Luciana de Castro Paixão Licinio

Investigação genética de duas diferentes famílias com formas dominantes de distrofia muscular do tipo cinturas

> São Paulo 2011

Luciana de Castro Paixão Licinio

Investigação genética de duas diferentes famílias com formas dominantes de distrofia muscular do tipo cinturas

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

Orientadora: Mayana Zatz

São Paulo 2011

Ficha Catalográfica

Licinio, Luciana Investigação genética de duas diferentes famílias com formas dominantes de distrofia muscular do tipo cinturas Número de páginas 67 Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva. 1. Distrofia muscular tipo cinturas 2. Estudo de ligação 3. Triagem de mutação I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Biologia/Genética.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a).

Dedicatória

Dedico essa dissertação aos meus pais

Epígrafe

"É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se à derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota."

Theodore Roosevelt

Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível graças ao apoio e ajuda de inúmeras pessoas. Agradeço:

- à professora Mayana pelo acolhimento, pela orientação e pelos ensinamentos profissionais e pessoais;
- aos pacientes e suas famílias pela colaboração e pela confiança;
- à neurologista Nury Sanchez pela enorme colaboração;
- aos neurologistas Fernando Kok e David Schlesinger por toda ajuda, apoio e amizade;
- à Constancia pela ajuda com questões burocráticas e pelos lanchinhos;
- aos queridos colegas do laboratório: Toninha, Miguel, Melinda, Naila e Henrique a por toda colaboração e pela amizade, e em especial, a Monize, Inês, Nani e Michel (além dos motivos anteriores) pela ajuda na etapa final deste trabalho;
- aos demais colegas do laboratório de células tronco, pelas enriquecedoras discussões científicas;
- a todos os membros do Depto de Biologia do UB-USP;
- à equipe de funcionários do CEGH por toda ajuda;
- à CAPES e ao Cepid pelo apoio financeiro;
- ao meu querido marido e meus sogros pelo apoio e incentivo;
- ao meu querido tio Júlio por ter me proporcionado a realização desse sonho;
- à tia Lucíola pela inspiração e pela ajuda na correção desse trabalho;
- aos meus irmãos e sobrinhos pelo carinho e incentivo;
- a toda minha família, em especial aos meus avós e tios pela torcida e apoio;
- por fim, aos meus amados pais, meus maiores incentivadores, a quem devo absolutamente tudo nessa vida.

Índice

I.	Introdução	1
	I.1. Distrofias Musculares do tipo cinturas – visão geral	1
	I.2. DMCs causadas por alterações em genes ainda não identificados	3
	I.2.1. DMC1D	3
	I.2.2. DMC1E	4
	I.2.3. DMC1F	4
	I.2.4. DMC1G	4
	I.2.5. DMC1H	5
	I.2.6. DMC2P	5
	I.3. DMCs causadas por alterações em proteínas do sarcômero	6
	I.3.1. DMC1A	7
	I.3.2. DMC2G	7
	I.3.3. DMC2J	8
	I.4. DMC causada por alterações em proteínas do envelope nuclear	10
	I.4.1. DMC1B	10
	I.5. DMCs causadas por alterações em proteínas sarcoplasmáticas	11
	I.5.1. DMC2A	11
	I.5.2. DMC2H	14

I.6. DMCs causadas por alterações em proteínas do sarcolema	15
I.6.1. DMC1C	15
I.6.2. DMC2B	17
I.6.3. DMC2C, DMC2D, DMC2E, DMC2F	19
I.6.4. DMC2Q	20
I.7. DMCs causadas por alterações em proteínas envolvidas na glicosilação do complexo distroglicano (DGC)	20
I.7.1. DMC2I	21
I.7.2. DMC2K e DMC2N	21
I.7.3. DMC2L	22
I.7.4. DMC2M	23
I.7.5. DMC2O	23
I.7.6. DMC causada por alterações nas proteínas distroglicanas	24
II. Objetivos	25
II.1 Geral	25
II.2 Específicos	25
III. Pacientes	26
III.1. Família 1	26
III.2. Família 2	27

III.3. Métodos	28			
III.3.1. Isolamento de DNA genômico a partir de sangue periférico (protocolo adaptado de Miller <i>et al.</i> , 1988)	28			
III.3.2. Amplificação de DNA utilizando-se a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR- do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)	29			
III.3.2.1. Estudo de ligação da família 1	29			
III.3.2.2. Redução da região	31			
III.3.2.3. Sequenciamento de genes canditados localizados na região de interesse do cromossomo 4	32			
IV. RESULTADOS	36			
IV.1. Mapeamento do gene	36			
IV.2. Refinamento da região candidata	38			
IV.3. Análise da região mapeada na família 1	42			
IV.4. Triagem de genes candidatos	44			
IV.5. Triagem do gene <i>FAM175A</i>	46			
V. Discussão Geral e Conclusões	47			
VI. Resumo	52			
√II. Abstract 5				
√III. Referências Bibliográficas				

I. Introdução

I.1. Distrofias Musculares do tipo cinturas – visão geral

As distrofias musculares constituem um grupo de doenças genéticas caracterizadas por perda progressiva de massa muscular. Esses distúrbios apresentam como principal sintoma a fraqueza muscular, que pode se iniciar em qualquer idade, associada frequentemente a elevados níveis séricos de creatinoquinase (CK). Do ponto de vista histopatológico, as distrofias musculares são caracterizadas pela presença de fibras necróticas e outras em regeneração, aumento da variação do tamanho das fibras e pela localização central dos mionúcleos. Degeneração e regeneração sucessivas das fibras musculares, levam por fim à necrose/apoptose com substituição de músculo por tecido adiposo e fibroso.

Classicamente, as distrofias musculares foram subdivididas segundo critérios clínicos, de acordo com o padrão de envolvimento muscular, idade de início e modo de herança. O fenótipo da distrofia muscular tipo cinturas (DMC) é definido pelo comprometimento dos músculos das cinturas pélvica e escapular, geralmente com início na segunda ou terceira décadas de vida e, muitas vezes, apresenta melhor prognóstico do que a forma mais comum de distrofia muscular - a Duchenne (DMD). Entre as DMCs, porém, há uma grande variabilidade dependendo da idade de início, da gravidade e de aspectos clínicos. A diversidade clínica se reflete em nível molecular, com presença de mutações em muitos genes diferentes, cujos produtos proteicos atuam em vários componentes da miofibra como: no aparato contrátil (sarcômero), na lâmina nuclear e no sarcolema ou citoplasma (sarcoplasma). Muitas destas proteínas estão envolvidas em outras formas de doença musculares e, neste sentido, DMC compreende doenças que apresentam desde o início neonatal grave, distrofias musculares congênitas e miopatias, a doenças relativamente benignas de início tardio. Embora a perda da ligação do citoesqueleto à matriz extracelular seja usada para explicar grande parte da patologia na DMD e nas distrofias musculares congênitas, nem todos os tipos de DMC apresentam esse mecanismo fisiopatológico (Campbell, 1995; Cohn & Campbell, 2000).

Segundo o padrão de herança envolvido, as DMCs podem ser divididas em: a) formas autossômicas dominantes (DMC1A-H, que correspondem a menos de 10% total de casos de DMC) b) formas autossômicas recessivas (DMC2A-Q, que correspondem a mais de 90% dos casos de DMC), conforme descrito na Tabela I.

Tipo de DMC	Loco	Gene	Localização da Proteína
Autossômica Dominante			
(DMC 1)			
DMC 1A	5q31	Miotilina	Sarcômero disco-Z
DMC 1B	1q21.2	Lamina A/C	Núcleo
DMC 1C	3p25	Caveolina-3	Sarcolema
DMC 1D	7q36	-	-
DMC 1E	6q23	-	-
DMC 1F	7q32.1-q32.2	-	-
DMC 1G	4q21	-	-
DMC 1H	3p25	-	-
Autossômica Recessiva			
(DMC2)			
DMC 2A	15q15.1-q21.1	Calpaína-3	Sarcômero e núcleo
DMC 2B	2p13.3-p13.1	Disferlina	Sarcolema
DMC 2C	13q12	γ-sarcoglicana	Sarcolema
DMC 2D	17q12-q21.33	α -sarcoglicana	Sarcolema
DMC 2E	4q12	β-sarcoglicana	Sarcolema
DMC 2F	5q33	δ-sarcoglicana	Sarcolema
DMC 2G	F17q12	Teletonina	Sarcômero disco-Z
DMC 2H	9q31-q34.1	TRIM32*	Citosol
DMC 2I	19q13.3	FKRP**	Golgi
DMC 2J	2q31	Titina	Sarcômero
DMC 2K	9q34.1	POMT1***	RE
DMC 2L	11p14.3	ANO5****	Sarcolema
DMC 2M	9q31	Fukutina	Golgi
DMC 2N	14q24.3	POMT2****	RE
DMC 20	1p34-p33	POMGNT1*****	Golgi
DMC 2P	3q1.13-q21.2	-	-
DMC 2Q	8q24	PLEC1******	Sarcolema

 Tabela I. Distrofias Musculares tipo Cinturas.

*TRIM32 - tripartite motif-containing protein 32

**FKRP – fukutin-related protein

***POMT1 - protein o-mannosyltransferase 1

****ANO5 - anoctamin 5

*****POMT2 - protein o-mannosyltransferase 2

******POMGNT1 - protein O-mannose beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase

******PLEC1 – plectin1

Vamos rever aqui os achados genéticos e moleculares relevantes à DMC como base para este trabalho, para isso, as DMCs que já foram descritas na literatura serão apresentadas de acordo com a função e/ou localização de suas proteínas responsáveis.

I.2. DMCs causadas por alterações em genes ainda não identificados

I.2.1. DMC1D

Existe uma controvérsia na literatura a respeito da localização dos genes da DMC1D e da DMC1E. O *European Neuromuscular Centre* (ENMC) indica como sendo em 6q23 o loco da DMC1D e em 7q36 o loco da DMC1E (Norwooda *et al.*, 2007). O *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM), por sua vez, aponta a região 7q36 como o loco da DMC1D e 6q23 como o loco da DMC1E. A *European Federation of Neurologial Societies* (Norwood *et al.*, 2011) indica a mesma localização do OMIM, sendo esta portanto, adotada nesse trabalho.

O loco para DMC1D foi mapeado em 7q36 em 1999 por Speer e colaboradores por meio de estudos realizados em duas famílias americanas previamente descritas com DMC1 (Speer *et al.*, 1995). Clinicamente essas famílias eram um pouco diferente das outras com DMC1 pela ausência de peculiaridades clínicas tais como disartria na DMC1A, defeitos cardíacos em DMC1B e hipertrofia de panturrilhas em DMC1C (Hauser *et al.*, 2000; Muchir *et al.*, 2000; Minetti *et al.*, 1998).

Em 2010 uma terceira família com DMC, oriunda da Finlândia, também foi mapeada em 7q36. Essa família restringiu a região de interesse para 6,4Mb (Sandel *et al.*, 2010). Em 2011, a descrição de mais quatro famílias finlandesas permitiu reduzir ainda mais essa região para 3,4Mb (Hackman e col., 2011).

I.2.2. DMC1E

O loco da DMC1E encontra-se em 6q23. Essa DMC está significativamente associada com o desenvolvimento de cardiomiopatia dilatada com distúrbio de condução e miopatia.

A partir da análise desse loco, foram excluídos alguns genes expressos no músculo esquelético que estão presentes na região candidata incluindo laminina alfa-2, laminina alfa-4, triadina e *fosfolambam*. No entanto, tendo em vista a presença de dois genes da laminina na região 6q, sugere-se que um terceiro possa estar localizado nesta região, uma vez que os genes dessa família de proteínas com frequência apresentam-se agrupados. Genes da laminina mapeados em 3p22 e 1q32 estão relacionados com cardiomiopatia (Messina *et al.*, 1997).

I.2.3. DMC1F

Em 2001 foi descrita uma família espanhola com 32 indivíduos afetados por DMC1 distribuídos em cinco gerações. Esses indivíduos não apresentaram características específicas. De acordo com a idade de início foram observadas duas formas: a forma juvenil, com início antes dos 15 anos (66%), e uma forma adulta com início em torno da terceira ou quarta décadas (28%). A idade de início diminuiu a cada geração, sugerindo-se uma antecipação clínica (Gamez *et al.*, 2001).

Coincidentemente, a DMC1F foi mapeada em 7q assim como a DMC1D. Contudo a DMC1D foi mapeada em 7q36, enquanto que a DMC1F situa-se em 7q31.1-q32.2; portanto os locos cromossômicos destas duas formas de DMC1 são claramente distintos (Palenzuela *et al.*, 2003).

I.2.4. DMC1G

A DMC1G refere-se a uma das famílias estudadas nesse trabalho e, portanto, será detalhada mais adiante.

I.2.5. DMC1H

A DMC1H foi identificada em uma família do sul da Itália e mapeada em 3p23-p25. A idade de início dos sintomas foi variada e os pacientes adultos, com poucas exceções, mostraram as características clínicas clássicas da DMC. Dois indivíduos não afetados compartilhavam o haplótipo da doença, sugerindo uma penetrância incompleta da mesma.

A região mapeada contém mais de 150 genes. Quatro possíveis candidatos foram priorizados para a triagem de mutação devido à sua função ou posição: *CAV3, CAPN7, MGC15763 e CMYA1*. Apesar de localizado fora da região, o gene da caveolina-3 (*CAV3*; responsável pela DMC1C) foi analisado para excluir a possibilidade de que DMC1H e DMC1C fossem formas alélicas. *CAPN7* pertence a uma superfamília de preoteases ricas em cisteína no seu sítio ativo e dependentes de íons cálcio para sua ativação. *CAPN7* se expressa principalmente no pâncreas e apenas moderadamente no músculo esquelético e fígado e, compartilha sequências homologas à *CAPN3*, o gene associado à DMC2A. Todas as regiões codificantes de *CAV3, CAPN7, MGC15763* e *CMYA1* e suas sequências intrônicas flanqueadoras foram analisadas, mas nenhuma variante patogênica foi encontrada (Bisceglia *et al.*, 2010).

I.2.6. DMC2P

Essa forma de DMC foi descrita na *LXII Reunión Anual de la Sociedad Española de Neurología.*

A DMC2P foi mapeada em 3q13.13-q21.2. Os pacientes afetados apresentam escápula alada, fraqueza proximal dos membros inferiores e tornam-se confinados à cadeira de rodas na quinta década de vida (Paradas *et al.*, 2010).

I.3. DMCs causadas por alterações em proteínas do sarcômero

Todos os músculos usam actina e miosina para contração, mas somente os músculos esquelético e cardíaco possuem estas proteínas organizadas em sarcômeros, que são as unidades contráteis fundamentais do músculo estriado (Figura 1). O sarcômero é composto de filamentos grossos (miosina) e finos (actina, troponina e tropomiosina) que deslizam uns sobre os outros durante a contração. O disco-Z é o limite entre sarcômeros individuais onde os filamentos finos estão ancorados (Stromer *et al.*, 1998). Algumas mutações em genes de componentes distintos do disco-Z foram descritas como responsáveis por diversas formas de doenças musculares (Frank *et al.*, 2006).



Modificado de Neuropathology and Applied Neurobiology (2004)

Figura 1: Esquema do sarcômero, mostrando a localização de proteínas envolvidas em DMCs.

I.3.1. DMC1A

Em 1988 Gilchrist e colaboradores descreveram uma grande família americana de descendência alemã com distrofia muscular dominante, que foi classificado como distrofia muscular de cinturas (DMC1A). Esta doença, de início na idade adulta, tem como característica clínica particular a disartria.

O gene da DMC dessa família foi mapeado em 5q31 por Speer e colaboradores em 1992 e, finalmente em 2000, Hauser e colaboradoes identificaram a miotilina (*MYOT*) como o gene responsável. (Hauser *et al.*, 2000).

O gene *MYOT* codifica uma proteína de mesmo nome que possui 498 aminoácidos e está localizada ao nível miofibrilar no disco-*Z* (Salmikangas *et al.*, 2003). Miotilina juntamente com paladina e miopaladina formam um pequeno grupo homólogo de proteínas do citoesqueleto que funcionam como reguladores da organização da actina. Portanto, *MYOT* desempenha um papel de organizador estrutural do citoesqueleto e participa na montagem e na manutenção estrutural dos discos-*Z* sarcoméricos. Além da actina, *MYOT* interage ainda com várias proteínas estruturais disco-*Z*, incluindo α -actinina e filamina C (Otey *et al.*, 2005). Mutações pontuais em *MYOT* causam além de DMC1A, miopatias miofibrilares (Selcen *et al.*, 2004). Mesmo tendo sido observadas mutações em miotilina causando doenças musculares, foi observado que não há alteração da estrutura e do funcionamento muscular em camundongos *knockout* para *MYOT*. Esse resultado pode ser uma indicação de papéis complementares da paladina, miotilina e miopaladina (Heikkinen *et al.* 2009).

I.3.2. DMC2G

A DMC2G é uma forma rara de DMC que foi mapeada em pacientes brasileiros em 1997 (Moreira *et al.*, 1997). Foi observada uma grande variabilidade clínica inter e intrafamilial nos 14 pacientes das quatro famílias avaliadas. Todos apresentaram fraqueza proximal, mas alguns apresentaram uma atrofia nos músculos distais das pernas. A idade de início variou de 9 a 15 anos de idade. Cinco deles perderam a capacidade de andar na terceira ou quarta décadas de vida. Os pacientes afetados das quatro genealogias apresentaram uma mutação nula no gene da teletonina e deficiência da proteína no músculo (Moreira *et al.*, 2000). A triagem de mutações no gene da teletonina em outras populações não identificou nenhum outro caso de teletoninopatia.

A teletonina, também conhecida como titina cap (*TCAP*) é uma proteína de 19 kDa associada ao disco-Z (Figuras 1 e 3), e parece estar envolvida na regulação e desenvolvimento da estrutura do sarcômero normal. *TCAP* liga-se ao domínio N-terminal da titina e é um substrato da titina quinase. Foi demonstrado por estudos de expressão que a interação com titina é fundamental para a integridade do sarcômero e que *TCAP* está localizada na região do disco-Z de músculos estriados esquelético e cardíaco. No coração, *TCAP* é necessário para o sensor de estiramento dos cardiomiócitos e para organização estrutural do sarcômero cardíaco (Zhang *et al.*, 2011).

TCAP parece existir como uma única isoforma e está entre os 12 transcritos mais abundantes no músculo esquelético. Estudos mostraram que *TCAP* interage e regula a secreção de miostatina, um regulador negativo do crescimento muscular, que inibe a proliferação e diferenciação celular. Dada a interação de *TCAP* com miostatina e a capacidade de *TCAP* de modular a proliferação e diferenciação de mioblastos, tem sido proposto que *TCAP* poderia oferecer um novo alvo terapêutico para distrofias musculares. Já foram relatados camundongos *knockout* para *TCAP* que compartilham muitas características dos paciente com DMC2G, sugerindo que o modelo do camundongo dará um importante modelo experimental para potenciais terapias para pacientes DMC2G (*Zhang et al.*, 2011).

I.3.3. DMC2J

A DMC2J foi descrita em uma família finlandesa com pacientes homozigotos para a mutação no gene titina, na qual em heterozogose causa a distrofia muscular tibial autossômica dominante (Hackman *et al.*, 2002). Essa DMC pode apresentar fraqueza distal, miopatia proximal e/ou distal e

também foi associada a cardiomiopatia (Udd *et al.*, 2005; Carmignac *et al.*, 2007).

A titina é a maior proteína encontrada nos mamíferos, variando entre 2970 e 3700 kDa, dependendo da isoforma. É codificada por um único gene, localizado no braço longo do cromossomo 2, na região 2q31, constituído por 363 exons. Ela é uma proteína intrassarcomérica, com cerca de 1 µm de comprimento, que se estende desde o disco-Z até à linha M (Figuras 1 e 3) e, desse modo, abrange as quatro zonas do sarcômero, que tradicionalmente é dividida em regiões distintas designadas respectivamente de: região da linha M, da banda A, da banda I e do disco-Z. A região do disco-Z contém o terminal amina, enquanto na região da linha M está localizado o terminal carboxila. No coração, a titina possui duas isoformas, N2B e N2BA, que são geradas por *splicing* alternativo (LeWinter *et al.*, 2007).

A principal característica da titina é a sua elevada elasticidade, que lhe permite distender-se e encurtar-se regulando assim o comprimento do sarcômero e a função muscular, portanto constitui o principal determinante da tensão passiva dos cardiomiócitos (Granzie *et al.*, 2004). As propriedades elásticas da titina devem-se sobretudo à região na banda I, já que na banda A, a titina é praticamente inextensível (Freiburg *et al.*, 2000).

A titina é, não só o principal determinante da tensão passiva em resposta ao estiramento, mas funciona também como uma mola elástica bidirecional. Isso porque, quando o comprimento do sarcômero é encurtado para valores inferiores ao comprimento de repouso, a titina também gera uma força elástica que tem uma direção contrária à da tensão passiva tradicional. Essa força, designada "força de restauração", permite o rápido restabelecimento do comprimento do sarcômero para os valores de repouso, empurrando o filamento grosso para longe da disco-Z (Helmes *et al.*, 1996).

A titina interage com várias proteínas do sarcômero: teletonina e alfaactinina na região do disco-Z; calpaína-3 (*CAPN3*) e obscurina na região da banda I; *myosin-binding proteín C*, calmodulina e *CAPN3* na região da linha M (Bang *et al*, 2001).

I.4. DMC causada por alterações em proteínas do envelope nuclear

I.4.1. DMC1B

A DMC1B é causa por mutações no gene das laminas A/C (*LMNA*). A *LMNA* codifica laminas nucleofílicas: lamina A e lamina C. Estas isoformas são geradas pelo *splicing* alternativo no exon 10 da *LMNA* (Genschel *et al.*, 2000). A lâmina nuclear é constituída de uma matriz bidimensional de proteínas localizado junto à membrana nuclear interna (Figura 2). A família de proteínas lamina compõem a matriz nuclear e são altamente conservadas na evolução. Durante a mitose, a lâmina da matriz é reversivelmente desmontada com as proteínas lamina fosforiladas. Elas interagem com a cromatina e proteínas integrantes da membrana nuclear, por isso parecem estar envolvidas na estabilidade nuclear, estrutura da cromatina e na expressão gênica (Zaremba-Czogalla M *et al.*, 2010).

Mutações nesse gene estão associadas à diversos fenótipos clínicos, entre os quais: distrofia muscluar de Emery-Dreifuss Distrofia muscular, lipodistrofia parcial familiar, distrofia muscular de cinturas, miocardiopatia dilatada, doença de Charcot-Marie-Tooth e síndrome de Hutchinson-Gilford (progeria).

A DMC1B caracteriza-se por uma fraqueza muscular de progressão lenta com distúrbios da condição cardíaca, mas sem contraturas e com a idade de início dos sintomas bem variada (Muchir *et al.*, 2000).



Modificado de Annu Rev Genomics Hum Genet., 2005

Figura 2: Visão do núcleo celular mostrando a localização da laminas A e C.

I.5. DMCs causadas por alterações em proteínas sarcoplasmáticas

I.5.1. DMC2A

A DMC2A é causada por mutações no gene da calpaína-3 (*CAPN3*), que codifica uma proteína de mesmo nome. *CAPN3* é membro da família das calpainas (Richard *et al.*, 1995), tendo sido o primeiro exemplo de DMC causada por deficiência enzimática (Richard *et al.*, 1995).

A calpainopatia é a forma mais freqüente das DMCs em várias populações, inclusive no Brasil, correspondendo a 30% de todos os casos identificados. Clinicamente, a DMC2A é caracterizada por uma atrofia proximal seletiva e simétrica sem envolvimento cardíaco, sem comprometimento dos músculos da face e inteligência normal (Zatz *et al.*,

2000; Richard *et al.*, 1999). Um estudo feito com 163 pacientes europeus mostrou uma grande variabilidade clínica inter e intrafamilial, desde casos leves até formas graves da doença (Richard *et al.*, 1999).

O gene da *CAPN3* tem 24 exons e cobre uma região genômica de 50 Kb. Ele é expresso em um transcrito de 3.5 Kb e traduzido em uma proteína de 94 KDa, ausente ou em quantidade inferior ao normal em pacientes com DMC2A.

CAPN3 pertence a uma superfamília de preoteases ricas em cisteína no seu sítio ativo e dependentes de íons cálcio para sua ativação; tal proteína ocorre tanto no citossol (Figura 3) como no núcleo das células constituintes de tecidos bastante específicos: músculos esqueléticos, músculo cardíaco e fígado (Huang e col. 2001; Sorimachi e col. 2001; Goll *et al.* 2003; Zatz e Starling, 2005).

Assim como outras proteínas dessa superfamília, a CAPN 3 apresenta duas subunidades distintas, que apresentam 80 kDa e 30 kDa e não interagem entre si. O domínio catalítico dessa protease encontra-se na subunidade maior da *CAPN3*.

Algumas hipóteses foram formuladas a respeito do mecanismo molecular que desencadeia a DMC2A. Baghdiguian e colaboradores em 1999, observaram que a deficiência de *CAPN3* está associada à apoptose dos núcleos das fibras musculares, o que pode ser explicado pela perturbação da via apoptótica $I\kappa B\alpha/NF-\kappa B$ (*nuclear factor of kappa light-chain gene enhancer in B cells inhibitor* α). NF- κ B regula genes anti-apoptóticos e $I\kappa B\alpha$ é seu inibidor. Estudos mostraram que $I\kappa B\alpha$ é substrato para *CAPN3*, portanto na deficiência de *CAPN3* há acúmulo de $I\kappa B\alpha$ o que diminui a expressão da resposta do NF-kB. Por ser um regulador central do estresse celular e geralmente bloquear apoptose, NF- κ B quando ausente provavelmente gera uma resposta para sensibilizar a célula a estímulos próapoptóticos (Baghdiguian *et al.*, 1999).

No interior da célula muscular, a *CAPN3* interage com a titina (*TTN*), (Sorimachi *et al.* 1995). Essa interação possivelmente se relaciona à transdução de sinais no músculo esquelético (importante para o

desenvolvimento celular normal) e à estabilidade da *CAPN3,* impedindo sua degradação (Spencer *et al.* 2002).

Apesar de interagir com titina, o substrato natural de *CAPN3* é desconhecido (Baghdiguian *et al.*, 1999). Trabalhos recentes têm demonstrado que a *CAPN3* se liga especificamente e cliva γ -filamina (Guyon *et al.*, 2003), mostrando que *CAPN3* atua nos processos de remodelação do citoesqueleto. A interação da γ -filamina com γ e δ -sarcoglicana (Thompson *et al.*, 2000), bem como as proteínas do disco-Z, miotilina e miosenina, (Takada *et al.*, 2001) sugere que o mecanismo patológico exato da DMC2A também possa ser de atuar no sarcolema e / ou disco-Z do sarcômero, interrompendo a regulamentação dessas interações proteína-proteína. Isso sugere um mecanismo patológico comum ligando LGMD2A com LGMD2C-F (sarcoglicanopatias) e DMC1A (causada por mutações no miotilina).

CAPN3 atua ainda no processo de reparo da membrana de células musculares. A coexistência de *CAPN3* e *AHNAK*, uma proteína envolvida na citoarquitetura subsarcolemal e na reparação da membrana, num complexo proteico com disferlina (proteína responsável pela DMC2B) e a presença de fragmentos proteolíticos de clivagem da *AHNAK* no músculo esquelético levou Huang e colaboradores (2008) a investigarem se *AHNAK* pode atuar como substrato para *CAPN3*. Eles demonstraram que *AHNAK* é realmente clivada por *CAPN3* e que há perda de *AHNAK* em células que expressam atividade de *CAPN3*. Por outro lado, quando *CAPN3* encontra-se deficiente no músculo esquelético de pacientes calpainopatia há acumulo de *AHNAK*. Além disso, demonstrou-se também que que os fragmentos *AHNAK* clivados por *CAPN3* perdem sua afinidade para disferlina. Assim, esses achados sugerem a interligação entre as DMC2A e DMC2B, revelando um novo papel fisiológico para *CAPN3* na regulação do complexo proteico com disferlina.

I.5.2. DMC2H

Esta forma foi mapeada no cromossomo 9q (Weiler *et al.*, 1998) e é causada por mutações em *TRIM32*, uma *E3-Ubiquitin ligase*. Os indivíduos afetados possuem uma fraqueza moderada e lenta.

O produto de *TRIM32* ubiquitina diversas proteínas, tais como o produto do proto oncogene c-Myc; a disbindina (que é uma proteína ligada a distrobrevina, componente do complexo distroglicano) e a actina.

TRIM32 localiza-se no citosol (figura 3) e é expresso no músculo esquelético onde interage com miosina e pode ubiquitinar a actina. Nenhuma alteração, entretanto, foi notada entre o tipo selvagem de *TRIM32* e DMC2H em termos de actina e miosina, por isso o mecanismo exato que mutações em *TRIM32* provocam a distrofia é desconhecido. *TRIM32* também ubiquitina disbindina, proteína associada à musculatura esquelética. A finalidade e o efeito dessa ubiquitinação, entretanto, ainda não estão claros (Locke *et al.*, 2009).

Embora *TRIM32* seja amplamente expresso, ainda não está claro porque mutações em *TRIM32* resultam num fenótipo relativamente restrito ao músculo esquelético (Shieh *et al.*, 2011).



Extraído e modificado da tese de doutorado de Alessandra Starling, IBUSP, 2004

Figura 3: Visão do sarclolema e do sarcoplasma mostrando proteínas associadas à DMCs.

I.6. DMCs causadas por alterações em proteínas do sarcolema

I.6.1. DMC1C

Mutações na Caveolina-3 (*CAV-3*) causam a DMC1C (Minetti *et al.*, 1998). Os pacientes portadores destas mutações podem desenvolver miopatias (DMC) ou *rippling muscle disease* (RMD) ou apenas aumento idiopático de CK sérico (Merlini *et al.*, 2002).

O gene *CAV-3* foi mapeado em 3p25 e possui dois exons. Este gene codifica uma proteína de mesmo nome que contém 150 aminoácidos (17KDa) e um RNAm de 1,5 Kb expresso em músculo esquelético, liso e cardíaco (Kubisch *et al.*, 2003).

As caveolinas localizam-se no sarcolema (Figura 3) e atuam na formação das cavéolas, estruturas em forma de bolha na membrana celular se originam de invaginações de membrana. As cavéolas que compartimentalizam proteínas e lipídeos específicos que estão envolvidos na sinalização celular dentro das membranas das cavéolas criando microdomínios de membrana. Isto torna as interações protéicas mais rápidas e eficientes (Tang et al., 1996; Chidlow, 2010).

Alguns estudos sugerem que a *CAV-3* também atue na formação e organização dos sistemas de túbulos transversos (túbulos T) das células musculares em diferenciação (Song *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 1996; Minetti *et al.*, 2002).

CAV-3 regula várias vias de sinalização, pois interage com várias moléculas de sinalização da membrana plasmática.

nNOS media a produção de óxido nítrico nas células do músculo esquelético. Tem sido demonstrado que *CAV-3* age diretamente com *nNOS in vitro*. Assim parece que *CAV-3* pode regular funcionalmente funções dependente de óxido nítrico no tecido muscular. Foi demonstrado *in vivo* (em camundongos transgênicos) que a superexpressão de CAV-2 no coração resulta na inibição da atividade de *NOS* (Segal *et al.*, 1999).

A distrofina e suas glicoproteínas associadas são drasticamente reduzidas em camundongos transgênicos que superexpressam *CAV-3*, mostrando um fenótipo duchenne-*like*. A ausência virtual do complexo da distrofina no tecido muscular esquelético de camundongos transgênicos *CAV-3* pode ser explicada pelo fato do domínio *ww-like* de *CAV-3* se ligar num sitio da região c-terminal de β -distroglicana, que é o mesmo sitio de ligação reconhecido pelo domínio ww da distrofina. Como a distrofina está ancorada à membrana plasmática por uma ligação direta com β -distroglicana, a superexpressão de *CAV-3* pode deslocar competitivamente a distrofina na membrana plasmática e promover como conseqüência disso, a sua degradação (Merrick *et al.*, 2009).

CAV-3 interage com disferlina (que é responsável pela DMC2B). Supõe-se que uma das funções da disferlina é interagir com a *CAV-3* para

facilitar funções de sinalização na caveolae. Em músculos de pacientes com DMC1C foi observada a localização anormal da disferlina.

Já foi demonstrado que defeitos de reparo da membrana em distrofias musculares estão ligados a alteração entre *MG53* (TRIM72), *CAV-3* e disferlina. *MG53* interage com *CAV-3* e disferlina para regular o reparo da membrana no músculo esquelético. *MG53* media o tráfego ativo de vesículas intracelulares ao sarcolema e é necessário para a circulação da disferlina para os sítios de lesão celular durante a formação do reparo. Mutações em *CAV-3* causam sua retenção no complexo de golgi e resulta numa localização aberrante de *MG53* e disferlina levando a um reparo de membrana defeituoso (Weisleder *et al.*, 2009).

I.6.2. DMC2B

Mutações no gene da disferlina (*DYSF*) são responsáveis pela segunda forma de DMC autossômica recessiva. Este gene contém 55 exons e abrange uma região de 150 Kb (Bashir *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 1998). O quadro clínico é geralmente o mais brando dentre todas as formas de DMCs apesar de haver uma grande variabilidade inter e intrafamilial (Illa *et al.*, 2001). Na população brasileira, a disferlinopatia é a segunda forma mais frequente, com 22% de todos os casos identificados.

A proteína que é codificada por *DYSF*, recebe seu mesmo nome. Ela é uma proteína de 230KDa que se localiza na periferia das fibras musculares esqueléticas ligada a membrana do sarcolema (Anderson *et al.*, 1999), se expressa nos início do desenvolvimento embrionário (Anderson *et al.*, 1999) e pode ser detectada no sangue, pele e em biópsia de vilo coriônico (Vainzof *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2002).

DYSF está relacionada com o reparo da membrana muscular. Já foi relatado anteriormente nesse trabalho como a interação da disferlina com a calpaína-3 (DMC2A) e com a caveolina-3 (DMC1C) podem atuar no reparo da membrana.

Numa fibra normal, *DYSF* está localizada no sarcolema (Figura 3) e em vesículas citoplasmáticas, e interage com anexinas 1 (A1) e 2 (A2). O rompimento da membrana causa um aumento de cálcio na fibra muscular e

cria uma zona de cálcio ao redor do local de ruptura. O cálcio ativa proteases como a calpaína, que levam a clivagem de proteínas do citoesqueleto e, consequentemente, reduz a tensão da membrana. O cálcio também ativa a agregação de vesículas de reparo carregando disferlina, provavelmente envolvendo anexinas e a migração dessas vesículas par o local de ruptura, onde elas se fundem umas com as outras e com a membrana na presença localizada de altos níveis de cálcio. *DYSF* provoca então a fusão de vesículas com a membrana plasmática, provavelmente através de *SNARES* (família de proteínas que desempenham um papel central na geração da especificidade do tráfego vesicular e na catálise do processo de fusão). A fusão das vesículas de reparo com a membrana plasmática resulta no remendo da própria, vedando-a portanto (Han & Campbell, 2007) (Figura 4).

Outros estudos mostram ainda que *DYSF* pode interagir com a afixina, uma quinase ligada a integrina que se localiza no sarcolema, (Matsuda *et al.*, 2005) e com tubulina e microtúbulo em músculo esquelético de camundongos (Azakir *et al.*, 2010).



Figura 4: Esquema mostrando a ação da disferlina no processo de reparo da membrana.

I.6.3. DMC2C, DMC2D, DMC2E, DMC2F

As DMC2C, DMC2D, DMC2E, DMC2F são causadas por mutações nos genes que codificam as γ -, α -, β -, δ - sarcoglicanas, respectivamente (Nogushi *et al.*, 1995; Roberds *et al.*, 1994;. Lim *et al.*, 1995 e Bönemann *et al.*, 1995; Nigro *et al.*, 1996). Essas DMCs são chamadas portanto de sarcoglicanopatias.

Um quadro clínico mais grave, semelhante ao observado na distrofia muscular de Duchenne, ocorre com mais frequência entre os pacientes com sarcoglicanopatias. Os níveis séricos de CK são muito elevados, principalmente entre aqueles que ainda deambulam. A idade de início costuma ser na infância e geralmente os pacientes passam a usar cadeiras de rodas antes dos 16 anos.

O conjunto das quatro proteínas forma o complexo sarcoglicano, localizado no sarcolema (Figura 3). Um defeito em qualquer uma dessas quatro proteínas desestabiliza todo o complexo, o qual está associado ao complexo distroglicano (DGC) e também aos seus compostos como: α -distrobrevina, sintrofina, *nNOS* e sarcospan. O papel do complexo sarcoglicano na organização do complexo distroglicano ainda não está bem definido. Sarcospan é um componente integral do DGC que interage diretamente e estabiliza as sarcoglicanas. Não se sabe entretanto, qual a relevância do sarcospan, uma vez que camundongos *knockout* não apresentam miopatias.

Uma ligação adicional entre DGC e actina (geralmente eles são ligados pela distrofina) é feita através da interação do DGC com o complexo sarcoglicano, uma vez que esse se interage com γ-filamina (proteína que se liga a actina). Esses dados mostram que o complexo sarcoglicano forma interações múltiplas com componentes do DGC e reforça a sua função na estabilização do DGC como um todo (Sandonà & Betto, 2009).

I.6.4. DMC2Q

A DMC2Q é causada por mutações no gene plectina-1 (*PLEC-1*) Mutações em *PLEC* causam diversas formas de epidermólise bolhosa (EB), incluindo EB simples com distrofia muscular, EB simples com atresia pilórica e EB simples tipo Ogna de herança autossômica dominante. A DMC2Q entretanto, é caracterizada pelo aparecimento de fraqueza muscular proximal na primeira infância com rápida progressão da doença na adolescência, mas sem envolvimento de problemas dermatológicos (Gundesli *et al.*, 2010).

O gene *PLEC1* codifica plectina-1, uma proteína de 500 kDa ligada ao filamento intermediário. Plectina é um membro da família das plakinas ou *cytolinkers*, que são capazes de interligar os diferentes elementos do citoesqueleto. As plakinas, não apenas desempenham um papel crucial na manutenção celular, na integridade dos tecidos e organizando mudanças dinâmicas na citoarquitetura e forma da célula, mas também servem como alicerce para a organização, posicionamento e regulação dos complexos de sinalização. Plectina é expressa em várias isoformas e em diversos de tipos de células e tecidos (Wiche *et al.*, 1998).

I.7. DMCs causadas por alterações em proteínas envolvidas na glicosilação do complexo distroglicano (DGC)

As distroglicanopatias formam um grupo de distrofias musculares que compartilham como característica patológica comum, a glicosilação aberrante da α -distroglicana (hipoglicosilação) (Muntoni *et al.*, 2002 e 2004; Martin *et al.*, 2007). A α -distroglicana é um componente da membrana periférica do complexo distrofina-glicoproteína (DGC) que se associa com β -distroglicana no sarcolema, formando um elo entre a matriz extracelular e a actina associada ao citoesqueleto (Barresi *et al.*, 2006) (Figura 3). A α -distroglicana é fortemente glicosilada e interage com várias proteínas da matriz extracelular, incluindo laminina 1 e 2, agrina, neurexina e perlecan (Brockington *et al.*, 2001) Nas distroglicanopatias, a redução na glicosilação

determina a diminuição da ligação do DGC à matriz extracelular (Brockington *et al.*, 2001).

I.7.1. DMC2I

Mutações no gene *FKRP (fukutin-related protein)* causam a DMC2I. A forma DMC1C de distrofia muscular congênita também é causada por mutações neste gene e os pacientes apresentam um quadro clínico grave, com idade de início nas primeiras semanas de vida. Já na DMC2I, o quadro clínico é mais brando, com idade de início na segunda ou terceira décadas de vida, apesar de também haver uma grande variabilidade clínica inter e intrafamilial (Brockington *et al.*, 2001). É a forma mais comum de DMC entre os pacientes europeus (Bushby *et al.*, 2003), e há uma mutação frequente, a C826A (Brockington *et al.*, 2001). Essa mesma mutação foi encontrada em 5 das 16 famílias brasileiras que apresentavam a DMC2I (Paula *et al.*, 2003).

O gene *FKRP* tem quatro exons, mas a região codificadora se limita ao exon 4. A função de seu produto ainda é desconhecido, mas estudos recentes mostram que ele se localiza no complexo de Golgi (Figura 3), e é essencial para o desenvolvimento do músculo, cérebro e olhos (Chan *et al.*, 2010)

I.7.2. DMC2K e DMC2N

As DMCs 2K e 2N são causadas por mutações nos genes *POMT1* e *POMT2* respectivamente (Balci *et al.*, 2005; Biancheri *et al.*, 2007). *POMT* é uma enzima (*protein O-mannosyl-transferase*) da família glicosiltransferase. *POMT1* e *POMT2* formam um complexo e, por isso mutações em qualquer um desses genes podem causar os mesmos fenótipos que caracterizam-se por uma forma congênita grave da doença conhecida como músculo-olho-cérebro (*muscle-eye-brain*) ou sindrome Walker-Warburg, uma forma congênita menos grave de retardo mental e uma forma moderada de distrofia muscular tipo cinturas (Manya *et al.*, 2004).

POMT1 e *POMT2* estão localizadas no retículo endoplasmático e catalisam o primeiro passo na síntese de *O-mannosyl glycan*. Como α-distroglicana é a proteína na qual esse tipo de glicosilação é demonstrada, seu processamento anormal é esperado em pacientes com mutações em *POMT1* e *POMT2* (Muntoni *et al.*, 2008).

I.7.3. DMC2L

Foram identificadas mutações recessivas em ANO5 (ou TMEM16A) que resultaram na DMC2L em três famílias canadenses e francesas e, numa miopatia distal de Miyoshi não disferlina (MMD3) em famílias de holandeses e finlandeses. Estas mutações consistem em um sítio de *splicing*, um par de base duplicada compartilhada pelos casos franceses, canadenses e holandeses, e duas mutações missense. O local de *splicing* e as duplicações introduzem códons de parada precoces e, consequentemente, provocam a deterioração *nonsense-mediated mRNA decay*, sugerindo um mecanismo de perda de função.

Anion chanel Anoctamin (ANO) é uma família de proteínas que compreende pelo menos dez membros, muitos dos quais correspondem aos canais de cloreto de cálcio ativados. Só haviam sido relatadas a essa família de genes mutações dominantes em ANO5 na displasia esquelética gnathodiaphyseal.

O fenótipo DMC2L é caracterizada por fraqueza proximal, com destaque para quadríceps femoral assimétricos e atrofia de bíceps braquial. O fenótipo MMD3 está associado a fraqueza distal, dos músculos da panturrilha em particular. Com o uso de microscopia eletrônica multifocal, lesões no sarcolema foram observadas nos dois grupos. A heterogeneidade fenotípica associada a mutações *ANO5* lembra a observada em mutações em *DYSF* que podem causar tanto DMC2B como miopatia de Miyoshi (MMD1). Embora a função da proteína *ANO5* ainda seja desconhecida, a sua função de canais de cloreto de cálcio ativados pode levar a importantes descobertas sobre o papel do reparo da membrana do músculo esquelético deficiente em distrofias musculares (Bolduc *et al.*, 2010).

I.7.4. DMC2M

A DMC2M é causada por mutações no gene fukutina (*FKTN*). Mutações nesse gene causam distrofia muscular congênita de Fukuyama (FCMD), a segunda forma mais comum de distrofia muscular no Japão que é invariavelmente associada a retardo mental e a defeitos estruturais do cérebro. Os pacientes com DMC2M, causada pela mutação nesse mesmo gene, não apresentam retardo mental ou defeitos estruturais do cérebro. Outra peculiaridade observada nesses pacientes foi a boa resposta a corticoterapia (Godfrey *et al.*, 2006).

A proteína *FKTN* está localizada no complexo de Golgi (Figura 3). Estudos utilizando PCR, imunohistoquímica e *immunoblotting* para analisar amostras de pacientes com FCMD, confirmaram a deficiência de *FKTN* e encontraram deficiência acentuada α -distroglicana no músculo esquelético e cardíaco e no tecido cerebral. β -distroglicana foi normal em todos os tecidos examinados. Estes resultados mostram que a deficiência de *FKTN* afeta a modificação da glicosilação de α -distroglicana, que então não pode se localizar ou funcionar corretamente, sendo degradada ou eluída da superfície da membrana extracelular das fibras musculares (Hayashi e colaboradores 2001).

I.7.5. DMC2O

Mutações no gene *POMGnT1* são responsáveis pela DMC2O. Mutações nesse mesmo gene é responsável pela doença conhecida como músculo-olho-cérebro (*muscle-eye-brain*) ou sindrome Walker-Warburg, numa forma de distrofia muscular congênita que é acompanhada de defeitos estruturais no olho e no cérebro e está associada a retardo mental grave. O fenótipo da DMC2O inclui início aos 12 anos de idade, miopia grave, inteligência normal. Alem disso, os pacientes com DMC2O apresentam diminuição da α -distroglicana no músculo esquelético.

POMGnT1 codifica protein O-linked mannose β 1, 2-Nacetylglucosaminyltransferase que é uma glicosiltransferase envolvida na

glicosilação da α -distroglicana, sendo responsável pela transferência de Nacetilglicosamina (GlcNAc) para manose (Clement *et al.*, 2008).

I.7.6. DMC causada por alterações nas proteínas distroglicanas

Foi recentemente identificada uma mutação *missense* (Thr192Met) em DG1, gene que cofifica α e β -distroglicana, em uma mulher com DMC e disfunção cognitiva. Um modelo de camundongo com esse tipo de mutação compartilha as anormalidades neuromusculares observadas no paciente. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a mutação prejudica a função do receptor da distroglicana no músculo esquelético e no cérebro (Hara *et al.*, 2011). Essa forma de DMC ainda não tem uma denominação.

II. Objetivos

II.1 Geral

 Identificar a região genômica associada à distrofias musculares tipo cinturas com padrão de herança autossômica dominante (DMC1)

II.2 Específicos

- Mapear o loco gênico associado a uma manifestação familiar de DMC1;
- Refinar a região mapeada na etapa anterior;
- Verificar se há co-localização da região mapeada com outras formas de DMC1 descritas na literatura;
- Apontar genes candidatos na região mapeada e triar mutações.

III. Pacientes

III.1. Família 1

A primeira família estudada nesse trabalho é procedente de Nueva Palmira, uma cidade da província de Colonia, no Sudoeste do Uruguai, com 11 indivíduos afetados por DMC AD, distribuídos em 3 gerações (figura 6).

Os pacientes estudados foram avaliados clinicamente por dois neurologistas do Centro de Estudos do Genoma Humano (coordenado pela Dra Mayana Zatz), Fernando Kok e David Schlesinger e pela neurologista Nury Sanchez da *Universidad de La República, Uruguay*.

Os indivíduos afetados apresentam fenótipos com características que não haviam sido descritas anteriormente. A idade de início da fraqueza muscular varia de 15 a 53 anos de idade, sem evidência de antecipação clínica. A progressão da doença é lenta. Os sintomas se iniciam com fragueza proximal tanto em membros superiores como em membros inferiores. O comprometimento é assimétrico em guase todos os afetados. Há comprometimento distal mais intenso nos membros inferiores que faz com que a marcha seja ao mesmo tempo anserina e escarvante. A amiotrofia é mais evidente na cintura escapular e 40% dos pacientes afetados, apresentam catarata antes dos 40 anos. Nas fases mais avançadas da doença, a força das mãos é comprometida e, além disso, o rosto fica escavado, sem fragueza muscular evidente indicando uma lipodistrofia de face. A musculatura facial e ocular é preservada, embora alguns pacientes apresentem alguma fragueza no esternocleidomastoideo. Não há fenômeno miotônico nem qualquer sinal sugestivo de neuropatia ou de comprometimento do neurônio motor periférico.

Foram coletadas amostras de sangue de 27 indivíduos (com 11 afetados). O material biológico, coletado após o consentimento dos pacientes, bem como os dados clínicos, são mantidos sob inteira responsabilidade do laboratório.

A família 2 é uma família brasileira com doze pessoas afetadas distribuídas em três gerações. Essa família também foi avaliada por um dos neurologistas do Centro de Estudos do Genoma Humano que avaliou a família 1, Fernando Kok (Figura 5).

Os pacientes afetados por DMC1G apresentam uma idade de início da fraqueza muscular variando entre 30 e 47 anos, sem evidência de antecipação da idade de início dos sintomas. Na maioria dos casos os sintomas iniciais foram: fragueza proximal dos membros inferiores proximais e câimbras musculares. A progressão da doença mostra-se lenta. Há comprometimento dos membros inferiores proximais e atrofia em todos os pacientes e nove dos dez pacientes avaliados tinham fragueza dos membros superiores proximais. Os pacientes geralmente apresentam contraturas de cotovelos e joelhos. Nos músculos afetados, os reflexos miotáticos estão reduzidos ou abolidos. Não foi detectada miotonia. Com exceção de um paciente, todos os outros apresentaram uma limitação progressiva de flexão dos dedos dos pés e das mãos, com uma amplitude reduzida dos movimentos das articulações interfalangeanas, sendo essa uma característica específica dessa forma de DMC.

Foi utilizada a amostra de DNA do probando dessa família (juntamente com a amostra de DNA do probando da família 1) para o sequenciamento de genes canditados.

O estudo foi realizado após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.
III.3. Métodos

III.3.1. Isolamento de DNA genômico a partir de sangue periférico (protocolo adaptado de Miller *et al.*, 1988)

A partir de 4 mL a 8 mL de sangue periférico coletados em tubo contendo EDTA 8% (VACUETTE[®]) e posteriormente transferidos para tubo de propileno (Corning), foi adicionada a solução de lise 1 (1x) de modo a completar 50 mL; depois de incubação em gelo durante 30 minutos (para a lise da membrana celular), a amostra foi centrifugada a 580 x g (2000 rpm rotações por minuto) por 15 minutos; o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 15 mL de solução de lise 1 (1x); uma nova centrifugação foi realizada a 580 x g (2000 rpm) durante 5 minutos; o sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado foi ressuspenso em 3 mL de solução de lise 2 (1x) (para a lise da membrana nuclear); posteriormente, foram adicionados 50 μ L de pronase E – 40 mg/mL (ou 70 μ L de proteinase K – 10 mg/mL) e 300 μ L de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%; após agitação manual, a amostra foi incubada a 37°C overnight (ou a 60°C durante 1 hora, caso tenha sido utilizada a proteinase K); a seguir, foi adicionado 1 mL de cloreto de sódio (NaCl) 6M à amostra, que foi agitada manualmente durante 15 segundos e centrifugada a 910 x g (2500 rpm) durante 20 minutos; o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de propileno e a centrifugação foi repetida (910 x g, 15 minutos); o novo sobrenadante, ao qual atribuiu-se a medida de 1 volume, foi então transferido para um tubo de vidro (com capacidade de aproximadamente 15 mL) e foram adicionados 2 volumes de etanol 100%; após vedá-lo, o tubo foi invertido número de vezes suficiente para que ocorresse a precipitação do DNA, resgatado com o auxílio de um pequeno bastão de vidro e colocado em tubo de microcentrífuga de 1,5 mL; por fim, foi adicionado TE⁻⁴ em volume que variou entre 100 µL e 500 µL, segundo a quantidade de DNA precipitado; as amostras foram incubadas a 65°C durante 30 minutos e estocadas a 4°C.

<u>Solução de lise 1</u> (estoque – 10x): 1,550 M NH₄Cl 0,100 M KHCO₃ 0,010 M EDTA (pH = 7,4) <u>Solução de lise 2</u> (estoque – 10x): 0,100 M Tris HCl (pH = 8,0) 0,400 M NaCl 0,020 M EDTA (pH = 8,2) <u>TE⁻⁴</u> 0,1 mM EDTA 10 mM Tris HCl (pH = 8,0)

III.3.2. Amplificação de DNA utilizando-se a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR – do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)

III.3.2.1. Estudo de ligação da família 1

Foram utilizados iniciadores (*primers*) fluorescentes integrantes do kit comercialmente disponível *ABI Prism*[®] *Linkage Mapping Set v2.5* (*Applied Biosystems*). Utilizando tubo de microcentrífuga de volume 0.2 mL, foi realizada a reação descrita abaixo para um volume final de 10 µL:

Reagente	Volume utilizado (uL)	Concentração final
10x PCR <i>buffer</i> (sem Mg) ^{**}	1,00	1x
2,5 mM dNTP mix	1,00	0,25 mM de dATP, dCTP, dGTP, dTTP
50 mM MgCl ₂ **	0,50	2,50 mM
Primer mix (5 µM cada primer)	0,66	0,33 µM de cada primer
DNA (25 ng/µL)	3,00	75 ng
Taq DNA polimerase (5 U/µL)**	0,13	0,65 unidades
H ₂ O ultrapura	3,71	_

A preparação foi então submetida à incubação em termociclador utilizando o seguinte programa:

Temperatura (°C)	Tempo	
94	5'	
94	15"	
55	15"	30 x
72	30"	J
72	15'	
10	8]

Após a amplificação do DNA como acima descrito, a amostra foi diluída com água ultrapura em proporção 1:10; 2 μL dessa diluição foram acrescentados a 2,7 μL de Tween-20 0,1% e 0,3 μL de Size Standard ET550-R (*GE Healthcare*, número de catálogo 25-6550-01) para posterior genotipagem utilizando-se o *MegaBACE*⁻ *DNA Analysis System* (*Amersham Biosciences*).

Para a análise dos resultados, utilizou-se o programa *Genetic Profiler* versão 2.2 (*Amersham Biosciences*).

O resultado de um estudo de ligação é dado em LOD ("Logarithm of Odds") score, que representa a probabilidade relativa do lócus da doença e um marcador genético estarem geneticamente ligados (com uma fração de recombinação teta - θ), do que eles não estarem geneticamente ligados. Um "LOD score" (Z) de pelo menos +3.0 é considerado uma evidência de ligação, Z < -2 exclui a ligação da doença com a região, já um Z entre -2 e +3 é considerado inconclusivo (Strachan, T. e Read, A.P., 1999). A partir dos genótipos obtidos e do programa de computador M.Link do FASTLINK package version 5.1 (Lathrop *et al.*, 1984; Cottingham *et al.*, 1993), são estimados os cálculos de "lod-score".

III.3.2.2. Redução da região

A redução do tamanho da região de interesse do cromossomo 4 foi realizada com as amostras da família 1. Foram utilizados marcadores não disponíveis no kit acima citado e construção dos *primers* foi feita a partir da da referência de suas sequencias fornecidas em: *genome.ucsc.edu.* Nesses casos, foi realizada a reação a seguir, para volume final de 15 µL:

Reagente	Volume utilizado (uL)	Concentração final
10x PCR <i>buffer</i> (sem Mg) ^{**}	1,50	1x
2,5 mM dNTP mix	1,50	0,25 mM de dATP, dCTP, dGTP, dTTP
50 mM MgCl ₂ **	0,75	2,50 mM
<i>Primer</i> M13 (FAM) (2,4 μM)	1,00	0,16 µM
Primer forward (0,6 µM)	1,00	0,04 µM
Primer reverse (2,4 µM)	1,00	0,16 µM
DNA (50 ng/µL)	2,00	100 ng
Taq DNA polimerase (5 U/µL)**	0,20	1 unidade
H ₂ O ultrapura	6,05	_

As amostras foram incubadas em termociclador utilizando o programa abaixo:

Temperatura (°C)	Tempo	
94	5'	_
94	30"	
55	45''	30 x
72	45''	J
94	30"	
53	45''	8 x
72	45"	J
10	00	

Após a amplificação do DNA, a mesma metodologia utilizada no item acima foi adotada.

III.3.2.3. Sequenciamento de genes canditados localizados na região de interesse do cromossomo 4

Após a definição da região de interesse localizada no cromossomo 4 (descrita nos itens anteriores) prosseguiu-se ao sequenciamento de genes candidatos nela contidos em amostras de afetados (probandos) das familias 1 e 2.

Os *primers* dos genes escolhidos foram desenhados num programa desenvolvido para isso, chamado *Primer3* (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/).

A amplificação das regiões exônicas de tais genes, bem como de suas fronteiras intron-exon foi realizada em tubo de 0,2 mL, segundo a descrição que se segue (para volume final de 10 µL):

Reagente	Volume utilizado (uL)	Concentração final
10x PCR <i>buffer</i> (sem Mg)**	1,00	1x
2,5 mM dNTP mix	1,00	0,25 mM de dATP, dCTP, dGTP, dTTP
50 mM MgCl ₂ **	0,30	1,50 mM
<i>Primer forward</i> (20 µM)	0,50	1,00 µM
Primer reverse (20 µM)	0,50	1,00 µM
DNA (100 ng/µL)	1,00	100 ng
Taq DNA polimerase (5 U/µL)**	0,10	0,50 unidade
H ₂ O ultrapura	5,60	_

** Invitrogen (número de catálogo 11615010).

A preparação foi então submetida à incubação em termociclador utilizando-se o programa *Touch Down:*

Temperatura (°C)	Тетро	
94	4'	-
94	30"	
69	40"	14 x
72	1'	0,5 °C por
94	30"	CICIO
62	40"	23 x
72	1'	
72	10'	
10	×	

A quantificação das amostras amplificadas foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 2,0%, 0,5x TBE (Tris/Borato/EDTA – solução 10x: 0,89 M Tris Base, 0,89 M ácido bórico, 0,02 M EDTA) com brometo de etídeo 0,3 µg/mL, submetido a 120 V durante 50 a 60 minutos. Para a corrida, 2 µL da amostra de PCR foram adicionados a 1 µL de tampão BFB (0,25% azul de bromofenol, 40% sucrose). O marcador utilizado como base comparativa para a quantificação foi o *Low DNA mass ladder* (Invitrogen⁻, número de catálogo 10068013). O gel foi visualizado em transiluminador com luz ultravioleta.

A etapa seguinte consistiu na purificação do produto amplificado para a remoção do excesso de *primers*, bem como de nucleotídeos provenientes da PCR:

Reagente	Volume utilizado (uL)	Concentração final
Produto de PCR	8,00	_
Exonuclease I (EXO – 20 U/µL)	0,25	5 unidades
Shrimp alkaline phosphatase (SAP – 1 U/µL)	1,00	1 unidade

A reação acima foi submetida à incubação a 37°C durante 1 hora (para atividade da EXO e da SAP), seguindo-se o aquecimento a 80°C por 20

minutos (para a completa inativação de ambas as enzimas) e o posterior resfriamento a 10°C por tempo indeterminado.

A etapa subsequente consistiu na reação de sequenciamento propriamente dita, onde ocorreu a incorporação de didesoxinucleotídeos trifosfato (ddNTP) fluorescentes na amostra de DNA:

Reagente	Volume utilizado (uL)	Concentração final
BigDye terminator v.3.1 Cycle		
Sequencing Ready Reaction	2,00	0,5x
Mix (2,5x)***		
BigDye terminator v.3.1 5x	1.00	0.5x
Sequencing Buffer***	1,00	0,5X
Primer 5 µM (forward e	1.00	0.5 uM
reverse separadamente)	1,00	070 pri
	Variável, de acordo com a	10 a 15 ng (amplicons com
Produto de PCR purificado	quantificação	100 a 300 pb); 20 a 30 ng
	quantificação	(amplicons com 300 a 800 pb)
H ₂ O ultrapura	q.s.p. 10,0	_

*** parte integrante do kit BigDye^{*} terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems – número de catálogo 4337455)

A preparação acima foi submetida à incubação em termociclador a 96°C durante 1 minuto (para desnaturação do DNA), seguindo-se 25 ciclos constituídos das etapas de desnaturação (96°C por 10 segundos), anelamento dos *primers* (50°C durante 5 segundos) e extensão para incorporação dos ddNTPs (60°C por 4 minutos). Em cada ciclo, o decréscimo de temperatura entre as etapas de desnaturação e anelamento foi de 1°C por segundo. Ao fim, as amostras foram resfriadas a 10°C por tempo indeterminado.

A purificação após a reação de sequenciamento foi feita em coluna de purificação:

- Coluna de purificação:

A coluna de purificação foi construída em placa MultiScreen (Millipore, número de catálogo MAHVN4550), utilizando-se como matriz *Sephadex*⁻ G-50 (*GE Healthcare*, número de catálogo 17057302).

Cada coluna foi hidratada com 300 µL de água ultrapura e, após 3 horas à temperatura ambiente, a placa foi centrifugada a 725 x g (2100 rpm)

durante 5 minutos. A seguir, foram adicionados 150 μ L de água ultrapura a cada coluna e a centrifugação foi repetida a 725 x g (2100 rpm) por 5 minutos. Ao produto da reação de sequenciamento foram adicionados 5 μ L de água ultrapura e, então, o volume de 15 μ L foi transferido para a coluna de purificação. Para a eluição final, foi feita mais uma etapa de centrifugação a 725 x g (2100 rpm) durante 5 minutos. As amostras foram secas em termociclador a 96°C por 15 minutos e foram acrescentados 10 μ L de formamida^{****}.

**** Hi-Di⁻ formamide (Applied Biosystems, número de catálogo 4311320).

O sequenciador utilizado para a leitura das amostras foi o ABI 3730 (*Applied Biosystems*) e o programa usado para a análise dos resultados foi o *Sequencher*[®] versão 4.8 (*Gene Codes Corporation*).

IV. RESULTADOS

IV.1. Mapeamento do gene

Foi realizado estudo de ligação na família 1 para testar se era uma das formas dominantes de DMCs descritas na literatura (Figura 5). Mapeou-se o loco para doença na região 4q13.3-q24 com *Lod score* de valor máximo 4.78 para o marcador D4S414 (Figura 6). A região foi delimitada entre os marcadores D4S392 e D4S1572, com um intervalo de 33 Mb entre eles.







Figura 6: Distribuição dos valores de *Lod Score* para Marcadores de Microssatélites no Cromossomo 4. O eixo Y corresponde aos valores de *Lod Score* e o eixo X à posição do cromossomo em Mb.

IV.2. Refinamento da região candidata

Para restringir a região foram escolhidos outros 21 marcadores de microssatélite da região de interesse do cromossomo 4 (tabela II). O refinamento da região candidata foi realizado com as mesmas amostras da etapa anterior.

Foram observados quatro eventos de recombinação (indivíduos IV:15, III:2, IV:1, IV:5), reduzindo a região candidata para a localizada entre os marcadores D4S2922 e D4S1534 (figures 7 e 8), estendendo-se por um intervalo de 4Mb em 4q21.22-q21.23.





Parametric Analysis for Dominant_Model

Figura 8: Distribuição dos valores de *Lod Score* para Marcadores de Microssatélites no Cromossomo 4. O eixo Y corresponde aos valores de *Lod Score* e o eixo X à posição do cromossomo em cM.

				Posição no	mapa físico		Sequência dos oligonuc	cleotídeos iniciadores
			NC	BI ⁽¹⁾	Ü	SC ⁽²⁾		
marcador	frequência	amplicon (pb)	início (pb)	término (pb)	início (pb)	término (pb)	forward	reverse
D4S392	0,83	93-107	70558037	70558133	70557882	70558167	TCGGTAAACATTCATCCAGA	TGTCAAAATGGACCAATCAG
D4S1543	0.62	144-170	72274915	72275074	72274901	72275294	TTCCAGCAATAGGGATGGAGTC	GAAAGIAGIIAAIAIGGUIIUU
D4S1517	0,80	225	74568933	74569185	74568811	74569250	CAAGATTGCCACTGCACTC	ATGGCTGACAAGACGCTCC
D4S1558	0,52	274-292	76010639	76010916	76010639	76011006	GGAAATAAAAACCGACCTCA	AGCTCTTTAAACCCCCATT
D4S3042	0,84	179-231	77124888	77125098	77124888	77125271	AGCTAACTACTCTCCACCCATAC	CCATGCTAAGTTTATGATGTCTG
D4S2947	0,62	229-247	79926423	79926657	79926263	79926664	CCTAGCCAATAGAGACCGTG	AGAGAGATCCCTCATCCCT
D4S2963	0,69	244-260	80169577	80169828	80169474	80169828	TTGATGGGCATTTCGAT	
D4S2964	0,76	159-197	80994362	80994542	80994337	80994649	AAGCTAAGACCCAACTTCTTT	TCATGCAATCCACAG
D4S2922	0,77	258-268	82662759	82663016	82662705	82663038	CATGTITCCACTCCAGTTCT	ATAAAGGGCAGTTAGGGATG
D4S2932	0,74	209-221	83722346	83722560	83722343	83722659	GAGCAAAACTCTGTCTCAAAAATAA	GGCTTACTTGGAAAGGTCTCTT
D4S395	0,84	113-137	84465266	84465396	84465226	84465471	TACTCCAGCCTGGATGACAG	TGTTCCATAACAAGCACGTT
D4S1538	0,70	149-161	85002769	85002917	85002747	85003075	TGAGAATTGCTTGGAACCGA	CCACACAGCACGGAGACATT
D4S1534	0,77	146-158	86527344	86527489	86527316	86527502	ATTCAGTTTCAGCCCCAT	ACCAGCCCAAGGTAGAGG
D4S2462	0,64	280-294	87711294	87711575	87711220	87711575	AGCTCATATAGGTGTNCTATTCA	GTGGGCCTGTCCTGTT
D4S2929	0,69	105-133	89465602	89465706	89465488	89465721	GGCCAGGAGTTCAAAA	TGCAGCAAGTCCAACA
D4S2460	0,73	157-191	90052685	90052873	90052672	90053035	CCAAAATCATGTGAGCCA	GAGCAGCCAACTGTAT
D4S1544	0,61	243-251	91247729	91247973	91247658	91247985	CCATACTAACACAATGGATATAGC	CAGAAACTCCAGCAGAGACT
D4S1089	0,69	117-133	91955631	91955746	91955631	91955746	TTTTATGCTACACATAATCATG	GGCAAATAAATCGATAGAGGA
D4S414	0,89	237	92657798	92658037	92657684	92658052	TCTTGCACAAAGCATCAGCCCTC	TCAGGAACCTCAGCCCATTTAAG
D4S423	0,83	103-125	92691797	92691913	92691777	92692102	TTGAGTAGTTCCTGAAGCAGC	CAAAGTCCTCCATCTTGAGTG
D4S3037	0,57	202-208		ć	93453088	93453445	GTITAGTITICCATTCCTGAATTAC	CCAACTCAAATGCCTGTC
D4S1557	0,61	140-148	95183087	95183234	95183073	95183236	CTGCTGCATGGGGAGTT	ATTGGAAAGGCTGTGAATA
D4S2909	0,74	246-252			96118827	96119188	AGTGGCCATCTGTATTGGTC	CAACTGCTACNCTTACCTTTC
D4S1578	0,77	210-232	97297689	97297912	97297664	97297982	CTCCAGTCTGTGGGGACC	GCATTCAAAAATAGCACATTAG
D4S2986	0,80	197-229	99876689	99876915	99876687	99876987	TCACTCTACAGCACTCCAGC	6 6
D4S1572	0,84	135-151		ć	103989037	103989379	AGACTCTAAAGATATGGTGATTTGC	TCTGATTGATTTTATGTGTGCC

Tabela II: Marcadores de microssatélites do cromossomo 4 utilizados para estudo da região.

IV.3. Análise da região mapeada na família 1

O loco mapeado para família 1 compreende DMC1G, coincidentemente descrito pelo nosso grupo (Starling *et al.*, 2004). Por se tratar de doenças semelhantes (apesar de possuírem peculiaridades clínicas distintas) mapeadas na mesma região, a família com DMC1G, descrita nesse trabalho como família 2, foi incluída no estudo (Figura 9).





IV.4. Triagem de genes candidatos

Uma vez que o loco mapeado nesse estudo compreende a DMC1G, demos continuidade ao estudo analisando as duas famílias juntas. Para isso, consultamos os bancos de dados (http://genome.ucsc.edu) e selecionamos 14 genes candidatos, dentro da região mapeada, que tiveram todos seus exons sequenciados em amostras de afetados (probandos) das duas famílias (tabela III).

Foi encontrada uma alteração *missense* de um único nucleotídeo (C/T) não depositada em bancos de dados públicos no exon 5 do gene *FAM175A* em todos os afetados, e apenas neles, da família 2 (Figura 10). Essa alteração causa uma provável modificação Thr141Iso. Não foi encontrada nenhuma alteração neste mesmo gene na família 1.



Figura 10: Resultado sequenciamento do gene *FAM175A* na família de DMC1G. Região do eletroferograma obtido a partir do exon 5 com destaque para a alteração (seta preta).

Símbolo	Posição (pb) ⁽²⁾	Nome
HNRNPD	83274467- 83295149	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D (AU-rich element RNA binding protein 1, 37kDa)
HNRPDL	83344347- 83351378	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D- like
ENOPH1	83351726- 83382244	Enolase-phosphatase 1
TMEM150C	83405604- 83483126	transmembrane protein 150C
C4orf11	83534266- 83542590	chromosome 4 open reading frame 11
SEC31A	83739814- 83812400	SEC31 homolog A (S. cerevisiae)
THAP9	83821837-83841284	THAP domain containing 9
COPS4	83956239- 83996971	COP9 constitutive photomorphogenic homolog
		subunit 4 (Arabidopsis)
coq2	84184977- 84205964	Coenzyme Q2 homolog, prenyltransferase
		(yeast)
HPSE	84216468- 84256306	Heparanase
MRPS18C	84377118- 84382929	Mitochondrial ribosomal protein S18C
FAM175A	84382092- 84406290	family with sequence similarity 175, member A
AGPAT9	84457653- 84527026	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 9
CDS1	85504057- 85572493	CDP-diacylglycerol synthase (phosphatidate cytidylyltransferase) 1

Tabela III: Genes sequenciados da região flanqueada pelos marcadores de microssatélite D4S2922(82,6 Mb) e D4D1534 (86,4 Mb).

(1) <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</u>
(2) <u>http://genome.ucsc.edu/</u>

IV.5. Triagem do gene FAM175A

Apesar de não existir uma referência desta alteração em bancos de dados de SNPs, decidimos realizar a triagem desse gene em pelo menos 200 controles para verificar se não se trata de um polimorfismo de baixa frequência. Entretanto encontramos essa alteração em um controle do banco de DNA do Centro de Estudos do Genoma Humano. Por isso aumentamos a amostra e analisamos 500 controles (1000 cromossomos) e não encontramos mais nenhum controle com a mesma alteração.

V. Discussão Geral e Conclusões

Entender os mecanismos patológicos responsáveis pelas distrofias musculares é de grande interesse científico. O estudo de famílias com múltiplos afetados tem sido de extrema importância para o mapeamento de novos locos gênicos, a identificação de mutações associadas aos quadros clínicos e a melhor compreensão do genoma humano funcional. A oportunidade de se associar investigação genética sistemática a criterioso estudo clínico permite a descrição de novas formas de distrofias musculares geneticamente determinadas. Além disso, estudos como este podem contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos na manifestação dessas doenças, abrindo perspectivas para seu tratamento.

Nós identificamos uma família do sudoeste do Uruguai segregando uma forma até então desconhecida de distrofia muscular autossômica dominante, que preenchiam os critérios diagnósticos para DMCs. Foi observada expressividade variável para a idade de início dos sintomas musculares. Os pacientes mostraram características clínicas clássicas da DMC, como fragueza muscular proximal lentamente progressiva dos membros superiores e inferiores com um curso relativamente benigno. Entretanto observou-se algumas peculiaridades clínicas nessa família como: uma significante progressão da fragueza muscular distal, mais pronunciada nos membros inferiores; guase metade dos indivíduos afetados tinha catarata antes dos 40 anos; nas fases mais avançadas da doença, os indivíduos afetados apresentaram lipodistrofia de face e comprometimento da força das mãos. Três indivíduos clinicamente não afetados (III:5, IV:7, V-3) apresentaram o haplótipo da doença, sugerindo que pode haver uma penetrancia incompleta apesar de que IV-7 e V-3 (25 e 40 anos de idade) estão dentro da faixa etária da idade de inicio da doença.

Como esses pacientes apresentaram características clínicas distintas àquelas já descritas na literatura para DMC1, acreditamos no início que tratava-se de uma nova forma. Para comprovar se isso era verdade, testamos essa família para todas as formas conhecidas de DMC1 e, a triagem genômica nos permitiu mapear o loco da doença em uma região de

33Mb em 4q13.3-q24 e, após o refinamento, chegamos a uma região de 4Mb em 4q21.22-q21.23 entre os marcadores D4S2922 e D4S1534. Esse loco compreende o loco da DMC1G (Família 2), coincidentemente descrito pelo nosso grupo em uma família brasileira (Starling *et al.*, 2004).

Embora as duas sejam de herança autossômica dominante, a DMC1G difere da família 1 quanto algumas características clínicas. Os afetados geralmente apresentam contraturas de cotovelos e joelhos e, como principal atributo, a limitação progressiva de flexão dos dedos das mãos e dos pés.

Enquanto não for identificado o gene responsável nas duas genealogias, não é possível saber se elas são causadas por um ou dois genes. Já foi mostrado, por exemplo que dois genes diferentes localizados em 7q são responsáveis pelas DMCs 1D e 1F (Speer *et al.*, 1999; Palenzuela *et al.*, 2003). Contudo, essas duas formas estão mapeadas em locos diferentes enquanto que as duas famílias desse estudo compartilham o mesmo loco, portanto, apesar de possuírem peculiaridades clínicas diferentes, acreditamos mais na hipótese de que um mesmo gene deve ser responsável por essas DMCs.

Por isso demos continuidade ao estudo triando genes candidatos em amostras de afetados das duas famílias. Para isso, realizamos análises *in silico* na região de interesse que revelaram a presença de aproximadamente 30 genes e muitos genes hipotéticos e pseudogenes (http://genome.ucsc.edu). A escolha dos genes canditados se baseou principalmente na função e/ou localização da expressão de seus produtos proteicos.

Um grupo de pesquisadores de Nova York, desenvolveu um modelo animal deficiente para o gene *HNRNPD* (Sadri *et al.*, 2009). Eles relataram que os camundongos deficientes do *HNRNPD* apresentavam perda da força muscular (dado não publicado), e anormalidades nucleares, fenômeno observado em células de camundongos e indivíduos com mutações na lamina A (DMC1B). Por isso esse gene foi considerado um possível candidato responsável pelas DMCs desse estudo. Além do *HNRNPD*, foi sequenciada toda região exônica e promotora do gene *HNRNPDL*, pois as isoformas das proteínas codificadas por este gene são semelhantes as do HNRPD. Nenhuma alteração foi encontrada.

Por já terem sido relatados casos isolados de miopatia em pacientes com deficiência da Coenzima Q10 (Quinzii *et al.*,2008), o gene COQ2, que codifica uma enzima que funciona nas etapas finais na biossíntese de Coenzima Q10, foi o nosso próximo candidato. Porém, não foi encontrada nenhuma alteração.

Foi demonstrado recentemente que 1-acylglycerol-3-phosphate-Oacyltransferase-1 (AGPAT) desempenha um papel na diferenciação dos mioblastos. A regulação da miogênese pela AGPAT1 está associada a alterações no citoesqueleto de actina (Subauste e col., 2010). Como uma AGPAT está presente na nossa região de interesse, a AGPAT9, foi nosso próximo candidato, entretanto também não foi encontrada nenhuma alteração.

COPS4 é um gene que codifica uma das oito subunidades que compõem COP9/*signalosome*, um complexo de proteínas altamente conservadas que funciona como um regulador importante em várias vias de sinalização. COP9 atua como um regulador positivo da E3-ubiquitina ligases. (fornecido por RefSeq). A DMC2H é causada por mutações no gene *TRIM32*, que codifica uma E3-ubiquitina ligase, por isso COPS4 também foi escolhido para ser testado, mas não foi encontrada nenhuma alteração.

Outro gene sequenciado foi SEC31A, mas também nenhuma alteração foi encontrada. A proteína codificada por esse gene é semelhante à proteína de levedura Sec31, conhecida por ser um componente do complexo de proteínas COPII que é responsável por brotamento das vesículas do retículo endoplasmático (fornecido por RefSeq).

A DMC2L é causada por mutações no gene TMEM16A (Bolduc *et al.*, 2010). Como existe uma TMEM na nossa região de interesse, a TMEM150C, também sequenciamos esse gene que não apresentou nenhuma alteração.

Nenhum outro grande candidato nos chamou atenção, mas continuamos o sequenciamento em genes escolhidos de forma relativamente aleatória (Tabela III). E num desses genes, foi encontrada uma alteração C/T, em todos os afetados da família 1 (e somente neles), de único nucleotídeo não depositada em bancos de dados públicos no exon 5 do gene *FAM175A* (Figura 9). A alteração está na região codificante do gene, causando provável

modificação Thr141Iso. Entretanto o sequenciamento desse mesmo gene na família 1 não revelou nenhuma alteração.

O gene *FAM175A* codifica uma proteína de mesmo nome que possui 409 amoniácidos. Ela é um componente do complexo *BRC1A*, gene humano que pertence à classe de genes conhecida como genes supressores de tumor, que regula o ciclo celular e previnem a proliferação celular descontrolada. Variações do *BRC1A* levam ao risco aumentado de câncer de mama (Wang *et al.*, 2007).

FAM175A participa no processo de reparo do DNA. O complexo *BRC1A* reconhece especificamente *Lys-63-linked* que ubiquitina histonas H2A e H2AX em locais de lesões do DNA, levando BRCA1-BARD1 para os locais de quebra da dupla hélice do DNA. O complexo *BRC1A* também possui uma atividade deubiquitinase que elimina especificamente Lys-63 ligada a ubiquitina em histonas H2A e H2AX. No complexo *BRC1A*, *FAM175A* atua como uma proteína central que reúne os vários componentes do complexo *BRC1A* e media o recrutamento de *BRC1A* (Liu *et al.*, 2007).

A análise in silico de *FAM175A* revelou que o aminoácido que se apresentou alterado na família 2 é extremamente conservado entre as espécies. E a predição dessa alteração é provavelmente patogênica (genetics.bwh.harvard.edu/pph/)

Foi realizada triagem de mutação do gene *FAM175A* em 500 controles (1000 cromossomos) e foi encontrada a mesma alteração dos pacientes afetados em um deles. Essa informação entretanto, não nos permite excluir esse gene como um candidato para DMC1G uma vez que, para uma alteração ser considerada um polimorfismo comum na população, ela deve ter uma frequência superior a 1%, o que não parece ser o caso.

Alem disso, o fato da família 1 não ter apresentado nenhuma alteração no gene *FAM175A*, também não nos permite excluí-lo, pois foi sequenciada apenas a região exônica e a metodologia utilizada tampouco nos permite verificar deleções nem duplicações. Estudos mais detalhados precisam ser realizados a fim de elucidar: (1) se a alteração desse gene é a causadora dessas DMCs ou, (2) se excluído esse gene, qual seria o gene responsável. Para tentar esclarecer isso, pretendemos realizar um *deep sequencing* na região de interesse. Além disso, uma análise de expressão diferencial dos

genes candidatos, entre indivíduos normais e afetados, pode trazer informação adicional. A presença de variantes não codificantes pode influenciar a regulação gênica da região. Portanto, a análise de expressão e *deep sequencing* serão os próximos passos desse estudo.

VI. Resumo

As distrofias musculares tipo cinturas (DMC) incluem um grupo heterogêneo de doenças genéticas, caracterizadas por degeneração progressiva da musculatura esquelética pélvica e escapular, cuja herança pode ser autossômica dominante (DMC1) ou autossômica recessiva (DMC2). As formas dominantes são relativamente raras, compreendendo menos que 10% dos casos. Até o momento foram mapeados 8 locos para DMC1, (DMC1A-H), onde 3 genes já foram identificados (DMC1A-C) e 17 locos para DMC2 (DMC2A-Q), onde 16 genes já foram identificados. No presente estudo, identificamos uma família uruguaia (família 1) com 11 indivíduos afetados por DMC, distribuídos em 3 gerações, com um padrão de herança autossômico dominante. Os objetivos desse trabalho foram: mapear e refinar o loco gênico associado a uma manifestação familiar de DMC1, verificar se há co-localização da região mapeada com outras formas de DMC1 descritas na literatura e, apontar genes candidatos na região mapeada e triar mutações. Foi realizado estudo de ligação, no gual mapeou-se o loco para essa doença na região 4q13-q24 com Lod score de valor máximo 4.78 para o marcador D4S414. A região foi delimitada entre os marcadores D4S392 e D4S1572. A análise da região redefiniu o loco em 4q21.22-21.23, com uma redução de 33 Mb para 4Mb. Esse loco compreende a DMC1G (família 2), descrita anteriormente pelo nosso grupo. A triagem de mutação, realizada em amostras de afetados das duas famílias, nos permitiu encontrar uma alteração Thr141Iso no exon 5 do gene FAM175A apenas nos pacientes da família 2. Essa mesma alteração foi encontrada em 1 dos 500 controles testados, o que não nos permite excluir esse gene como um candidato para DMC1G já vez que essa frequência foi inferior a 1%. O fato dessa alteração não ter sido vista na família 1 também não nos permite excluí-lo, pois foi sequenciada apenas a região exônica e a metodologia utilizada também não nos permite verificar deleções nem duplicações. Estudos mais detalhados precisam ser realizados a fim de elucidar: (1) se a alteração desse gene é a causadora dessas DMCs ou, (2) se excluído esse gene, poderia ser o responsável.

VII. Abstract

Limb girdle muscular dystrophy (LGMD) include a heterogeneous group of genetic diseases characterized by progressive degeneration of skeletal muscles of the pelvic and scapular girdles, whose inheritance may be autosomal dominant (LGMD1) or autosomal recessive (LGMD2). The dominant forms are relatively rare, comprising less than 10% of cases. So far eight loci were mapped for LGMD1 (LGMD1A-H), where three genes have been identified (LGMD1A-C) and 17 loci for LGMD2 (LGMD2A-Q), with 16 identified genes. In this study, we analised a family from Uruguay (family 1) with 12 individuals affected by LGMD, with an autosomal dominant pattern distributed in three generations. The objectives of this study were: to map and refine the gene locus associated with a familial DMC1, check for co-location of the mapped region to other forms of DMC1 described in the literature and, to point candidate genes mapped in the region and to screen mutations. A linkage study was conducted, and we mapped the locus for this disease in the region 4q13-q24 with a maximum Lod score of 4.78 for marker D4S414. The region was defined between markers D4S392 and D4S1572. The analysis of the region has redefined the locus to 4q21.22-in 21:23, a reduction from 33 Mb to 4 Mb. This site includes LGMD1G (family 2), previously described by our group. Mutation screening, performed on samples of affected pacients from both families, allowed us to find a modification Thr141Iso in exon 5 on FAM175A gene only in patients of family 2. This same alteration was found in one of the 500 controls tested but does not allow us to exclude this gene as a candidate for LGMD1G since that frequency was less than 1%. The fact that this change was not seen in a family 1 does not allow us to exclude it either because only the exonic region was sequenced and the methodology used does not allow us to detect deletions or duplications. More detailed studies should be conducted to elucidate: (1) whether the alteration found in this gene is the cause of these DMCs, or (2) if not this gene, which could be the one responsible.

VIII. Referências Bibliográficas

Ahmad F, Seidman JG, Seidman CE.*The genetic basis for cardiac remodeling*.Annu Rev Genomics Hum Genet. 2005;6:185-216.

Anderson LVB, Davison K, Moss JÁ, Richard I, Fardeau M, Tomé FMS, Hubner C, Lasa A, Colomer J, Beckmann JS. *Characterization of monoclonal antibodies to calpain 3 and protein expression in muscle from patients with limb girdle muscular dystrophy type 2A.* Am J Pathol. 1998; 153: 1169-1179.

Azakir BA, Di Fulvio S, Therrien C, Sinnreich M. *Dysferlin interacts with tubulin and microtubules in mouse skeletal muscle.* PLoS One. 2010 Apr 12;5(4):e10122.

Baghdiguian S, Martin M, Richard I, Pons F, Astier C, Bourg N, Hay RT, Chemaly R, Halaby G, Loiselet J, Anderson LV, Lopez de Munain A, Fardeau M, Mangeat P, Beckmann JS, Lefranc G. *Calpain 3 deficiency is associated with myonuclear apoptosis and profound perturbation of the IkappaB alpha/NF-kappaB pathway in limb-girdle muscular dystrophy type 2A.* Nat Med. 1999 May; 5(5):503-11. Erratum in: Nat Med 1999 Jul;5(7):849.

Balci B, Uyanik G, Dincer P, Gross C, Willer T, Talim B, Haliloglu G, Kale G, Hehr, Winkler J, Topaloglu H. *An autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy (LGMD2) with mild mental retardation is allelic to Walker-Warburg syndrome (WWS) caused by a mutation in the POMT1 gene*. Neuromusc. Disord. 2005; 15: 271-275.

Bang ML, Centner T, Fornoff F, Geach AJ, Gotthardt M, McNabb M, Witt CC, Labeit D, Gregorio CC, Granzier H, Labeit S. *The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system.* Circ Res. 2001 Nov 23;89(11):1065-72.

Barresi RC, Campbell KP. *Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease.* J Cell Sci. 2006; 119:199–207.

Bashir R, Strachan T, Keers S, Stephenson A, Mahjneh I, Maconi G. et al. *A* gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 2p. Hum. Mol. Genet. 1994; 3: 455-457.

Biancheri R, Falace A, Tessa A, Pedemonte M, Scapolan S, Cassandrini D, Aiello C, Rossi A, Broda P, Zara F, Santorelli FM, Minetti C, Bruno C. *POMT2 gene mutation in limb-girdle muscular dystrophy with inflammatory changes. Biochem. Biophys.* Res. Commun. 2007; 363: 1033-1037.

Bisceglia L, Zoccolella S, Torraco A, Piemontese MR, Dell'Aglio R, Amati A, De Bonis P, Artuso L, Copetti M, Santorelli FM, Serlenga L, Zelante L, Bertini E, Petruzzella V. *A new locus on 3p23-p25 for an autosomal-dominant limb-girdle muscular dystrophy, LGMD1H.* Eur J Hum Genet. 2010 Jun;18(6):636-41.

Bolduc V, Marlow G, Boycott KM, Saleki K, Inoue H, Kroon J, Itakura M, Robitaille Y, Parent L, Baas F, Mizuta K, Kamata N, Richard I, Linssen WH, Mahjneh I, de Visser M, Bashir R, Brais B. *Recessive mutations in the putative calcium-activated chloride channel Anoctamin 5 cause proximal LGMD2L and distal MMD3 muscular dystrophies.* Am J Hum Genet. 2010 Feb 12;86(2):213-21. Epub 2010 Jan 21.

Bönnemann CG, Modi R, Noguchi S, Mizuno Y, Yoshida M, Gussoni E. et al. β -sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglican complex. Nature Genet. 1995; 11: 266-273.

Brockington M, Blake DJ, Prandini P, et al. *Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) cause a form of congenital muscular dystrophy with secondary laminin alpha2 deficiency and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan.* Am J Hum Genet. 2001; 69:1198–1209.

Brockington M, Yuva Y, Prandini P, et al. *Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C.* Hum Mol Genet 2001;10:2851–2859.

Campbell KP. *Three muscular dystrophies: loss of cytosk- eleton-extracellular matrix linkage*. Cell 1995; 80: 675– 9

Carmignac V, Salih MA, Quijano-Roy S, et al. C-terminal titin deletions cause a novel early-onset myopathy with fatal cardiomyopathy. Ann Neurol 2007;61:340 – 351. The paper first describes a congenital and purely recessive titinopathy involving both cardiac and skeletal muscle in two unrelated consanguineous families.

Chan YM, Keramaris-Vrantsis E, Lidov HG, Norton JH, Zinchenko N, Gruber HE, Thresher R, Blake DJ, Ashar J, Rosenfeld J, Lu QL. *Fukutin-related protein is essential for mouse muscle, brain and eye development and mutation recapitulates the wide clinical spectrums of dystroglycanopathies.* Hum Mol Genet. 2010 Oct 15;19(20):3995-4006. Epub 2010 Jul 30.

Chidlow JH Jr, Sessa WC. *Caveolae, caveolins, and cavins: complex control of cellular signalling and inflammation.* Cardiovasc Res. 2010 May 1;86(2):219-25. Epub 2010 Mar 3. Review.

Clement EM, Godfrey C, Tan J, Brockington M, Torelli S, Feng L, Brown SC, Jimenez-Mallebrera C, Sewry CA, Longman C, Mein R, Abbs S, Vajsar J, Schachter H, Muntoni F. *Mild POMGnT1 mutations underlie a novel limbgirdle muscular dystrophy variant.* Arch Neurol. 2008 Jan;65(1):137-41.

Cohn RD, Campbell KP. *Molecular basis of muscular dystrophies*. Muscle Nerve 2000; 23: 1456–71

Cottingham RW Jr, Idury RM, Schäffer AA. *Faster sequential genetic linkage computations*. Am J Hum Genet. 1993 Jul;53(1):252-63.

Frank D, Kuhn C, Katus HA, Frey N (2006) *The sarcomeric Z-disc a nodal point in signalling and disease.* J Mol Med. 2006; 84:446–468.

Freiburg A, Trombitas K, Hell W, Cazorla O, Fougerousse F, Centner T, et al. *Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity*. Circ Res. 2000; 86 (11): 1114-21.

Gamez J, Navarro C, Andreu AL, Fernandez JM, Palenzuela L, Tejeira S, Fernandez-Hojas R, Schwartz S, Karadimas C, DiMauro S, Hirano M, Cervera C. *Autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy: a large kindred with evidence for anticipation*. Neurology. 2001 Feb 27;56(4):450-4.

Genschel J, Schmidt HH. *Mutations in the LMNA gene encoding lamin A/C. Hum Mutat. 16*(*6*):*451-9, 2000.*

Gilchrist JM, Pericak-Vance M, Silverman L, Roses AD. *Clinical and genetic investigation in aut.osomal dominant limb girdle muscular dystrophy.* Neurology. 1998; 38(1):5–9.

Godfrey C, Escolar D, Brockington M, Clement EM, Mein R, Jimenez-Mallebrera C, Torelli S, Feng L, Brown SC, Sewry CA, Rutherford M, Shapira Y, Abbs S, Muntoni F. *Fukutin gene mutations in steroid-responsive limb girdle muscular dystrophy.* Ann Neurol. 2006 Nov;60(5):603-10.

Granzier HL, Labeit S. *The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease*. Circ Res. 2004; 94 (3): 284-95.

Gundesli H, Talim B, Korkusuz P, Balci-Hayta B, Cirak S, Akarsu NA, Topaloglu H, Dincer P. *Mutation in exon 1f of PLEC, leading to disruption of*

plectin isoform 1f, causes autosomal-recessive limb-girdle muscular dystrophy. Am J Hum Genet. 2010 Dec 10;87(6):834-41. Epub 2010 Nov 25.

Guyon JR, Kudryashova E, Potts A, Dalkilic I, Brosius MA, Thompson TG, Beckmann JS, Kunkel LM, Spencer MJ. *Calpain 3 cleaves filamin C and regulates its ability to interact with gamma and delta-sarcoglycans*. Muscle Nerve. 2003; 28: 472-83.

Hackman P, Sandell S, Sarparanta J, Luque H, Huovinen S, Palmio J, Paetau A, Kalimo H, Mahjneh I, Udd B. *Four new Finnish families with LGMD1D; refinement of the clinical phenotype and the linked 7q36 locus.* Neuromuscul Disord. 2011 May; 21(5):338-44. Epub 2011 Mar 3.

Hayashi YK, Ogawa M, Tagawa K, Noguchi S, Ishihara T, Nonaka I, Arahata K. *Selective deficiency of alpha-dystroglycan in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy.* Neurology. 2001 Jul 10;57(1):115-21.

Han R & Campbell KP. *Dysferlin and Muscle Membrane Repair. Curr Opin Cell Biol.* 2007 August ; 19(4): 409–416.

Hauser MA, Horrigan SK, Salmikangas P, Torian UM, Viles KD, Dancel R, Tim RW, Taivainen A, Bartoloni L, Gilchrist JM, Stajich JM, Gaskell PC, Gilbert JR, Vance JM, Pericak-Vance MA, Carpen O, Westbrook CA, Speer MC. *MYOTilin is mutated in limb girdle muscular dystrophy 1A.* Hum Mol Genet 9. 2000; (14):2141–2147.

Hara Y, Balci-Hayta B, Yoshida-Moriguchi T, Kanagawa M, Beltrán-Valero de Bernabé D, Gündeşli H, Willer T, Satz JS, Crawford RW, Burden SJ, Kunz S, Oldstone MB, Accardi A, Talim B, Muntoni F, Topaloğlu H, Dinçer P, Campbell KP. *A dystroglycan mutation associated with limb-girdle muscular dystrophy.* N Engl J Med. 2011 Mar 10;364(10):939-46.

Heikkinen O, Permi P, Koskela H, Carpén O, Ylänne J, Kilpeläinen I. Solution structure of the first immunoglobulin domain of human MYOTilin. J Biomol

NMR. 2009; 44:107-112

Helmes M, Trombitas K, Granzier H. *Titin develops restoring force in rat cardiac myocytes*. Circ Res. 1996; 79 (3): 619-26.

Ho M, Gallardo E, McKenna-Yasek D, De Luna N, Illa I, Brown Jr RH. *A novel, blood-based diagnostic assay for limb girdle muscular dystrophy 2B and Miyoshi myopathy.* Annals of Neurology. 2002; 51(1):129-33.

Huang Y, de Morrée A, van Remoortere A, Bushby K, Frants RR, Dunnen JT, van der Maarel SM. *Calpain 3 is a modulator of the dysferlin protein complex in skeletal muscle*. Hum Mol Genet. 2008 Jun 15;17(12):1855-66. Epub 2008 Mar 11.

Illa I, Serrano-Munuera C, Gallardo E, Lasa A, Rojas-Garcia R, Palmer J, Gallano P, Baiget M, Matsuda C, Brown RH. *Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype*. Ann Neurol. 2001; Jan;49(1):130-4.

Kubisch C, Schoser BG, von Düring M, Betz RC, Goebel HH, Zahn S, Ehrbrecht A, Aasly J, Schroers A, Popovic N, Lochmüller H, Schröder JM, Brüning T, Malin JP, Fricke B, Meinck HM, Torbergsen T, Engels H, Voss B, Vorgerd M. *Homozygous mutations in caveolin-3 cause a severe form of rippling muscle disease.* Ann Neurol. 2003 Apr;53(4):512-20.

Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, Ott J. *Strategies for multilocus linkage analysis in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984 Jun;81(11):3443-6.

Laval SH, Bushby KM. *Limb-girdle muscular dystrophies--from genetics to molecular pathology*.Neuropathol Appl Neurobiol. 2004 Apr;30(2):91-105.

LeWinter MM, Wu Y, Labeit S, Granzier H. Cardiac titin: structure, functions

and role in disease. Clin Chim Acta. 2007; 375 (1-2): 1-9.

Lim LE, Duclos F, Broux O, Bourg N, Sunada Y, Allamnd V, Meyer J. et al. β -sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12. Nature Genet. 1995; 11: 257-265.

Liu J, Aoki M, Illa I, Chou FL, Oeltjen JC, Hosler BA et al. *Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy.* Nature Genetics. 1998; 20: 31-36.

Liu Z, Wu J, Yu X. *CCDC98 targets BRCA1 to DNA damage sites.* Nat Struct Mol Biol. 2007 Aug;1 4(8): 716-20. Epub 2007 Jul 22.

Locke M, Tinsley CL, Benson MA, Blake DJ. *TRIM32 is an E3 ubiquitin ligase for dysbindin.* Hum Mol Genet. 2009 Jul 1;18(13):2344-58.

Manya H, Chiba A, Yoshida A, Wang X, Chiba Y, Jigami Y, Margolis RU, Endo T. *Demonstration of mammalian protein O-mannosyltransferase activity: coexpression of POMT1 and POMT2 required for enzymatic activity.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jan 13;101(2):500-5. Epub 2003 Dec 29.

Martin PT. Congenital muscular dystrophies involving the O-mannose pathway. Curr Mol Med. 2007; 7:417–425.

Matsuda C, Kameyama K, Tagawa K, Ogawa M, Suzuki A, Yamaji S, Okamoto H, Nishino I, Hayashi YK. *Dysferlin interacts with affixin (beta-parvin) at the sarcolemma.* J Neuropathol Exp Neurol. 2005 Apr; 64(4):334-40.

Merrick D, Stadler LK, Larner D, Smith J. *Muscular dystrophy begins early in embryonic development deriving from stem cell loss and disrupted skeletal muscle formation.* Dis Model Mech. 2009 Jul-Aug;2(7-8):374-88.

Messina DN, Speer MC, Pericak-Vance MA, McNally EM. *Linkage of familial dilated cardiomyopathy with conduction defect and muscular dystrophy to chromosome* 6q23. Am J Hum Genet. 1997; 61(4):909-17.

Minetti C, Sotgia F, Bruno C, Scartezzini P, Broda P, Bado M, Masetti E, Mazzocco M, Egeo A, Donati MA, Volonte D, Galbiati F, Cordone G, Bricarelli FD, Lisanti MP, Zara F. *Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy*. Nat Genet. 1998; 18(4):365-8.

Minetti C, Bado M, Broda P, Sotgia F, Bruno C, Galbiati F, Volonte D, Lucania G, Pavan A, Bonilla E, Lisanti MP, Cordone G. *Impairment of caveolae formation and T-system disorganization in human muscular dystrophy with caveolin-3 deficiency.* Am J Pathol. 2002 Jan;160(1):265-70.

Moreira ES, Vainzof M, Marie SK, Sertié AL, Zatz M, Passos-Bueno MR. *The* seventh form of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy is mapped to 17q11-12. Am J Hum Genet. 1997 Jul; 61(1):151-9.

Muchir A, Bonne G, van der Kooi A J, van Meegen M, Baas F, Bolhuis P A, Visser M and Schwartz K. *Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B).* Human Molecular Genetics, 2000 9 :1453-1459.

Muntoni F, Brockington M, Blake DJ, Torelli S, Brown SC. *Defective glycosylation in muscular dystrophy.* Lancet. 2002; 360: 1419–1421.

Muntoni F, Brockington M, Torelli S, Brown SC. *Defective glycosylation in congenital muscular dystrophies*. Curr Opin Neurol. 2004; 17:205–209.

Muntoni F, Torelli S, Brockington M. *Muscular dystrophies due to glycosylation defects*. Neurotherapeutics. 2008 Oct;5(4):627-32. Review.

Nigro V, de Sa Moreira E, Piluso G, Vainzof M, Belsito A, Politano L, Puca AA, Passos-Bueno MR, Zatz M. *Autossomal recessive limb-girdle muscular dystrophy, LGMD2F, is caused by a mutation in the \delta-sarcoglycan gene. Nature Genet. 1996; 14: 195-198.*

Noguchi S, et al. *Mutations in the dystrophin-associated protein* γ *-sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy.* Science. 1995; 270: 819-822.

Norwood F, de VisserM, Eymard B, LochmüllerH, Bushby K. *Limb girdle muscular dystrophies.* European Handbook of Neurological Management. 2011; 1.

Norwooda F, de Visserc M, Eymardd B, Lochmuller H, Bushbya K and Members of EFNS Guideline Task Force. *EFNS guideline on diagnosis and management of limb girdle muscular dystrophies*. European Journal of Neurology 2007; 14: 1305–1312.

Otey CA, Rachlin A, Moza M, Arneman D, Carpén O. *The palladin/MYOTilin/myopalladin family of actin-associated scaffolds*. Int Rev Cytol. 2005; 246:31–58.

Palenzuela L, Andreu AL, Gamez J, Vila MR, Kunimatsu T, Meseguer A, Cervera C, Fernandez Cadenas I, Van Der Ven PF, Nygaard TG, Bonilla E, Hirano M. *A novel autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy (LGMD 1F) maps to 7q32.1-32.2* Neurology. 2003; 61(3): 404-6.

Paradas C, Márquez C, Cabrera M, Martínez-López JA, Gómez-Sánchez L, Fernández-Chacón R, Rojas-García R, Gallardo E, Clarimon J. 3q13.13q21.2: *Nuevo locus para una distrofia muscular de cinturas autosómica recesiva con rasgos radiológicos inusuales*. Neurología. 2010; 25 (Espec Congr): 61. Paula F, Vieira N, Starling A, Yamamoto LU, Lima B, de Cassia Pavanello R, Vainzof M, Nigro V, Zatz M. *Asymptomatic carriers for homozygous novel mutations in the FKRP gene: the other end of the spectrum*. Eur J Hum Genet. 2003; 11:923-30.

Quinzii CM, López LC, Naini A, DiMauro S, Hirano M. *Human CoQ10 deficiencies*. Biofactors. 2008; 32(1-4):113-8.

Richard I, Broux O, Allamand V, Fougerousse F, Chiannilkulchai N,Bourg N, Brenguier L, Devaud C, Pasturaud P, Roudaut C, Hillaire D,Passos-Bueno MR, Zatz M, Tishfield JA, Fardeau M, Jackson CE, Cohen D,Beckmann J. *Mutations in the proteolytic enzyme, calpain 3, cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A*. Cell. 1995; 81:27-40.

Richard I, Roudaut C, Saenz A, et al. Calpainopathy: *A survey of mutations and polymorphisms.* Am.J.Hum.Genet. 1999; 64:1524-1540.

Roberds SL, Leturcq F, Allamand V, Piccolo F, Jeanpierre M, Anderson RD, Lim LE, Lee JC, Tome FM, Romero NB, et al. *Missense mutations in the adhalin gene linked to autossomal recessive muscular dystrophy.* Cell. 1994; 78: 625-633.

Sadri N, Schneider RJ. *Auf1/Hnrnpd-deficient mice develop pruritic inflammatory skin disease.* J Invest Dermatol. 2009 Mar;129(3): 657-70. Epub 2008 Oct 2.

Salmikangas P, Mykkänen O-M, Grönholm M, Heiska L, Kere J, Carpeén O. *MYOTilin, a novel sarcomeric protein with two Ig-like domains, is encoded by a candidate gene for limb-girdle muscular dystrophy*. Hum Mol Gen. 1999; 8:1329–1336.
Salmikangas P, van der Ven PF, Lalowski M, Taivainen A, Zhao F, Suila H, Schroder R, Lappalainen P, Furst DO, Carpen O. *MYOTilin, the limb girdle muscular dystrophy 1A (LGMD1A) protein, cross-links actin filaments and controls sarcomere assembly.* Hum Mol Genet. 2003; 12(2):189–203.

Sandell S, Huovinen S, Sarparanta J, et al. *The enigma of 7q36 linked autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy.* J Neurol Neurosurg Psychiatry 2010 81: 834-839.

Sandonà D & Betto R. Sarcoglycanopathies: molecular pathogenesis and therapeutic prospects. Expert Rev Mol Med. 2009 Sep 28;11:e28. Review.

Selcen D, Engel AG. *Mutations in MYOTilin cause myo- fibrillar myopathy.* Neurology. 2004; 62(8):1363–1371.

Segal SS, Brett SE, Sessa WC. Codistribution of NOS and caveolin throughout peripheral vasculature and skeletal muscle of hamsters. Am J Physiol. 1999 Sep;277(3 Pt 2):H1167-77.

Shieh PB, Kudryashova E, Spencer MJ. *Limb-girdle muscular dystrophy 2H and the role of TRIM32.* Handb Clin Neurol. 2011;101:125-33.

Starling A. Mapeamento de genes associados a doenças neuromusculares. 2004. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo – Instituto de Biologia. São Paulo, São Paulo. Brasil.

Starling A, Kok F, Passos-Bueno MR, Vainzof M, Zatz M. A new form of autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy (LGMD1G) with progressive fingers and toes flexion limitation maps to chromosome 4q21. Eur J Hum Genet. 2004 Dec;12(12):1033-40. Erratum in: Eur J Hum Genet. 2005 Feb;13(2):264.

64

Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics*.2nd edition. New York: Wiley-Liss; 1999.

Song KS, Li S, Okamoto T, Quilliam L, Sargiacomo M, Lisanti MP. *Copurification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent free purification of caveolae membranes. J Biol Chem.* 1996; 271:9690-9697.

Speer MC, Yamaoka LH, Gilchrist JH, Gaskell CP, Stajich JM, Vance JM, Kazantsev A, Lastra AA, Haynes CS, Beckmann JS et al. Confirmation of genetic heterogeneity in limb-girdle muscular dystrophy: linkage of an autosomal dominant form to chromosome 5q. Am J Hum Genet. 1992; 50(6):1211–1217.

Speer MC, Gilchrist JM, Chutkow JG, McMichael R, Westbrook CA, Stajich JM, Jorgenson EM, Gaskell PC, Rosi BL, Ramesar R, et al. *Evidence for locus heterogeneity in autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy.* Am J Hum Genet. 1995 Dec; 57(6):1371-6.

Speer MC, Vance JM, Grubber JM, Lennon Graham F, Stajich JM, Viles KD, Rogala A, McMichael R, Chutkow J, Goldsmith C, Tim RW, Pericak-Vance MA *Identification of a new autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy locus on chromosome 7.* Am J Hum Genet. 1999; 64 (2): 556-62.

Stromer, M. H. *The cytoskeleton in skeletal, cardiac and smooth muscle cells*. Histol. Histopathol. 1998; 131, 283–291. Review.

Subauste AR, Elliott B, Das AK, Burant CF. *A role for 1-acylglycerol-3-phosphate-O-acyltransferase-1 in myoblast differentiation*. Differentiation. 2010 Sep-Oct; 80(2-3):140-6. Epub 2010 Jun 19.

Takada F, Vander Woude DL, Tong HQ, Thompson TG, Watkins SC, Kunkel LM, Beggs AH. *Myozenin: an alpha-actinin and gamma-filamin-binding protein of skeletal muscle Z lines*. Proc Natl Acad Sci USA. 2001; 98: 1595-600.

65

Tang Z, Scherer PE, Okamoto T, Song K, Chu C, Kohtz DS, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP. *Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle*. J Biol Chem 1996; 271:2255-2261.

Thompson TG, Chan Y-M, Hack AA, Brosius M, Rajala M, Lidov HGW, McNally EM, Watkins S, Kunkel LM. *Filamin 2 (FLN2): a muscle-specific sarcoglycan interacting protein*. Cell Biol. 2000; 148: 115-26.

Udd B, Vihola A, Sarparanta J, et al. Titinopathies and extension of the M-line mutation phenotype beyond distal myopathy and LGMD2J. Neurology 2005; 64:636 – 642.

Vainzof M, Pavanello RCM, Anderson LVB, Moreira ES, Passos-Bueno MR & Zatz M. *Dysferlin analysis in autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies (AR-LGMD)*. Journal of Molecular Neurosciences. 2001; 17: 71-80.

Wang, B., Matsuoka, S., Ballif, B. A., Zhang, D., Smogorzewska, A., Gygi, S. P., Elledge, S. J. *Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response.* Science. 2007; 316: 1194-1198.

Weiler T, Greenberg CR, Zelinski T. et al. *A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrphy in Manitoba Hutterites maps to chromosome region 9q31-q33; evidence for another limb-girdle muscular dystrophy locus.* Am. J. Hum. Genet. 1998; 63: 140-147.

Weisleder N, Takeshima H, Ma J. *Mitsugumin 53 (MG53) facilitates vesicle trafficking in striated muscle to contribute to cell membrane repair.* Commun Integr Biol. 2009 May;2(3):225-6.

Wiche G. Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. J Cell Sci. 1998 Sep;111 (Pt 17):2477-86. Review

Zaremba-Czogalla M, Dubińska-Magiera M, Rzepecki R. *Laminopathies: the molecular background of the disease and the prospects for its treatment.* Cell Mol Biol Lett. 2011 Mar;16(1):114-48. Epub 2010 Dec 27. Review.

Zatz M, Vainzof M, Passos-Bueno MR. *Limb-girdle muscular dystrophy: one gene with different phenotypes, one phenotype with different genes.* Curr Opin Neurol. 2000; 13:511-517.

Zhang S, Londhe P, Zhang M, Davie JK. *Transcriptional analysis of the titin cap gene.* Mol Genet Genomics. 2011 Mar; 285(3):261-72. Epub 2011 Feb 9.