LARGE* obtidos com Q-PCR para as amostras de músculo de indivíduos controles normais e pacientes distróficos.

FIGURA 40: Valores de expressão de *FKRP* obtidos com Q-PCR para as amostras de músculo de indivíduos controles normais e pacientes distróficos.

FIGURA 41: Média de expressão gênica no músculo de pacientes analisados para os genes da via de glicosilação. Os (*) representam os valores de $p < 0.05$.

Observou-se uma grande variação no perfil de expressão gênica dos genes da via de glicosilação nos grupos de pacientes com distrofias. Entretanto, notou-se que os pacientes com DMD apresentaram um aumento da expressão de todas as enzimas, comparando-se aos resultados apresentados pelos camundongos *DMD^{mdx}* recém-nascidos (FIGURA 25).

Em seguida, fez-se a análise da expressão gênica para cada gene individualmente, utilizando a média dos valores de expressão nos indivíduos controles normais e pacientes distróficos, para uma melhor visualização (FIGURA 42).

FIGURA 42: Perfil de expressão gênica no músculo dos indivíduos controles normais e pacientes distróficos analisados para os genes da via de glicosilação. Os (*) representam os valores de $p < 0.05$.

Nesses gráficos, o que chamou a atenção foi que, os pacientes com LGMD 2I, cujo defeito primário é a falta da enzima FKRP, não apresentaram redução significativa da expressão desse gene. Também foi observado que, o grupo de pacientes CMD 1A, com deficiência da $\alpha 2$ -laminina, apresentou redução na expressão de *POMT1*, *FKRP* e *POMGnT1* sendo estatisticamente significativa para as duas primeiras.

4.2 Estudo de proteínas por *Western Blotting*

4.2.1 Experimentos com camundongos

Para se tentar identificar a presença das proteínas que participam da via de glicosilação do músculo e, ao mesmo tempo tentar correlacionar a quantidade da proteína com os valores de expressão apresentados anteriormente, fez-se o estudo por *Western blotting* dos extratos dos músculos de todos os camundongos utilizados neste trabalho, e reagiu-se com os anticorpos Anti-POMT1, Anti-POMGnT1, Anti-FKRP e Anti-LARGE.

4.2.1.1 Reação com o anticorpo Anti-POMT1 e Anti-POMGnT1

Na reação com os anticorpos Anti-POMT1 e Anti-POMGnT1, observou-se marcação correspondente ao tamanho das bandas esperadas (31 kDa e 35 kDa) (FIGURAS 43 e 44), mas não se verificou nenhuma variação significativa na intensidade das bandas (valores no ANEXO 3, TABELAS 22, 23 e 24), quando comparada com a banda de miosina, independente da linhagem murina ou da idade analisada (FIGURA 45; TABELAS 25, 26 e 27). Curiosamente, na reação com o anticorpo Anti-POMT1, evidenciou-se, além da banda de 31 kDa, o aparecimento de outra banda de aproximadamente 200 kDa de maneira bem forte nos animais recém-nascidos, desaparecendo conforme os animais iam envelhecendo (FIGURA 43).

FIGURA 43: *Western Blotting* para a tentativa de detecção das proteínas da via de glicosilação, em pata-traseira e músculos gastrocnêmio dos camundongos utilizados neste trabalho. A figura mostra a presença de uma banda correspondente ao tamanho da banda esperada de 31 kDa e outra de aproximadamente 200 kDa somente na amostra de camundongos recém-nascidos Colunas: (PM) Peso molecular de 29 kDa e de 200 kDa; (FEM) Amostra de músculo normal humano; e demais amostras de músculo murino de várias linhagens e idades. Todas as amostras foram reagidas com o anticorpo Anti-POMT1. Gel de acrilamida 12%.

FIGURA 44: *Western Blotting* para a tentativa de detecção das proteínas da via de glicosilação, em pata-traseira e músculos gastrocnêmio dos camundongos utilizados neste trabalho. Colunas: (PM) Peso molecular de 29 kDa; (FEM) Amostra de músculo normal humano; e demais amostras de músculo murino de varias linhagens e idades. Todas as amostras foram reagidas com o anticorpo Anti-POMGnT1 (35 kDa). Gel de acrilamida 12%.

FIGURA 45: Gráficos mostrando os valores de quantificação das bandas relativas às proteínas POMT1 e POMGnT1 em comparação com a banda de miosina apresentadas pelos experimentos de *Western Blotting* em amostras de músculo de camundongos normais e distróficos. Não se verificou nenhuma variação significativa na intensidade das bandas, independente da linhagem murina ou da idade analisada.

TABELA 25: Valores de p obtidos com o teste de *Mann-Whitney* aplicado às amostras de pata traseira (PT) de diferentes animais distróficos recém-nascidos. Não houve valores de $p < 0.05$.

	POMT1	POMGnT1
<i>C57Black6 X Dmd^{mdx}</i>	0,6625	0,6625
<i>C57Black6 X Large^{myd}</i>	0,0809	0,6625
<i>C57Black6 X Lama2^{dy2J}/J</i>	1,0000	0,6625
<i>C57Black6 X SJL/J</i>	0,1904	0,3827

TABELA 26: Valores de p obtidos com o teste de *Mann-Whitney* aplicado às amostras de músculo gastrocnêmio (G) de diferentes animais distróficos de 3 meses. Não houve valores de $p < 0.05$.

	POMT1	POMGnT1
<i>C57Black6 X Dmd^{mdx}</i>	0,8597	0,3768
<i>C57Black6 X Large^{myd}</i>	0,3768	0,3768
<i>C57Black6 X Lama2^{dy2J}/J</i>	0,3768	0,2159
<i>C57Black6 X SJL/J</i>	0,2159	0,2159

TABELA 27: Valores de p obtidos com o teste de *Mann-Whitney* aplicado às amostras de músculo gastrocnêmio (G) de diferentes animais distróficos de 6 meses. Não houve valores de $p < 0.05$.

	POMT1	POMGnT1
<i>C57Black6 X Dmd^{mdx}</i>	0,1116	0,5959
<i>C57Black6 X Large^{myd}</i>	0,2159	0,0518
<i>C57Black6 X Lama2^{dy2J}/J</i>	0,0518	0,2159
<i>C57Black6 X SJL/J</i>	0,1116	0,5959

Esses resultados sugerem que todos os camundongos utilizados nesse trabalho apresentam as mesmas quantidades dessas proteínas no músculo. Entretanto, nem todos os dados relativos ao estudo de proteínas foram concordantes ao estudo da expressão realizado anteriormente. Nos camundongos *Dmd^{mdx}* recém-nascidos, a quantidade de *POMT1* foi maior que a de *POMGnT1* por expressão, apresentando dados contrários quando realizado o estudo de proteínas. Já para os animais de 3 meses, essa contradição ocorreu para as linhagens de camundongos *Large^{myd}* e *Lama2^{dy2J}/J* e, nos animais de 6 meses, para *Lama2^{dy2J}/J* e *SJL/J*.

4.2.1.2 Reação com o anticorpo Anti-LARGE

Já na reação com o anticorpo Anti-LARGE, também se observou a presença de bandas marcadas difusamente próximas à região da banda de tamanho esperado (88kDa), nos levando a crer que esse anticorpo não reconheceu de forma adequada o epítipo da proteína estudada (FIGURA 46).

FIGURA 46: *Western Blotting* para a tentativa de detecção das proteínas da via de glicosilação, em pata-traseira e músculos gastrocnêmio dos camundongos utilizados neste trabalho. Colunas: (PM) Peso molecular de 97kDa; (FEM) Amostra de músculo normal humano; e demais amostras de músculo murino de varias linhagens e idades. Todas as amostras foram reagidas com o anticorpo Anti-LARGE (88 kDa). Gel de acrilamida 12%.

4.2.1.3 Reação com o anticorpo Anti-FKRP

Como ocorreu com o anticorpo Anti-LARGE, a reação com o anticorpo Anti-FKRP também apresentou resultados duvidosos. Apesar de não haver presença de marcação compatível com banda de tamanho esperado (60kDa), observou-se o aparecimento de outra banda de aproximadamente 100 kDa somente nos animais recém-nascidos, não sendo visualizada nos animais adultos, como exemplificado na FIGURA 47.

FIGURA 47: *Western Blotting* mostrando a presença de uma banda de aproximadamente 100kDa somente na amostra de camundongos recém-nascidos, exemplificado nessa figura pelos camundongos *SJL/J*. Colunas: (PM) Peso molecular de 97kDa; (FEM) Amostra de músculo normal humano; e demais amostras de músculo murino de camundongos *SJL/J* recém-nascidos, de 3 meses e de 6 meses. Todas as amostras foram reagidas com o anticorpo Anti-FKRP. Gel de acrilamida 12%.

4.2.2 Experimentos com amostras humanas

Como realizado nos camundongos, fez-se o estudo por *Western blotting* dos extratos dos músculos de todas as amostras humanas utilizadas neste trabalho, e reagiu-se com os anticorpos Anti-POMT1, Anti-POMGnT1, Anti-FKRP e Anti-LARGE (FIGURA 48). Somente houve reação com aparecimento de banda com os anticorpos Anti-POMT1 e Anti-POMGnT1, como nos resultados para os camundongos. Entretanto, também não se

observou resultado significativo na quantificação dessas amostras (valores na TABELA 28 no ANEXO 4; FIGURA 49; TABELA 29).

FIGURA 48: *Western Blotting* para a tentativa de detecção das proteínas da via de glicosilação, em músculo de controles normais e pacientes com distrofias utilizados neste trabalho. Colunas: (PM) Peso molecular de 29 e 97kDa; e demais amostras de músculo controles normais e pacientes com distrofias. Todas as amostras foram reagidas com o anticorpo Anti-POMT1 (31 kDa), Anti-POMGnT1 (35 kDa), Anti-LARGE (88 kDa) e Anti-FKRP (60 kDa). Gel de acrilamida 12%.

FIGURA 49: Gráfico mostrando os valores de quantificação das bandas relativas às proteínas POMT1 e POMGnT1 em comparação com a banda de miosina apresentadas pelos experimentos de *Western Blotting* em amostras de músculo normal e de pacientes distróficos. Não se verificou nenhuma variação significativa na intensidade das bandas, independente do músculo analisado.

TABELA 29: Valores de p obtidos com o teste de *Mann-Whitney* aplicado às amostras de músculo de indivíduos normais e pacientes com distrofias. Não houve valores de $p < 0.05$.

	POMT1	POMGnT1
Normal X DMD	0,0809	0,0809
Normal X LGMD 2I	0,0809	0,1904
Normal X CMD 1A	1,0000	0,1489
Normal X LGMD 2B	0,6625	0,0809

Para todas as amostras de músculo de pacientes distróficos, os resultados verificados no estudo de proteínas foram contrários aos apresentados no estudo de expressão de *POMT1* e *POMGnT1*.

5. DISCUSSÃO

As distroglicanopatias são um grupo de distrofias musculares caracterizadas por defeitos na glicosilação da proteína α -distroglicana (α -DG), um componente do Complexo Distrofina-Glicoproteínas associadas (DGC). Estas formas de distrofias foram denominadas dessa maneira, pois todos os pacientes apresentam alterações musculares secundárias decorrentes da alteração na glicosilação desta proteína. Já se sabe que o mecanismo de glicosilação é realizado por enzimas denominadas glicosiltransferases. Apesar de não existir uma correlação direta entre a mutação genética e o fenótipo determinado, foi demonstrado que as diferentes glicosiltransferases atuam em uma única via comum (BLAKE *et al.*, 2002). Desta forma, a gravidade da doença parece estar relacionada com o impacto que a mutação provoca na proteína α -DG, levando a uma diminuição da massa molecular desta proteína, evidenciando uma alteração do mecanismo de glicosilação.

Até o presente momento, seis genes foram identificados como codificantes de proteínas com papel confirmado ou que supostamente participariam do mecanismo de glicosilação da proteína α -DG. Essas enzimas que sabidamente participariam da transferência de estruturas glicanas para a α -DG são: as enzimas *O-Mannosyltransferase* I e II (POMT1 e POMT2) e a enzima *O-mannose β 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase* (POMGnT1) (BELTRÁN-VALERO de BERNABÉ *et al.*, 2002). No entanto, as glicosiltransferases FKTN, FKRTP e LARGE não possuem sua função e localização determinada, embora mutações nestes genes estejam associadas a uma diminuição na massa molecular de α -DG, indicando a associação destas possíveis glicosiltransferases aos defeitos de glicosilação.

O papel da glicosilação da α -DG tem sido investigado na tentativa de se descobrir novas estratégias terapêuticas. A superexpressão de glicosiltransferases abre novas possibilidades no estudo de doenças neuromusculares, possibilitando o auxílio em futuras terapias, além de promover uma maior compreensão dos mecanismos patológicos envolvidos nas distroglicanopatias. Portanto, alterações no processo de glicosilação da proteína α -distroglicana constituem um novo mecanismo patogênico nas doenças neuromusculares, abrindo novas possibilidades de estudo. Neste sentido, uma melhor caracterização das proteínas envolvidas neste processo, bem como a elucidação da interação destas com outras proteínas do complexo se apresenta de extrema relevância para a compreensão das diferentes formas de distrofias.

- ***Expressão dos genes codificantes das glicosiltransferases em músculos de camundongos normais***

Como não se conhece o padrão de expressão normal dos genes de glicosilação da α -DG, primeiramente, comparou-se a expressão desses genes nos músculos dos camundongos controles normais em diferentes idades, com a finalidade de se saber como se apresenta a variabilidade normal da população nessas idades. Utilizou-se para tal, os valores de ΔC_t , para poder visualizar e comparar a expressão de *Pomt1*, *Pomgnt1*, *Fkrp* e *Large*, sendo que, quanto maior o seu valor, menor a expressão do gene em estudo.

No músculo dos animais normais recém-nascidos, de 3 meses e de 6 meses observou-se a mesma variação no nível de expressão dos genes codificantes das enzimas relacionadas com o processo de glicosilação. De uma forma geral, esses valores apresentaram-se da seguinte maneira: *Pomgnt1* > *Large* > *Fkrp* > *Pomt1*, independentemente da idade. Além disso, verificou-se que a expressão de *Pomt1* encontra-se equivalente em todas as idades, sugerindo que essa enzima é essencial em todas as etapas de desenvolvimento, mesmo apresentando-se com valores de expressão baixa. Por outro lado, a expressão dos outros genes é menor nos animais em idade adulta, se revelando então mais necessários nos animais em que o músculo ainda se encontra em formação do que em animais com o tecido muscular já estabelecido.

A enzima POMT1 é responsável por catalisar a primeira etapa de adição de açúcares da cascata de glicosilação (MANYA *et al.*, 2004). Quando se estuda a regulação da distribuição de mRNA de *POMT1* em *zebrafish* durante a embriogênese através da interferência na sua expressão pela injeção de oligonucleotídeos morfolidos, verificou-se, através de imunohistoquímica utilizando anticorpos contra a região glicosilada da α -distroglicana, que a reatividade a IHH6 foi perdida (AVSAR-BAN *et al.*, 2010). Desta forma, prova-se que a incorporação dessa proteína é essencial para o processo de glicosilação da α -DG, tornando-se necessário pelo menos um nível de expressão basal para que o processo todo ocorra, resultado que corrobora com os encontrados nesse trabalho. Esse mesmo grupo verificou também, através da análise de expressão gênica, que *zPOMT1* foi expresso em padrões semelhantes durante o desenvolvimento embrionário e em todos os tecidos adultos. Além disso, no mesmo trabalho os autores verificaram que a expressão de

POMT1 estava aumentada principalmente nos tecidos mais afetados dos peixes mutados, mas o músculo apresentava baixos níveis na sua expressão.

Outro fator que chama atenção é o fato dessa proteína ser necessária para o desenvolvimento normal uma vez que a ausência de *POMT1* em camundongos resulta em letalidade embrionária (WILLER *et al.*, 2004). Os valores elevados da expressão de *POMT1* no tubo neural, dermomiótomos e olhos em desenvolvimento durante a embriogênese em camundongos enfatiza sua importância nestes tecidos, que são justamente os mais afetados em pacientes com WWS. WWS é a distroglicanopatia mais letal, em que os pacientes geralmente falecem na infância com poucos sobrevivendo até os 3 anos de idade, reforçando a necessidade de uma expressão basal desse gene.

Por outro lado, *POMGnT1* é a enzima responsável pela primeira etapa da elongação (ENDO & TODA, 2003; MANYA *et al.*, 2003) o que a torna uma enzima muito importante uma vez que já foi mostrado que mutações no gene que a codifica faz com que não ocorra a extensão de todas as estruturas O-manose-ligadas (ENDO, 1999; STALNAKER *et al.*, 2010). Isso poderia ser uma possível explicação para o fato de termos encontrado uma alta expressão na musculatura dos camundongos normais, uma vez que ela é essencial para a elongação da cadeia de açúcares ligados à proteína α -DG e, sem ela, esse processo não seria possível.

Existem diversos trabalhos que mostram o papel dessas enzimas durante o desenvolvimento muscular. Também já se sabe que os processos de diferenciação e proliferação influenciam na expressão das glicosiltransferases. Para tentar elucidar o papel das glicosiltransferases durante a diferenciação muscular, BROCKINGTON *et al.* (2009) investigaram as modificações na sua expressão em cultura de mioblastos murinos e humanos e de miotubos fundidos. Os resultados mostraram que, durante a diferenciação celular, os níveis de expressão de *POMT1*, *POMGnT1*, *Fukutina* e *FKRP* permaneciam constantes. De forma contrária, BROWN *et al.* (2004) documentaram um aumento progressivo da glicosilação durante o desenvolvimento muscular fetal humano, relacionando esse processo ao grande número de fibras em regeneração. Mas visualizaram isso através do estudo da proteína α -distroglicana e não apresentaram dados relacionando esses resultados com as glicosiltransferases envolvidas nesse processo.

BROCKINGTON *et al.* (2009) também verificaram que a expressão de *LARGE* aumentava drasticamente com o processo de diferenciação muscular. Esses resultados

evidenciam o provável papel de *LARGE* na glicosilação da proteína, mas sugerem que, ela funciona numa via distinta da conhecida. Concordando com isso, outro trabalho recente mostra que a perda da expressão de *LARGE* não teve nenhum efeito observável sobre as estruturas O-manose caracterizadas (STALNAKER *et al.*, 2010), sugerindo que o valor em sua expressão é independente do processo de glicosilação como um todo.

Quanto aos valores de expressão encontrados para a enzima FKR_P, um trabalho recente mostra que a sua expressão diminuía substancialmente com o tempo entre 5 e 15 semanas, em camundongos normais. Tudo indicou que o gene *FKRP* exerce uma regulação complexa durante o desenvolvimento e a idade (CHAN *et al.*, 2010).

- ***Expressão dos genes codificantes das glicosiltransferases em músculos de camundongos distróficos***

Quando realizado o mesmo estudo de expressão em animais distróficos, a ordem dos valores de expressão desses genes foi a mesma, quando comparados com o grupo controle, o que nos levou a concluir que a expressão das enzimas de glicosilação foi mantida ao longo do tempo, e independente da linhagem de camundongos, sejam eles normais ou distróficos, reforçando a extrema necessidade dessas proteínas em todas as etapas de desenvolvimento e em todas as linhagens de camundongos, sejam eles normais ou distróficos. Além disso, diferentemente do que ocorre com as proteínas estruturais, que, quando o processo de degeneração/regeneração está ativo, elas são mais requeridas e, consequentemente, mais produzidas, notou-se que o nível de expressão dessas enzimas não é influenciado por esse processo, uma vez que se esperava que nos animais com músculos mais afetados e degenerados (*DMD^{mdx}* e *Lama^{dy2J}/J*) apresentassem maior expressão quando comparados com os camundongos distróficos mais benignos (*SJL/J*) e com os camundongos normais.

De posse desses resultados, passamos então a avaliação da expressão relativa das enzimas de glicosilação no músculo de camundongos normais e distróficos nas diferentes idades e escolhemos um único controle normalizador para cada idade, normalizador esse que possuía um valor de expressão médio da maioria dos genes de glicosilação no grupo controle. Nessa análise, observou-se uma grande variação no perfil de expressão gênica em todas as idades, notando-se diferenças de expressão mais significantes em animais recém-

nascidos, havendo principalmente uma expressão aumentada das enzimas de glicosilação nos camundongos *Dmd^{mdx}* e *Large^{myd}* e uma queda na expressão em *Lama2^{dy2J/J}* e *SJL/J*. Já nos animais adultos, o perfil de expressão foi mais parecido com o perfil dos camundongos controles normais da mesma idade, havendo um aumento na expressão de *Pomt1* e *Fkrp* em *Lama2^{dy2J/J}* e *Pomgnt1* em *SJL/L*. O fato que chamou mais a atenção foi de que o gene *Large* parece com a expressão diminuída em quase todos os animais em estudo, com exceção do *DMD^{mdx}* recém-nascido.

O estudo comparativo dos genes de glicosilação em dois músculos esqueléticos diferentes mostrou um padrão de expressão muito similar nos dois: gastrocnêmio e diafragma. A expressão de *Pomt1* e *Pomgnt1* encontrou-se ligeiramente diminuída no diafragma dos camundongos controles normais quando comparado com o músculo gastrocnêmio, enquanto *Fkrp* e *Large* aparecem com o valor da expressão aumentado. Entretanto, os níveis de expressão permaneceram equivalentes, independentemente do músculo estudado. Esses resultados mostraram novamente que a expressão das enzimas de glicosilação não está relacionada com o grau de degeneração do músculo, uma vez que se esperava que no diafragma, por ser mais degenerado, os valores de expressão estivessem aumentados. Uma possível justificativa foi descrito em um trabalho que mostrou que todo músculo em regeneração apresentou deficiência de α -distroglicana (TAKEDA *et al.*, 2003). Da mesma forma, COHN *et al.* (2002) verificaram que em camundongos *DMD^{mdx}* adultos o processo de regeneração leva a repopulação por miofibras com a expressão alterada de distroglicana e que a expressão de distroglicana em células satélite é essencial para a capacidade regenerativa em músculo. Devido a isso, o músculo em pleno processo de regeneração, a quantidade dessas enzimas estaria diminuída, uma vez que, pela falta de distroglicana, as glicosiltransferases não teriam onde se ancorar e por isso, deixaria de haver o estímulo para serem produzidas.

- ***Expressão dos genes codificantes das glicosiltransferases em músculo normal e distrófico humano***

A análise da expressão dos genes de glicosilação foi também realizada em grupos de pacientes com distrofias de diversas causas genéticas. Inicialmente, verificamos como os genes de glicosilação se comportam nos controles normais humanos, avaliando os valores

de ΔCt obtidos na análise desses músculos. Nesse caso, pode-se observar valores de expressão diferentes dos apresentados pelas amostras de camundongos, com uma maior expressão de *POMT1*, seguidas da expressão de *POMGnT1*, *FKRP* e *LARGE*. Esses resultados mostram que a regulação gênica, pelo menos para os genes de glicosilação, é diferente entre camundongos e humanos.

Pela análise relativa, observou-se uma grande variação no perfil de expressão gênica dos genes da via de glicosilação nos grupos de pacientes com distrofias. Entretanto, notou-se que os pacientes com DMD apresentaram um aumento da expressão de todas as enzimas. Interessantemente, o padrão observado foi muito similar ao observado no grupo de camundongos *DMD^{mdx}* recém-nascidos. Esse fato sugere que, de alguma forma, a falta de distrofina, em camundongos *DMD^{mdx}* recém-nascidos e em pacientes com DMD, provoca um aumento na expressão das enzimas de glicosilação. O modelo *DMD^{mdx}* sabidamente apresenta um padrão intenso de sua regeneração muscular, diferentemente do apresentado pelas outras linhagens murinas (VAINZOF *et al.*, 2008). Pelo menos para esse tipo de mutação, e nos estágios iniciais da doença, sugere-se que, o processo de regeneração influencia a expressão dessas enzimas. COHN *et al.* (2002) concluíram que a distroglicana era reexpressa durante a regeneração provocada pelo processo distrófico e que células satélite ativadas ou outros precursores miogênicos poderiam iniciar a expressão de distroglicana durante esse processo. Por consequência, as enzimas que glicosilam essa proteína estariam aumentadas nesses casos.

Curiosamente, também se observou que, os pacientes com LGMD 2I, cujo defeito primário é a falta da enzima *FKRP*, não apresentaram redução significativa da expressão deste gene. Isso mostra que ocorre o estímulo para a produção da enzima, mas que, de alguma forma e em algum momento, essa proteína é perdida. Além disso, já se sabe que a severidade e o fenótipo da doença podem ser influenciados pelos níveis de expressão gênica (LEWANDOSKI, 2001). No entanto, ACKROYD *et al.* (2009) verificaram que os níveis de *FKRP* podem estar diretamente associados com a gravidade do fenótipo, mas que, as mutações isoladas, não interferiram no padrão de expressão deste gene, provocando fenótipos mais brandos.

Da mesma maneira, GODFRET *et al.* (2007) também sugerem que o fenótipo dos pacientes com deficiência de glicosilação depende não tanto do gene específico primariamente afetado mas sim da severidade da mutação específica e de seu efeito na

estrutura e função do produto gênico. De fato, o grupo de pacientes DMC 1A, com deficiência da α 2-laminina, não apresentam defeito de glicosilação da α -DG, apresentaram redução na expressão de *POMT1*, *FKRP* e *POMG1*, sugerindo que, a deficiência dessas enzimas possivelmente não altera este processo.

- ***Estudo de proteína em músculo normal e distrófico de camundongos e humanos***

De uma forma geral, não se observou uma correlação direta entre os resultados da expressão gênica das glicosiltransferases com os resultados apresentados pela análise de proteínas. O estudo de proteínas identificou bandas de intensidade similar em todos os grupos estudados, quando comparados a controles normais. Esses dados levam a crer mais uma vez que, por serem enzimas, essas proteínas funcionam de forma diferenciada quando comparadas a proteínas estruturais.

Entretanto, nos chamou a atenção o aparecimento de bandas de peso molecular maior do que as esperadas nas reações com os anticorpos Anti-POMT1 e Anti-FKRP somente em camundongos recém-nascidos. Estas bandas foram valorizadas e podem sugerir que essas enzimas estão ligadas a outras proteínas ou entre si nos estágios iniciais de desenvolvimento muscular.

Na literatura muitos trabalhos relacionam a participação de FKRP no desenvolvimento das células musculares. MATSUMOTO *et al.* (2004) e TORELLI *et al.* (2005) analisaram a presença de FKRP em extratos proteicos, utilizando linhagens de células C2C12, e demonstraram que FKRP foi identificada somente em células C2C12 diferenciadas em miotubos. Por outro lado, MARTINS-MACHADO (2010) em sua Tese, realizou em nosso laboratório experimentos de *Western blotting* utilizando células-tronco mesenquimais e células da linhagem muscular C2C12, e demonstrou que FKRP foi identificada somente nas linhagens musculares, tanto em células C2C12 indiferenciadas, como nas diferenciadas em miotubos. Entretanto, foi identificada uma banda de 100 kDa, como no nosso trabalho. Estes resultados sugerem, portanto, que a expressão de FKRP é específica em células musculares, desde os estágios iniciais de determinação muscular, indicando uma forte relação de alguma isoforma de maior peso molecular com o desenvolvimento muscular.

Esse mesmo trabalho também demonstrou que proteína FKRP apresenta baixos níveis endógenos no músculo adulto. Esses resultados corroboraram com os encontrados por KERAMARIS-VRANTSIS *et al.* (2007), que também verificaram baixos níveis de FKRP endógena, por *Western blotting*, em extratos de músculo humano e de camundongo. Esse fato possivelmente explica a impossibilidade de se visualizar banda no tamanho esperado nos extratos de proteínas musculares, uma vez que essa quantidade de proteína no músculo é inferior à densidade exigida para o devido funcionamento dos anticorpos disponíveis comercialmente.

6. CONCLUSÕES

1. Expressão dos genes codificantes das glicosiltransferases em músculos de camundongos normais

- A ordem do nível de expressão dos genes codificantes das glicosiltransferases foi: *Pomgnt1* > *Large* > *Fkrp* > *Pomt1*. Esta ordem foi observada em praticamente todas as idades estudadas, sugerindo um mecanismo constante de regulação gênica, independente do crescimento ou envelhecimento.

2. Expressão relativa dos genes codificantes das glicosiltransferases em músculos de camundongos distróficos

- A ordem do nível de expressão dos genes codificantes das enzimas de glicosilação foi a mesma observada nos controles normais: *Pomgnt1* > *Large* > *Fkrp* > *Pomt1*, e também foi mantida ao longo do tempo, independentemente da linhagem. Isto reforça a extrema necessidade dessas proteínas em todas as etapas de desenvolvimento e em todas as linhagens de camundongos, sejam eles normais ou distróficos.
- A expressão dos genes que codificam as glicosiltransferases não é influenciada pelo processo de degeneração/regeneração, uma vez que não houve concordância no padrão de expressão nos animais com músculos mais afetados e degenerados (*Large^{myx}* e *Lama^{dy2J/J}*) nem nos camundongos com músculos menos degenerados (*Dmd^{mdx}* e *SJL/J*).
- Há grande variação no perfil de expressão relativa desses genes, com um aumento significativo em animais *Dmd^{mdx}* e *Large^{myd}* recém-nascidos e uma queda em *Lama2^{dy2J/J}* e *SJL/J*. Nos animais adultos, verificou-se maior semelhança ao perfil dos camundongos controles normais da mesma idade, havendo um aumento na expressão de *Pomt1* e *Fkrp* em *Lama2^{dy2J/J}* e *Pomgnt1* em *SJL/J*. O gene *Large* parece com a expressão diminuída em quase todos os animais em estudo, com exceção do *DMD^{mdx}* recém-nascido.
- O músculo diafragma (mais degenerado em *Dmd^{mdx}*) e gastrocnêmio (menos degenerado em *Dmd^{mdx}*) apresentam um padrão de expressão muito similar, reforçando a falta de correlação da expressão desses genes com o tipo ou grau de degeneração do músculo.

3. Expressão dos genes codificantes das glicosiltransferases em distrofias humanas

- A regulação gênica das glicosiltransferases é diferente entre camundongos e humanos, uma vez que, em amostras de músculo humano, observou-se a ordem do nível de expressão de *POMT1* > *POMGnT1* > *FKRP* > *LARGE*.
- Os pacientes com DMD apresentaram um aumento da expressão de todos os genes estudados, com um padrão muito similar ao observado no grupo de camundongos *DMD^{mdx}* recém-nascidos. Esse fato sugere que, de alguma forma, a falta de distrofina promove um aumento na sua expressão.
- Os pacientes LGMD 2I, cujo defeito primário é a falta da enzima FKRP, não apresentaram redução significativa da expressão deste gene. Isso mostra que o processo de transcrição é normal, mas a tradução ou a função/atividade da enzima deve estar comprometida.
- Nos pacientes DMC 1A, onde a deficiência primária da α 2-laminina não está associada a defeito de glicosilação da α -DG, observou-se redução na expressão de *POMT1* e *FKRP*, sugerindo que, a deficiência dessas enzimas possivelmente não altera este processo.

4. Estudo de proteínas em músculo normal e distrófico de camundongos e humanos

- Não se observou uma correlação direta entre os resultados da expressão gênica das glicosiltransferases com os resultados apresentados pela análise de proteínas, sugerindo mais uma vez que, por serem enzimas, essas proteínas funcionam de forma diferenciada quando comparadas a proteínas estruturais.
- Nas reações com os anticorpos Anti-POMT1 e Anti-FKRP, os camundongos recém-nascidos apresentaram bandas adicionais de peso molecular maior, sugerindo que essas enzimas estão ligadas a outras proteínas ou entre si nos estágios iniciais de desenvolvimento muscular.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKROYD, M. R., SKORDIS, L., KALUARACHCHI, M., GODWIN, J., PRIOR, S., FIDANBOYLU, M., PIERCY, R. J., MUNTONI, F., BROWN, S. C. (2009). Reduced expression of fukutin related protein in mice results in a model for fukutin related protein associated muscular dystrophies. **Brain.**, **132 (Pt 2)**: 439-451.
- ALLAMAND, V. E., CAMPBELL, K. P. (2000). Animal models for muscular dystrophy: Valuable tools for the development of therapies. **Human Molecular Genetics (9)**, **16**: 2459-2467.
- AVSAR-BAN, E., ISHIKAWA, H., MANYA, H., WATANABE, M., AKIYAMA, S., MIYAKE, H., ENDO, T., TAMARU, Y. (2010). Protein O-mannosylation is necessary for normal embryonic development in zebrafish. **Glycobiology**, **20 (9)**: 1089–1102.
- BARRESI, R., MICHELE, D. E., KANAGAWA, M., HARPER, H. A., DOVICO, S. A., SATZ, J. S., MOORE, S. A., ZHANG, W., SCHACHTER, H., DUMANSKI, J. P., COHN, R. D., NISHINO, I., CAMPBELL, K. P. (2004). Large can functionally bypass alpha- dystroglycan glycosylation defects in distinct Congenital Muscular Dystrophies. **Nature Medicine**, **10**: 696-703.
- BELTRÁN-VALERO de BERNABÉ, D., CURRIER, S., STEINBRECHER, A., CELLI, J., BEUSEKOM, E., ZWAAG, B., KAYSERILI, H., MERLINI, L., CHITAYAT, D., DOBYNS, W. B., CORMAND, B., LEHESJOKI, A. E., CRUCES, J., VOIT, T., WALSH, C. A., BOKHOVEN, H., BRUNNER, H. G. (2002). Mutations in the O-Mannosyltransferase Gene POMT1 give rise to the severe neuronal migration disorder Walker-Warburg Syndrome. **American Journal of Human Genetics**, **71**: 1033-1043.
- BITTNER, R. E., ANDERSON, L. V., BURKHARDT, E., BASHIR, R., VAFIADAKI, E., IVANOVA, S., RAFFELSBERGER, T., MAERK, I., HOGER, H., JUNG, M., KARBASIYAN, M., STORCH, M., LASSMANN, H., MOSS, J. A., DAVISON, K., HARRISON, R., BUSHBY, K. M., REIS, A. (1999). Dysferlin Deletion In Sjl Mice (Sjl-Dysf) Defines A Natural Model For Limb Girdle Muscular Dystrophy 2b. **Nature Genetics**, **23**: 141-142.
- BLAKE, D. J., WEIR, A., NEWHEY, S. E., DAVIES, K. E. (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. **Physiol Rev.**, **82 (2)**: 291-329.

- BROCKINGTON, M., TORELLI, S., GODFREY, C., MUNTONI, F. (2009). Expression analysis of α -dystroglycan glycosyltransferases during myoblast-myotube differentiation. **Neuromuscular Disorders** **19**: 543–660.
- BROCKINGTON, M., YUVA, Y., PRANDINI, P., BROWN, S. C., TORELLI, S., BENSON, M. A., HERRMANN, R., ANDERSON, L. V., BASHIR, R., BURGUNDER, J. M., FALLET, S., ROMERO, N., FARDEAU, M., STRAUB, V., STOREY, G., POLLITT, C., RICHARD, I., SEWRY, C. A., BUSHBY, K., VOIT, T., BLAKE, D. J., MUNTONI, F. (2001). Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. **Human Molecular Genetics**, **10** (25): 2851-2859.
- BROWN, S. C., TORELLI, S., BROCKINGTON, M., YUVA, Y., JIMENEZ, C., FENG, L., ANDERSON, L., UGO, I., KROGER, S., BUSHBY, K., VOIT, T., SEWRY, C., MUNTONI, F. (2004). Abnormalities in α -dystroglycan expression in MDC1C and LGMD2I muscular dystrophies. **Am J Pathol**, **164** (2):727–37.
- BROWNING, C. A., GREWAL, P. K., MOORE, C. J., HEWITT, J. E. (2005). A rapid PCR method for genotyping the Large^{myd} mouse, a model of glycosylation-deficient congenital muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, **15**: 331-335.
- BULFIELD, G., SILLER, W. G., WIGHT, P. A., MOORE, K. J. (1984). X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **81**: 1189-1192.
- BUSHBY, K. M. D., BECKMANN, J. S. (1995). Diagnostic criteria for the limb-girdle muscular dystrophies: Report of the ENMC workshop on limb-girdle muscular dystrophies. **Neuromuscular Disorders**, **5**: 71-74.
- CAMPBELL, K. P. Molecular Studies of Muscular Dystrophy.
<http://www.physiology.uiowa.edu/campbell/Research/Areas/researchareas.htm>, 2006.
- CHAN, Y. M., BROWN, S., LU, Q. (2008). International workshop: glycosylation defects in muscular dystrophies--enhancing glycosylation to fight muscle diseases, 15-16 May, 2008, Charlotte, USA. **Neuromuscular Disorders**, **18** (12): 1002-1004.

- CHAN, Y. M., KERAMARIS-VRANTSIS, E., LIDOV, H. G., NORTON, J. H., ZINCHENKO, N., GRUBER, H. E., THRESHER, R., BLAKE, D. J., ASHAR, J., ROSENFELD, J., LU, Q. (2010). Fukutin-related protein is essential for mouse muscle, brain and eye development and mutation recapitulates the wide clinical spectrums of dystroglycanopathies. **Human Molecular Genetics**: 1-12.
- COHN, D. R. (2005). Dystroglycan: important player in skeletal muscle and beyond. **Neuromuscular Disorders**, **15**: 208-217.
- COHN, R. D., CAMPBELL, K. P. (2000). Molecular basis of muscular dystrophies. **Muscle Nerve**, **23 (10)**: 1456-1471.
- COHN, R. D., HENRY, M. D., MICHELE, D. E., BARRESI, R., SAITO, F., MOORE, S. A., FLANAGAN, J. D., SKWARCHUK, M. W., ROBBINS, M. E., MENDELL, J. R., WILLIAMSON, R. A., CAMPBELL, K. P. (2002). Disruption of DAG1 in differentiated skeletal muscle reveals a role for dystroglycan in muscle regeneration. **Cell**, **110 (5)**: 639-648
- DOLATSHAD, N. F., BROCKINGTON, M., TORELLI, S., SKORDIS, L., WEVER, U., WELLS, D. J., MUNTONI, F., BROWN, S. C. (2005). Mutated fukutin-related protein (FKRP) localises as wild type in differentiated muscle cells. **Exp Cell Res.**, **309 (2)**: 370-378.
- DUBOWITZ, V. Congenital Muscular dystrophies. In: Emery AEH (ed) Diagnostic Criteria for **Neuromuscular Disorders**. London: Royal Society of Medicine Press, pp23-26, 1997.
- DUBOWITZ, V. Muscle biopsy: A practical approach. 2nd ed. London: **Bailliere Tindall**, 1985.
- DUBOWITZ, V. Workshop report: 41st ENMC - International workshop on congenital muscular dystrophy. 8-10 march 1996, Naarden, the Netherlands. **Neuromuscular Disorders**, **6**: 295-306, 1996.
- DUBOWITZ, V. Workshop report: 68th ENMC - International workshop on congenital muscular dystrophy. 9-11 april 1999, Naarden, the Netherlands. **Neuromuscular Disorders**, **9**: 446-454, 1999.

- ENDO, T. (1999). O-mannosyl glycans in mammals. **Biochim. Biophys. Acta**, **1473**: 237–246.
- ENDO, T., TODA, T. (2003). Glycosylation in Congenital Muscular Dystrophies. **Biol. Pharm. Bull.**, **26**: 1641–1647.
- ERVASTI, J. M., CAMPBELL, K. P. (1993). A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. **Jornal Cellular Biology**, **122**: 809-823.
- GODFREY, C., CLEMENT, E., MEIN, R., BROCKINGTON, M., SMITH, J., TALIM, B., STRAUB, V., ROBB, S., QUINLIVAN, R., FENG, L., JIMENEZ-MALLEBRERA, C., MERCURI, E., MANZUR, A. Y., KINALI, M., TORELLI, S., BROWN, S. C., SEWRY, C. A., BUSHBY, K., TOPALOGU, H., NORTH, K., ABBS, S., MUNTONI, F. (2007). Refining genotype phenotype correlations in muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan. **Brain**, **130**: 2725–35.
- GOSSELIN, L. E., WILLIAMS, J. E., DEERING, M., BRAZEAU, D., KOURY, S., MARTINEZ, D. A. (2004). Localization and early time course of TGF-beta 1 mRNA expression in dystrophic muscle. **Muscle Nerve** **30** (5): 645-53.
- GREWAL, P. K., HEWITT, J. E. (2003). Glycosylation defects: A new mechanism for muscular dystrophy? **Human Molecular Genetics**, **12** (2): 259-264.
- GREWAL, P. K., HOLZFEIND, P. J., BITTNER, R. E., HEWITT, J. E. (2001) Mutant glycosyl-transferase and altered glycosylation of α -dystroglycan in the myodystrophy mouse. **Nature Genetics**, **28**: 151-154.
- GREWAL, P. K., MCLAUGHLAN, J. M., MOORE, C. J., BROWNING, C. A., HEWITT, J. E. (2005). Characterization of the LARGE family of putative glycosyltransferases associated with dystroglycanopathies. **Glycobiology**, **15** (10): 912-923.
- GUO, L. T., ZHANG, X. U., KUANG, W., XU, H., LIU, L. A., VILQUIN, J. T., MIYAGOE-SUZUKI, Y., TAKEDA, S., RUEGG, M. A., WEWER, U. M., ENGVALL, E. (2002). Laminin alpha 2 deficiency and muscular dystrophy: genotype-phenotype correlation in mutant mice. **Neuromuscular Disorders**, **13**: 207-215.

- HO, M., POST, C. M., DONAHUE, L. R., LIDOV, H. G. W., BRONSON, R. T., GOOLSBY, H., WATKINS, S. C., COX, G. A. E., BROWN, R. H. (2004). Disruption Of Muscle Membrane And Phenotype Divergence In Two Novel Mouse Models Of Dysferlin Deficiency. *Human Molecular Genetics*, 13 (18): 1999-2010.
- HOFFMAN, E. P. & DRESSMAN, D. (2001). Molecular pathophysiology and targeted therapeutics for muscular dystrophy. **Pharmacol. Sci.**, **22**: 465-470.
- HU, Y., LI, Z. F., WU, X., LU, Q. (2011). LARGE induces functional glycans in an O-mannosylation dependent manner and targets GlcNAc terminals on alpha-dystroglycan. **PLoS One.**, **6 (2)**: e16866.
- JACKSON LABORATORIES: <http://www.Jax.Org/>
- JIMENEZ-MALLEBRERA, C., TORELLI, S., FENG, L., KIM, J., GODFREY, C., CLEMENT, E., MEIN, R., ABBS, S., BROWN, S. C., CAMPBELL, K. P., KRÖGER, S., TALIM, B., TOPALOGLU, H., QUINLIVAN, R., ROPER, H., CHILDS, A. M., KINALI, M., SEWRY, C. A., MUNTONI, F. (2008). A Comparative Study of alpha-Dystroglycan Glycosylation in Dystroglycanopathies Suggests that the Hypoglycosylation of alpha-Dystroglycan Does Not Consistently Correlate with Clinical Severity . **Brain Pathol.**, ISSN **1015-6305**.
- KANAGAWA, M., NISHIMOTO, A., CHIYONOBU, T., TAKEDA, S., MIYAGOE-SUZUKI, Y., WANG, F., FUJIKAKE, N., TANIGUCHI, M., LU, Z., TACHIKAWA, M., NAGAI, Y., TASHIRO, F., MIYAZAKI, J., TAJIMA, Y., TAKEDA, S., ENDO, T., KOBAYASHI, K., CAMPBELL, K. P., TODA, T. (2009). Residual laminin-binding activity and enhanced dystroglycan glycosylation by LARGE in novel model mice to dystroglycanopathy. **Human Molecular Genetics**, **18 (4)**: 621-631.
- KAWAHARA, G., GUYON, J. R., NAKAMURA, Y., KUNKEL, L. M. (2010). Zebrafish models for human FKRP muscular dystrophies. **Human Molecular Genetics**, **19 (4)**: 623-633.

- KERAMARIS-VRANTSIS, E., LU, P. J., DORAN, T., ZILLMER, A., ASHAR, J., ESAPA, C. T., BENSON, M. A., BLAKE, D. J., ROSENFELD, J., LU, Q. L. (2007). Fukutin-related protein localizes to the Golgi apparatus and mutations lead to mislocalization in muscle in vivo. **Muscle Nerve**, **36** (4): 455-465.
- LEWANDOSKI, M. (2001). Conditional control of gene expression in the mouse. **Nat. Rev. Genet.**, **2**: 743-755.
- MANYA, H., CHIBA, A., YOSHIDA, A., WANG, X., CHIBA, Y., JIGAMI, Y., MARGOLIS, R. U., ENDO, T. (2004). Demonstration of mammalian protein O-mannosyltransferase activity: coexpression of POMT1 and POMT2 required for enzymatic activity. **Proc Natl Acad Sci USA.**, **101**: 500-505.
- MANYA, H., SAKAI, K., KOBAYASHI, K., TANIGUCHI, K., KAWAKITA, M., TODA, T., AND ENDO, T. (2003). Loss-of-function of an N-acetylglucosaminyltransferase, POMGnT1, in muscle-eye-brain disease. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **306**: 93-97.
- MARTIN, P. T. (2003). Dystroglycan glycosylation and its role in matrix binding in skeletal muscle. **Glycobiology**, **13** (8): 55R-66R.
- MARTIN, P. T., SHELTON, G. D., DICKINSON, P. J., STURGES, B. K., XU, R., LECOUTEUR, R. A., GUO, L. T., GRAHN, R. A., LO, H. P., NORTH, K. N., MALIK, R., ENGVALL, E., LYONS, L. A. (2008). Muscular dystrophy associated with alpha-dystroglycan deficiency in Sphynx and Devon Rex cats. **Neuromuscul Disorders.**, **18** (12): 942-952.
- MARTINS-MACHADO, P. C. M. (2010). Estudo da proteína FKRP *fukutin-related protein* em modelos murinos para doenças neuromusculares. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. **Doutorado**: 101.
- MATSUMOTO, H., NOGUCHI, S., SUGIE, K., OGAWA, M., MURAYAMA, K., HAYASHI, Y. K., NISHINO, I. (2004). Subcellular localization of fukutin and fukutin-related protein in muscle cells. **J. Biochem.**, **135** (6): 709-712.

- MATSUMOTO, H., MARUSE, H., INABA, Y., YOSHIZAWA, K., SASAZAKI, S., FUJIWARA, A., NISHIBORI, M., NAKAMURA, A., TAKEDA, S., ICHIHARA, N., KIKUCHI, T., MUKAI, F., MANNEN, H. (2008). The ubiquitin ligase gene (WWP1) is responsible for the chicken muscular dystrophy. **FEBS Letters**, **582** (15): 2212-2218.
- MEIER, H., SOUTHARD, J. L. (1970). Muscular dystrophy in the mouse caused by an allele at the dy-locus. **Life Sci.**, **9**: 137-144.
- MOORE, C. J., GOH, H. T., HEWITT, J. E. (2008). Genes required for functional glycosylation of dystroglycan are conserved in zebrafish. **Genomics**, **92** (3): 159-167.
- MOORE, C. J., HEWITT, J. E. (2009). Dystroglycan glycosylation and muscular dystrophy. **Glycoconj J.**, **26** (3): 349-357.
- MUNTONI, F., BROCKINGTON, M., BROWN, S. C. (2004a). Glycosylation eases muscular dystrophy. **Nature Medicine.**, **10** (7): 676-677.
- MUNTONI, F., BROCKINGTON, M., TORELLI, S., BROWN, S. C. (2004b). Defective glycosylation in Congenital Muscular Dystrophies. **Current Opinion in Neurology**, **17** (2): 205-209.
- MUNTONI, F., TORELLI, S., BROCKINGTON, M. (2008). Muscular dystrophies due to glycosylation defects. **Neurotherapeutics**, **5** (4): 627-632.
- MUNTONI, F., VOIT, T. (2004). The congenital muscular dystrophies in 2004: A century of exciting progress. **Neuromuscular Disorders**, **14** (10): 635-649.
- OHLENDIECK, K. & CAMPBELL, K. P. (1991). Dystrophin-associated proteins are greatly reduced in skeletal muscle from mdx mice. **Jornal Biological Chemistry**, **273**: 5419-5422.
- OZAWA, E., YOSHIDA, M., SUZUKI, A., MIZUNO, Y., HAGIWARA, Y., NOGUCHI, S. (1995). Dystrophin, dystrophin-associated protein and dystrophinopathy. **Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi**, **3**: 289-93.
- PASTORET, C., SEBILLE, A. (1995). Mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. **Jornal Neurological Science**, **129**: 97-105.

- REIMANN, J., IRINTCHEV, A., WERNIG, A. (2000). Regenerative capacity and the number of satellite cells in soleus muscles of normal and mdx mice. **Neuromuscular Disorders**, **10**: 276-282.
- STALNAKER, S. H., HASHMI, S., LIM, J., AOKI, K., PORTERFIELD, M., GUTIERREZ-SANCHEZ, G., WHEELER, J., ERVASTI, J. M., BERGMANN, C., TIEMEYER, M., WELLS, L. (2010). Site mapping and characterization of O-glycan structures on alpha-dystroglycan isolated from rabbit skeletal muscle. **Jornal Biological Chemistry**, **285** (32): 24882-24891.
- SUMADA, Y., BERNIER, S. M., UTANI, A. YAMADA, Y., CAMPBELL, K. P. (1995). Identification of a novel mutant transcript of laminin alpha 2 chain gene responsible for muscular dystrophy and dysmyelination in dy^{2J} mice. **Human Molecular Genetics**, **4**: 1055-1061.
- TAKEDA, S., KONDO, M., SASAKI, J., KURAHASHI, H., KANO, H., ARAI, K., MISAKI, K., FUKUI, T., KOBAYASHI, K., TACHIKAWA, M., IMAMURA, M., NAKAMURA, Y., SHIMIZU, T., MURAKAMI, T., SUNADA, Y., FUJIKADO, T., MATSUMURA, K., TERASHIMA, T., TODA, T. (2003). Fukutin is required for maintenance of muscle integrity, cortical histiogenesis and normal eye development. **Hum Mol Genet.**, **12** (12): 1449-1459.
- TORELLI, S., BROWN, S. C., BROCKINGTON, M., DOLATSHAD, N. F., JIMENEZ, C., SKORDIS, L., FENG, L. H., MERLINI, L., JONES, D. H., ROMERO, N., WEWER, U., VOIT, T., SEWRY, C. A., NOGUCHI, S., NISHINO, I., MUNTONI, F. (2005). Sub-cellular localisation of fukutin related protein in different cell lines and in the muscle of patients with MDC1C and LGMD2I. **Neuromuscul Disorders**, **15** (12):836-843.
- THORNHILL, P., BASSETT, D., LOCHMÜLLER, H., BUSHBY, K., STRAUB, V. (2008). Developmental defects in a zebrafish model for muscular dystrophies associated with the loss of fukutin-related protein (FKRP). **Brain**, **131** (Pt 6): 1551-1561.

- VAINZOF, M., AYUB-GUERRIERI, D., ONOFRE, P. C. G., MARTINS, P. C. M., LOPES, V. F., ZILBERSZTAJN, D., MAIA, L. S., SELL, K., YAMAMOTO, L. U. (2008). Animal models for genetic Neuromuscular Diseases. **Jornal Molecular Neuroscience.**, **34** (3): 241-248.
- VAINZOF, M., PASSOS-BUENO, M. R., MOREIRA, E. S., PAVANELLO, R. C. M., MARIE, S. K., ANDRESON, L. V. B., BONNEMANN, C. G., MCNALLY, E. M., NIGRO, V., KUNKEL, L. M., ZATZ, M. (1996). The sarcoglycan complex in the six autosomal recessive limb-girdle (AR-LGMD) muscular dystrophies. **Human Molecular Genetics**, **5**: 1963-1969.
- VAINZOF, M., ZATZ, M. (2003). Protein Defects in Neuromuscular Disease. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, **36**: 523-555.
- VILQUIN, J. T., GUERETTE, B., PUYMIRAT, J., YAFFE, D., TOME, F. M., FARDEAU, M., FISZMAN, M., SCHWARTZ, K., TREMBLAY, J. P. (1999). Myoblast transplantations lead to the expression of the laminin alpha 2 chain in normal and dystrophic (dy/dy) mouse muscles. **Gene Therapy**, **6** (5): 792- 800.
- WAIRKAR, Y. P., FRADKIN, L. G., NOORDERMEER, J. N., DIANTONIO, A. (2008). Synaptic defects in a Drosophila model of congenital muscular dystrophy. **Jornal Neuroscience**, **28** (14): 3781-3789.
- WILLER, T., PRADOS, B., FALCON-PERES, J. M., RENNER-MULLER, I., PRZEMECH, G. K., LOMMEL, M., COLOMA, A., VALERO, M. C., DE ANGELIS, M. H., TANNER, W., WOLF, E., STRAHL, S., CRUCES, J. (2004). Targeted disruption of the Walker–Warburg syndrome gene Pomt1 in mouse result in embryonic lethality. **Proc Natl Acad Sci USA.**, **101**: 14126–14131.
- XU, H., WU, X. R., WEWER, U. M., ENGVALL, E. (1994). Murine muscular dystrophy caused by a mutation in the laminin alpha 2 (Lama2) gene. **Nature Genetics**, **8**: 297-302.
- ZATZ, M. Distrofias Musculares Prograssivas. In: CARAKUSHANSKY, G., ed. Doenças genéticas em pediatria. Rio de Janeiro, Guanabara – Koogan, 2001. p. 245-260.
- ZHANG, Z., ZHANG, P., HU, H. (2011). LARGE expression augments the glycosylation of glycoproteins in addition to α -dystroglycan conferring laminin binding. **PLoS One.**, **20;6** (4): e19080.

ZUBRZYCKA-GAARN, E. E., BULMAN, D. E., KARPATI, G., BURGHESE, A. H., BELFALL, B., KLAMUT, H. J., TALBOT, J., HODGES, R. S., RAY, P. N., WORTON, R. G. (1988). The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. **Nature**, **333**: 466-469.

8. ANEXO 1

TABELA 10: Valores de expressão gênica, média e desvio padrão obtidos com Q-PCR da pata traseira (PT) de diferentes animais distróficos recém-nascidos.

<i>Dmd^{mdx}</i>		<i>Pomtl</i>	<i>Pomgntl</i>	<i>Large</i>	<i>Fkrp</i>
	MDX 42 PT	0.769967801	0.40688067	0.43917474	0.266466895
	MDX 43 PT	0.952889265	0.551449998	0.542451947	0.624694531
	MDX 44 PT	1.031408464	0.46834733	0.522313795	0.371067862
	MDX 45 PT	0.674493717	0.215108581	0.21005085	0.174059808
	MDX 46 PT	1.100887255	0.639785213	0.561816664	0.450557009
	MDX 47 PT	0.870754945	0.48029446	0.375846436	0.41713941
	MDX 49 PT	0.499961866	0.249198357	0.272537777	0.305781151
	MDX 50 PT	0.712144414	0.433929766	0.409933123	0.45909079
	MDX 51 PT	0.72607487	0.444044796	0.39252109	0.402089351
	MDX 52 PT	0.992155711	0.782615932	0.632356046	0.596487134
Média		0.833073831	0.46716551	0.435900247	0.406743394
D. padrão		0.188063114	0.167630543	0.132135815	0.138876552

<i>Large^{myd}</i>		<i>Pomtl</i>	<i>Pomgntl</i>	<i>Large</i>	<i>Fkrp</i>
	LG 80 PT	0.15896526	0.203304916	-0.548213564	0.209783015
	LG 99 PT	0.703635238	0.523746467	-0.415668776	0.380573003
	LG 100 PT	0.450557009	0.357934847	-0.525783736	0.358505911
	LG B102 PT	0.366422957	0.496098992	-0.045757491	0.633872263
	LG B104 PT	0.593950295	0.751048035	0.580468784	0.97053283
	LG B106 PT	0.229937686	0.3232521	0.176091259	0.586362223
	LG B107 PT	0.067442843	0.441695136	-0.35261703	0.550717423
	LG C14 PT	0.475380593	0.67669361	-0.08249449	0.634275695
	LG C15 PT	0.445292769	0.695394108	-0.017728767	0.735997884
Média		0.38795385	0.496574246	-0.136855979	0.562291139
D. padrão		0.205406726	0.185656892	0.367883381	0.225462356

		<i>PomtI</i>	<i>PomgntI</i>	<i>Large</i>	<i>Fkrp</i>
<i>Lama2^{62J}/J</i>	2J 7D PT	0.142702246	0.010723865	-0.397940009	0.25139485
	2J 9D PT	0.173477643	0.065206128	-0.454692884	0.240299582
	2J 13D PT	-0.184422252	0.111934276	-0.4225082	0.156549151
	2J 14D PT	-0.027334408	-0.078313525	-0.341988603	0.084933575
	2J 15D PT	-0.1123827	0.003891166	-0.35753548	0.085647288
	2J 16D PT	-0.075204004	0.138618434	-0.231361899	0.131939295
	2J 17D PT	0.086715664	0.171433901	-0.230622674	0.173477643
	2J 18D PT	0.095169351	0.166430114	-0.11577123	0.201123897
	2J 19D PT	-0.030118356	-0.024108864	-0.244125144	0.055760465
	2J 20D PT	-0.089375595	0.006893708	-0.2069084	-0.214670165

Média	-0.002077241	0.05727092	-0.300345452	0.116645558
D. padrão	0.119690085	0.086395142	0.109977402	0.13378424

		<i>PomtI</i>	<i>PomgntI</i>	<i>Large</i>	<i>Fkrp</i>
<i>SJL/J</i>	SJL 19 PT	-----	-----	-----	-----
	SJL 20 PT	-0.055517328	0.070776463	-0.143875556	-0.066006836
	SJL 21 PT	0.108226656	-0.119758224	-0.05207638	-0.716698771
	SJL 22 PT	-0.065501549	-0.276544328	-0.510041521	-0.236572006
	SJL 23 PT	-0.055517328	0.16790781	-0.345823458	-0.119186408
	SJL 24 PT	0.125806458	0.069298012	-0.344861565	-0.029188389
	SJL 25 PT	-0.261219442	-0.102372909	-0.368556231	-0.316052869
	SJL 38 PT	0.11058971	0.086715664	-0.081445469	0.234010818
	SJL 39 PT	-0.272458743	0.03702788	-0.35753548	0.217220656
	SJL 40 PT	-0.063989204	0.180125875	-0.111820506	0.437750563

Média	-0.047731196	0.012575138	-0.257337352	-0.06608036
D. padrão	0.148443902	0.149673127	0.161585013	0.343365517

TABELA 11: Valores de expressão gênica, média e desvio padrão obtidos com Q-PCR de músculo gastrocnêmio (G) de diferentes animais distróficos de 3 meses.

<i>Dmd^{mdx}</i>		<i>Pomt1</i>	<i>Pomgnt1</i>	<i>Large</i>	<i>Fkrp</i>
	MDX 8 G	0.206015877	0.338655666	-0.607303047	0.879554601
	MDX 9 G	0.506910726	0.079904468	-0.772113295	0.222196046
	MDX 10 G	0.283753383	0.240549248	-0.517126416	0.866405498
	MDX 11 G	0.096562438	0.195346058	-0.191789027	0.139879086
	MDX 18 G	0.04060234	0.09131516	-0.298432015	0.097951071
	MDX 25 G	0.440436766	0.08170727	-1.080921908	0.390581879
	MDX 26 G	0.43964843	0.248218561	-0.744727495	0.442793226
	MDX 27 G	0.706461738	0.248708736	-0.829738285	0.137354111
	MDX 28 G	1.03614963	0.50174373	-0.621602099	0.008600172
	MDX 29 G	1.379541188	0.528531061	-0.591760035	0.322012439

Média	0.513608251	0.255467996	-0.625551362	0.350732813
D. padrão	0.423747687	0.161256289	0.256718877	0.306217705

<i>Large^{myd}</i>		<i>Pomt1</i>	<i>Pomgnt1</i>	<i>Large</i>	<i>Fkrp</i>
	LG A118 G	0.281487888	-0.004803708	-0.500312917	0.488550717
	LG A121 G	-0.201349355	-0.188424994	-1.48148606	-1.744727495
	LG A123 G	-0.105130343	-0.216811309	-1.48148606	-0.752026734
	LG A124 G	0.458184436	0.294906911	-0.677780705	1.150787131
	LG A125 G	0.388101202	0.254548077	-0.903089987	1.16935109
	LG A129 G	0.094471129	0.067442843	-1.27572413	-0.950781977
	LG A130 G	-0.022733788	-0.077274542	-1.638272164	-1.167491087
	LG A131 G	0.247727833	0.282168778	-0.872895202	1.10605484
	LG A132 G	0.239549721	0.234770295	-0.806875402	1.083180004
	LG A133 G	0.459241665	0.438542349	-0.688246139	0.943049111

Média	0.183955039	0.10850647	-1.032616877	0.13259456
D. padrão	0.233829951	0.224632555	0.401383913	1.150708937

<i>Lama2^{dy2J}/J</i>		<i>Pomtl</i>	<i>Pomgntl</i>	<i>Large</i>	<i>Fkrp</i>
	2J 16 G	0.427486109	0.229681842	-0.005682847	1.142670978
	2J 17 G	0.58759873	0.199480915	0.028571253	0.907787443
	2J 61B G	0.561220679	-0.180456064	-0.35753548	1.155305666
	2J 69B G	0.677880582	-0.073657553	-0.079876674	1.003115717
	2J 70B G	0.704236337	0.079904468	0.015778756	1.472317546
	2J 79B G	0.783617765	0.024074987	-0.266000713	1.124960451
	2J 88B G	0.722222464	0.101059355	-0.084072788	1.176641017
	2J 92B G	0.560623875	0.044931546	-0.136082623	0.996599223
	2J 63C G	0.556181847	0.480868924	0.118264726	1.02905895
	2J 68C G	0.45591024	0.452246575	0.083860801	1.108869329
	2J 69C G	0.460145817	0.309417226	-0.046723663	0.8049568

Média	0.628110818	0.053127437	-0.11061264	1.122424755
D. padrão	0.114786646	0.1347761	0.13823961	0.170292919

<i>SJL/J</i>		<i>Pomtl</i>	<i>Pomgntl</i>	<i>Large</i>	<i>Fkrp</i>
	SJL 1 G	0.330819466	0.199480915	0.094121596	0.54961624
	SJL 2 G	0.767526899	0.494711025	-0.511449283	-0.142667504
	SJL 3 G	0.714162046	0.574841195	-0.454692884	-0.178486472
	SJL 4 G	0.672651923	0.443888547	-0.616184634	-0.361510743
	SJL 5 G	0.838912027	0.54567815	-0.655607726	0.049605613
	SJL 6 G	0.660865478	0.419790586	-0.761953897	-0.15864053
	SJL 7 G	0.613101517	0.733197265	-0.465973894	-0.081445469
	SJL 28 G	0.127752516	0.267640982	0.026124517	0.33825723
	SJL 29 G	0.28780173	0.320976677	0.113943352	0.148910993
	SJL 30 G	0.243286146	0.315550534	0.096910013	0.206825876

Média	0.525687975	0.431575588	-0.313476284	0.037046523
D. padrão	0.252167792	0.161669439	0.353518598	0.275859323

TABELA 12: Valores de expressão gênica, média e desvio padrão obtidos com Q-PCR de músculo diafragma (D) de diferentes animais distróficos de 3 meses.

<i>Dmd^{mdx}</i>		<i>Pomt1</i>	<i>Pomgnt1</i>	<i>Large</i>	<i>Fkrp</i>
	MDX 9 D	0.250663919	-0.075720714	-0.627087997	0.109240969
	MDX 25 D	0.176380692	-0.125518182	-0.498940738	0.160468531
	MDX 26 D	0.1532049	-0.063486258	-0.209714836	0.332842267
	MDX 27 D	0.377670439	0.065579715	-0.255707017	0.291146762
	MDX 28 D	0.351409752	0.22762965	-0.657577319	0.27392678
	MDX 29 D	0.413969972	0.244277121	-0.518557371	0.218010043

Média	0.287216612	0.045460222	-0.461264213	0.230939225
D. padrão	0.109497861	0.160565515	0.187760081	0.084617794

<i>Large^{myd}</i>		<i>Pomt1</i>	<i>Pomgnt1</i>	<i>Large</i>	<i>Fkrp</i>
	LG A118 D	0.157758886	0.334252642	-1.585026652	-0.072629637
	LG A121 D	-0.051098239	-0.099086932	-0.208309351	0.400537989
	LG A123 D	0.395675785	0.2757719	-1.173925197	0.348304863
	LG A129 D	0.369030222	0.247727833	-1.004364805	0.344981414
	LG A130 D	0.418467021	0.330616667	-1.031517051	0.347720217

Média	0.257966735	0.217856422	-1.000628611	0.273782969
D. padrão	0.201632087	0.180943739	0.500072655	0.195037161

<i>Lama2^{dy2J}/J</i>		<i>Pomt1</i>	<i>Pomgnt1</i>	<i>Large</i>	<i>Fkrp</i>
	2J 61B D	0.220892249	0.037426498	-0.178486472	0.303412071
	2J 69B D	-0.029188389	-0.063486258	-0.313363731	0.513617074
	2J 70B D	0.16879202	-0.026872146	-0.332547047	0.453471234
	2J 79B D	0.05804623	0.076276255	-0.19859629	0.448860846
	2J 88B D	0.442322956	0.220108088	-0.261219442	0.538573734
	2J 92B D	0.279438788	0.201123897	-0.22475374	0.429429264

Média	0.190050642	0.074096056	-0.251494454	0.447894037
D. padrão	0.166448558	0.116557682	0.062185774	0.082207483

<i>SJL/J</i>		<i>Pomt1</i>	<i>Pomgnt1</i>	<i>Large</i>	<i>Fkrp</i>
	SJL 2 D	0.159867847	0.252124553	-0.191789027	0.272073788
	SJL 3 D	0.200576927	0.182699903	-0.367542708	0.044147621
	SJL 4 D	-0.088842391	-0.040005162	-0.295849483	0.015359755
	SJL 5 D	0.139249218	0.076276255	-0.092588639	0.111598525
	SJL 6 D	0.492201451	0.351409752	0.028571253	0.440436766
	SJL 7 D	0.165244326	0.278524965	0.036628895	-0.087246696

Média	0.178049563	0.183505044	-0.147094952	0.132728293
D. padrão	0.185704185	0.143794914	0.167515187	0.192124461

TABELA 13: Valores de expressão gênica, média e desvio padrão obtidos com Q-PCR de músculo gastrocnêmio (G) de diferentes animais distróficos de 6 meses.

<i>Dmd^{mdx}</i>		<i>Pomt1</i>	<i>Pomgnt1</i>	<i>Large</i>	<i>Fkrp</i>
	MDX 1 G	-0,04769199	-0,643974143	-0,89279003	0,363799945
	MDX 2 G	0,53058386	-0,519993057	-0,718966633	0,57205799
	MDX 3 G	-0,279840697	-0,00656377	-0,795880017	0,465085288
	MDX 4 G	0,454692449	-0,320572103	-0,804100348	0,386320574
	MDX 5 G	-0,177831921	-0,380906669	-0,716698771	-0,22475374
	MDX 6 G	0,154728207	-0,610833916	-0,970616222	0,158663981
	MDX 7 G	0,209783015	-0,675717545	-1,167491087	0,44684771
	MDX 35 G	0,149527014	2,193397339	0,029789471	-0,181774106
	MDX 36 G	0,287577809	-0,628932138	-1,229147988	0,262688344
	MDX 37 G	-1,236572006	0,165244326	-0,485452247	0,496514519

Média	0,004495574	-0,142885168	-0,775135387	0,27454505
D. padrão	0,505787754	0,868741023	0,357737525	0,277955601

<i>Large^{myd}</i>		<i>Pomt1</i>	<i>Pomgnt1</i>	<i>Large</i>	<i>Fkrp</i>
	PL2A G	-----	0,708250889	-----	-----
	PL2B G	0,346744055	0,129689892	-0,36552273	0,605412798
	PL2C G	0,067442843	-0,671620397	-1,408935393	0,135768515
	LG 13 G	0,321391278	-0,653647026	-1,420216403	0,14082218
	LG 14 G	0,054613055	-0,709965389	-1,080921908	-0,168130226
	LG 15 G	-----	1,433945756	-----	-----
	LG A141 G	-0,270025714	-0,485452247	-0,896196279	0,979775933

Média	0,104033103	-0,035542646	-1,034358543	0,33872984
D. padrão	0,249927174	0,83504884	0,435256364	0,452583628

		<i>Pomt1</i>	<i>Pomgnt1</i>	<i>Large</i>	<i>Fkrp</i>
<i>Lama2^{62J}/J</i>	2J 10 G	-0,074172425	-0,370590401	0,105850674	0,455758203
	2J 12 G	0,057285644	-0,71219827	-0,289036881	0,648555156
	2J 13 G	-0,163675884	-0,815308569	-0,370590401	0,170848204
	2J 15 G	0,217747073	0,307496038	0,918659293	0,66238002
	2J 18 G	0,042969073	-0,625251654	-0,391473966	0,480438147
	2J 19 G	0,103119254	-0,728158393	-0,003926346	-0,213248578
	2J 20 G	0,165541077	-0,468521083	-0,159893906	0,664171705
	2J IP20 G	0,193124598	-0,368556231	0,126780577	-0,3400838
	2J IP21 G	0,453624074	0,040206628	0,435844366	-----
	2J 126B G	-0,05207638	-0,681936665	-0,258848401	-0,004803708

Média	0,09434861	-0,44228186	0,011336501	0,28044615
D. padrão	0,176269303	0,36375621	0,411852607	0,390756515

		<i>Pomt1</i>	<i>Pomgnt1</i>	<i>Large</i>	<i>Fkrp</i>
<i>SJL/J</i>	SJL 11 G	0,075181855	-0,844663963	-0,634512015	0,350441857
	SJL 12 G	0,144262774	-0,718966633	-0,448550002	0,450557009
	SJL 13 G	-0,083019953	-0,688246139	-0,709965389	-0,153662888
	SJL 14 G	0,083860801	-0,66756154	-0,517126416	0,164650216
	SJL 15 G	-0,48148606	-0,910094889	-0,698970004	-1,537602002
	SJL 16 G	-0,477555766	-0,565431096	-0,152427341	0,396896449
	SJL 17 G	-0,037630664	-0,382999659	1,679745778	0,171726454
	SJL 18 G	0,075546961	-0,76700389	-0,372634143	0,933740299
	SJL 33 G	-0,752026734	-0,707743929	-0,312471039	0,540954809

Média	-0,161429643	-0,694745748	-0,240767841	0,146411356
D. padrão	0,323730056	0,15391422	0,74358794	0,698153481

9. ANEXO 2

TABELA 20: Valores de expressão gênica, média e desvio padrão obtidos com Q-PCR de músculo de diferentes pacientes distróficos.

DMD		POMT1	POMGnT1	LARGE	FKRP
	B 1161	1.980866555	1.854773492	-----	2.021606848
	B 1195	2.438980378	2.273859747	-----	3.031990634
	B 1348	1.827530811	1.964971083	2.508552611	1.560504415
	B 1358	1.596586101	1.317770923	1.664886315	0.998738716
	B 1421	0.222716471	1.069335035	0.926651077	0.420120848
	B 1422	1.206205012	1.094366298	1.516548594	1.310034469
	B 1423	1.202188512	1.210612766	1.624684225	1.310778252
	B 1427	0.677424438	0.860577551	1.406557211	0.886547123
	B 1441	0.549371152	0.644438589	-----	1.457215569
	B 1449	-----	-----	-----	-----

Média	1.300207714	1.365633943	1.607980006	1.444170764
D. padrão	0.729473752	0.546150497	0.51530347	0.746837184

LGMD 2I		POMT1	POMGnT1	LARGE	FKRP
	B 621	-----	0.009025742	-----	1.401141955
	B 745	-----	0.990738329	-----	1.725339816
	B 752	-----	0.299507299	1.436719078	1.076640444
	B 861	-0.056505484	0.849849196	1.131297797	-0.081969663
	B 964	-0.514278574	0.282848603	1.011866357	-0.130181792
	B 965	-0.675717545	0.156549151	0.848373884	-0.276544328
	B 996	-0.515700161	0.276691529	0.770483809	-0.244125144

Média	-0.440550441	0.409315693	1.039748185	0.495757327
D. padrão	0.2670065	0.365578536	0.262617614	0.869718708

CMD 1A		POMT1	POMGnT1	LARGE	FKRP
	B 193	-2.301029996	-1.200659451	-0.651695137	-1.522878745
	B 266	-1.37675071	-0.557520231	0.322839273	-0.627087997
	B 479	-1.886056648	-0.982966661	-0.049148541	-1.113509275
	B 502	-1.602059991	-0.709965389	0.306425028	-1.031517051
	B 622	-1.721246399	-0.663540266	0.073351702	-1.180456064
	B 983	-1.124938737	0.116607744	1.265855114	-0.179798541
	B 1173	-0.920818754	0.470851325	1.646560554	-0.026410377
	B 1199	-1.37675071	-0.013228266	1.274365706	-0.254144805

Média	-1.538706493	-0.442552649	0.523569212	-0.741975357
D. padrão	0.438271296	0.577138565	0.79058614	0.548139847

LGMD 2B		POMT1	POMGnT1	LARGE	FKRP
	B 922	-0.987162775	-0.57024772	0.806519134	-1.096910013
	B 944	-0.387216143	0.122870923	1.397470717	-0.600326279
	B 1125	-0.437707136	0.328175661	0.516799704	0.10720997
	B 1129	-0.777283529	-0.484126156	0.586699802	-0.903089987
	B 1130	-0.88941029	-0.739928612	0.727622578	-0.991399828
	B 1297	-0.455931956	-0.443697499	0.399327532	-0.53313238
	B 1305	0.39375064	0.722057771	1.747287484	0.193958978
	B 1322	0.432809005	0.848989206	1.463280665	0.177247836
	B 1393	-0.527243551	0.461198289	0.998128507	-0.336299075
	B 1402	0.214843848	0.567026366	1.315781481	0.466719372

Média	-0.342055189	0.081231823	0.99589176	-0.351602141
D. padrão	0.518073122	0.590395886	0.460354272	0.559909987

10. ANEXO 3

TABELA 22: Valores de os valores de quantificação das bandas relativas às proteínas POMT1 e POMGnT1 em comparação com a banda de miosina apresentadas pelos experimentos de *Western Blotting* em amostras de músculo de camundongos normais e distróficos recém-nascidos.

<i>C57Black6</i>	POMT1		POMGnT1
	C57Black 26	1,400099625	0,660894325
	C57Black 29	0,912955822	0,992674028
	C57Black 43	1,003091375	1,162728062

Média 1,105382274 0,938765472
D. padrão 0,259181099 0,255223185

<i>Dmd^{mdx}</i>	POMT1		POMGnT1
	MDX 42	0,827639127	1,448126392
	MDX 43	0,935896683	0,997627171
	MDX 47	1,394763802	0,733743129

Média 1,052766537 1,059832231
D. padrão 0,301083911 0,361231178

<i>Large^{myd}</i>	POMT1		POMGnT1
	LG 80	0,745794294	0,772292334
	LG B106	0,579568016	0,675111974
	LG B107	0,50747229	0,978632774

Média 0,610944867 0,808679028
D. padrão 0,122219984 0,15499746

<i>Lama2^{dsj1}/J</i>	POMT1		POMGnT1
	2J 13D	0,930891945	0,742469966
	2J 15D	1,073967029	1,059609065
	2J 16D	0,979481396	1,764719303

Média 0,994780123 1,188932778
D. padrão 0,072754094 0,523251272

<i>SJL/J</i>	POMT1		POMGnT1
	SJL 20	2,162951959	2,913634106
	SJL 22	1,864608255	1,981232075
	SJL 23	1,232454786	0,925192354

Média 1,753338333 1,940019512
D. padrão 0,475123135 0,994861301

TABELA 23: Valores de os valores de quantificação das bandas relativas às proteínas POMT1 e POMGnT1 em comparação com a banda de miosina apresentadas pelos experimentos de *Western Blotting* em amostras de músculo de camundongos normais e distróficos de 3 meses.

<i>C57Black6</i>	POMT1		POMGnT1
	C57Black 19	3,629973329	3,245766589
	C57Black 21	4,043338069	1,555798049
	C57Black 23	7,276045978	1,969267819
	C57Black 24	1,37435181	1,141032566
Média		4,080927296	1,977966256
D. padrão		2,431673408	0,910325462

<i>Dmd^{mdx}</i>	POMT1		POMGnT1
	MDX 25	1,940034618	1,177146025
	MDX 26	3,423850184	1,484282194
	MDX 27	5,442256223	1,171205415
Média		3,602047008	1,277544545
D. padrão		1,475240079	0,168864797

<i>Large^{myd}</i>	POMT1		POMGnT1
	LG A129	2,920293753	1,446532239
	LG A131	1,619301653	1,354446378
	LG A132	2,873097534	1,251450855
Média		2,470897647	1,350809824
D. padrão		0,6508959	0,35019186

<i>Lama2^{ko2/J}</i>	POMT1		POMGnT1
	2J 17	1,978205627	0,668798284
	2J 63C	1,815402371	0,606533327
	2J 92B	2,800392968	1,707751806
Média		2,198000322	0,994361139
D. padrão		0,809549428	0,613493684

<i>SJL/J</i>	POMT1		POMGnT1
	SJL 3	0,827577988	1,690824271
	SJL 6	1,557950079	1,020444362
	SJL 7	2,450580105	0,979498464
Média		1,612036057	1,230255699
D. padrão		0,812851731	0,399389157

TABELA 24: Valores de os valores de quantificação das bandas relativas às proteínas POMT1 e POMGnT1 em comparação com a banda de miosina apresentadas pelos experimentos de *Western Blotting* em amostras de músculo de camundongos normais e distróficos de 6 meses.

		POMT1	POMGnT1
<i>C57Black6</i>	C57Black 2	6,209431675	1,656042353
	C57Black 3	6,994531134	1,546757276
	C57Black 4	6,317089291	2,117057923
	C57Black 7	3,620864767	2,192942853
Média		5,785479217	1,878200101
D. padrão		1,484330063	0,324203881

		POMT1	POMGnT1
<i>Dmd^{mdx}</i>	MDX 1	13,22025392	1,567391705
	MDX 6	6,577729415	1,601308025
	MDX 7	12,61933817	1,903004271
Média		10,80577384	1,690568
D. padrão		4,724274471	0,583306472

		POMT1	POMGnT1
<i>Large^{myd}</i>	PL2B	3,506347514	0,563642738
	PL2C	3,736714363	0,966587285
	LG 13	5,255908503	0,714895269
Média		4,16632346	0,748375097
D. padrão		1,762688744	0,16663448

		POMT1	POMGnT1
<i>Lama2^{001/J}</i>	2J 12	1,001119509	0,772531467
	2J 18	1,375102941	2,016894067
	2J 19	0,950910633	1,197521097
Média		1,109044361	1,32898221
D. padrão		0,495747679	0,516809365

		POMT1	POMGnT1
<i>SJL/J</i>	SJL 11	2,025454798	1,290104926
	SJL 13	4,784406778	1,385702776
	SJL 14	2,364002865	4,370160149
Média		3,057954814	2,348655951
D. padrão		1,504702956	1,751326399

11. ANEXO 4

TABELA 28: Valores de os valores de quantificação das bandas relativas às proteínas POMT1 e POMGnT1 em comparação com a banda de miosina apresentadas pelos experimentos de *Western Blotting* em amostras de músculo de controles normais humanos e pacientes distróficos.

CN	POMT1		POMGnT1
	B 1361	6,33972376	18,18731074
	B 1365	7,735309017	10,05641601
	B 1366	6,939976109	35,34165202

Média 7,005002962 21,19512626
D. padrão 0,700061369 12,90817592

DMD	POMT1		POMGnT1
	B 1422	2,680495253	4,472542323
	B 1423	2,174715605	4,483421533
	B 1358	2,843054681	4,925093148

Média 2,566088513 4,627019002
D. padrão 0,348548356 0,258197089

LGMD 2I	POMT1		POMGnT1
	B 965	9,69284207	5,731477916
	B 745	5,387202351	5,322591754

Média 7,540022211 5,527034835
D. padrão 3,044547043 0,289126178

CMD 1A	POMT1		POMGnT1
	B 502	4,494707019	3,804033975
	B 622	2,762920316	0,831327184
	B 983	10,37948019	5,083685132

Média 5,879035841 3,239682097
D. padrão 3,992526867 2,181629394

LGMD 2B	POMT1		POMGnT1
	B 944	3,302350156	13,94732065
	B 1297	2,937128224	5,119461487
	B 1393	3,452621485	3,201970748

Média 3,230699955 7,422917628
D. padrão 0,265110616 5,731061748

12. ANEXO 5

OF.CEA/IB/048/2008
Ref. 2008.1.1028.41.2

São Paulo, 06 de agosto de 2008.

Prezada Senhora

Dirijo-me a V. Sa. para informar que a Comissão de Ética em Uso de Animais Vertebrados em Experimentação do IB, em reunião realizada no dia 31/07/2008, **APROVOU** o Projeto “Avaliação da via de glicosilação da α -distroglicana na formação e manutenção do Complexo Distrofina-Glicoproteínas associadas e sua relação com o músculo normal e distrófico” - **Protocolo 075/2008**, de sua responsabilidade.

Atenciosamente.

Profª. Dra. Eleonora Trajano

Coordenadora da Comissão de Ética em uso de Animais
Vertebrados em Experimentação do IB

Ilma. Sra.

Profª. Dra. MARIZ VAINZOF

Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do IBUSP.

RESUMO

As Distrofias Musculares Progressivas constituem um grupo heterogêneo de doenças genéticas caracterizadas por uma degeneração progressiva e irreversível da musculatura esquelética. Recentemente, associaram-se defeitos do mecanismo de glicosilação da proteína α -DG com diversos tipos de distrofias musculares graves. Alterações nesse processo constituem, portanto um novo mecanismo patogênico nas doenças neuromusculares, abrindo novas possibilidades de estudo. Neste sentido, foram objetivos deste trabalho avaliar o perfil de expressão dos genes envolvidos na glicosilação da proteína α -DG em modelos murinos e em pacientes, e tentar relacionar com os diferentes processos distróficos. Verificamos que tanto camundongos normais como distróficos expressam os genes codificantes das glicosiltransferases na seguinte ordem: *Pomgnt1*>*Large*>*Fkrp*>*Pomt1*, em todas as idades e em todas as linhagens estudadas, sugerindo um mecanismo constante de regulação gênica, independente do crescimento, envelhecimento ou processo distrófico. Também observamos que a sua expressão não é influenciada pelo processo de degeneração/regeneração, uma vez que não houve concordância entre os animais com músculos mais afetados e degenerados (*Large*^{myd} e *Lama2*^{dy2JJ}) e aqueles com músculos menos degenerados (*Dmd*^{mdx} e *SJL/J*), e esse padrão se mantém quando se comparam músculos com graus de degeneração diferentes. Nos animais recém-nascidos, verificou-se um aumento de expressão significativo nas linhagens *Dmd*^{mdx} e *Large*^{myd} e uma queda nas linhagens *Lama2*^{dy2JJ} e *SJL/J*. Já nos animais adultos, verificou-se maior semelhança ao perfil dos camundongos controles normais da mesma idade, com exceção do gene *Large* que apresentou expressão diminuída em quase todos os animais em estudo. No músculo humano, observamos uma ordem do nível de expressão diferente do observado em camundongos, com *POMT1*>*POMGnT1*>*FKRP*>*LARGE*. Os pacientes com DMD apresentaram um aumento da expressão de todos os genes estudados, de forma similar ao observado no grupo de camundongos *DMD*^{mdx} recém-nascidos, sugerindo uma associação com a falta de distrofina. Os pacientes LGMD 2I não apresentaram redução significativa da expressão de *FKRP*, sugerindo que o processo de transcrição é normal, mas a tradução ou a função/atividade da enzima deve estar comprometida. Nos pacientes CMD 1A, onde a deficiência primária da α 2-laminina não está associada a defeito de glicosilação da α -DG, observou-se redução na expressão de *POMT1* e *FKRP*, sugerindo que, a deficiência dessas enzimas possivelmente não altera

este processo. Na análise de proteínas, não se observou uma correlação direta com os resultados da expressão gênica das glicosiltransferases, sugerindo mais uma vez que, por serem enzimas, essas proteínas funcionam de forma diferenciada quando comparadas a proteínas estruturais. Entretanto, nas reações com os anticorpos Anti-POMT1 e Anti-FKRP, os camundongos recém-nascidos apresentaram bandas adicionais de peso molecular maior, sugerindo que essas enzimas estão ligadas a outras proteínas ou entre si nos estágios iniciais de desenvolvimento muscular.

ABSTRACT

Muscular Dystrophies (MD) are a heterogeneous group of genetic diseases characterized by progressive and irreversible degeneration of skeletal muscle. Recently, defects in α -DG glycosylation have been associated with different types of severe forms of muscular dystrophies. Therefore, alteration in this mechanism has been considered an important pathogenetic cause of muscle degeneration, opening new avenues for therapies. The main objective of this study is to evaluate the expression cascade of genes involved in the glycosylation of α -DG in murine models and in patients with different molecular defects causing MD. We found that both normal and dystrophic mice express the glycosyltransferases genes in the following quantitative order: *Pomgnt1*>*Large*>*Fkrp*>*Pomt1*, in all ages and in all studied strains, suggesting a constant mechanism of gene regulation, independent of growth, aging or dystrophic process. We also observed that this pattern of expression is not related to the degeneration/regeneration process, since there was no concordance between the animals with the most degenerated muscles (*Large*^{myd} and *Lama2*^{dy2J/J}) or the less degenerated muscles (*Dmd*^{mdx} and *SJL/J*). Additionally, both gastrocnemius (less degenerated in *Dmd*^{mdx}) and diaphragm (more degenerated in *Dmd*^{mdx}) presented the same pattern of expression. In newborn animals, a significant increased expression was observed in *Dmd*^{mdx} and *Large*^{myd} and a decrease in *Lama2*^{dy2J/J} and *SJL/J*. In adult animals, the expression profile of *Pomt1*, *Pomgnt1* and *Fkrp* was similar in normal and affected mice, while *Large* showed a decreased expression in almost all affected animals. In human muscle, the quantitative order of expression of the 4 genes was: *POMT1*>*POMGnT1*>*FKRP*>*LARGE*, different from the mice. DMD patients showed an increased expression of all the studied genes, in a pattern similar as the observed in the newborns group of the murine *DMD*^{mdx} model, suggesting an association with the lack of protein dystrophin. LGMD 2I patients showed no significant reduction in *FKRP* expression, indicating a normal transcriptional process. In CMD 1A patients, there was a reduction in *POMT1* and *FKRP* expression, in spite of a normal α -DG glycosylation observed in this disease, suggesting that the deficiency of these enzymes may not alter this process. At the protein level, we did not observe a direct correlation between protein quantities of glycosyltransferases and gene expression, suggesting that enzymes regulation functions differently as compared with structural proteins. Interestingly, antibodies for *POMT1* and *FKRP* detected, in newborn mice, additional bands of higher molecular weight, suggesting that these enzymes are linked to each other or with other proteins in the early stages of muscle development.