

Mestrado de Biologia Humana da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Dissertação

# Rastreio e diagnóstico genético molecular da doença de Erb nas distrofias musculares das cinturas

Alberto Augusto Martins de Castro Oliveira

PROGRAMA PRAXIS XXI / FCT

Porto /1999

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Dissertação de candidatura ao grau de mestre em Biologia Humana apresentada à  
Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

# Rastreo e diagnóstico genético molecular da doença de Erb nas distrofias musculares das cinturas

Alberto Augusto Martins de Castro Oliveira

Licenciado em Medicina pelo Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da  
Universidade do Porto

Dissertação realizada sob supervisão da Dra. Maria do Rosário dos Santos, Chefe do  
Serviço de Genética Molecular do Instituto de Genética Médica Jacinto de Magalhães

Porto, 1999

Artigo 48º, § 3 – A Faculdade de Medicina não responde pelas teorias expendidas na dissertação  
(regulamento da Faculdade de Medicina do Porto –Decreto nº19337, de 29 de Janeiro de 1931)

# Índice

Índice.....	3
Resumo.....	4
Prefácio.....	5
Abreviaturas, acrónimos e neologismos.....	6
Introdução.....	7
Procedimento Experimental.....	18
Resultados .....	20
Rastreio e diagnóstico genético molecular de miocalpainopatias: mutação 60ΔA.....	21
Discussão.....	22
Conclusão.....	29
Referências.....	32

## Resumo

A doença de Erb, ou DMC 2A, é uma distrofia muscular das cinturas, (DMC ). O diagnóstico tem dependido do recurso à Genética Molecular porque o quadro clínico e subsequentes exames auxiliares de diagnóstico não eram suficientes para discriminar de outras formas primárias de DMC.

Este trabalho consistiu no rastreio de doentes afectados de DMC, previamente sujeitos a electromiografia e biópsia muscular, pelo método de electroforese em placa de polimorfismos conformacionais de cadeia simples, seguido do diagnóstico molecular da mutação da miocalpaína, por sequenciação automática pelo método de didesoxiterminadores fluorescentes, para detecção da doença de Erb.

A definição nosológica de doença de Erb foi estabelecida mediante localização do gene por desequilíbrio de ligação e identificação do gene por isolamento posicional.

A fisiopatologia encontra-se em fase de investigação. A descoberta recente de apoptose mionuclear com acumulação de  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  vem possibilitar o rastreio e provavelmente o diagnóstico nosológico a nível histopatológico.

A definição dos modos peculiares de maturação das linhagens miogénicas, pela evolução de expressão de isoformas moleculares do músculo esquelético, poderão explicar as características crono-topológicas da doença i.e., o condicionalismo de expressão patológica da deficiência de miocalpaína, ou calpaína 3.

O conhecimento molecular da fisiologia, maturação e alterações musculares face a factores externos manipuláveis, juntamente com a suplecção da deficiência por evolução de tecnologia de reparação genética são imprescindíveis à explicação e tratamento correcto da doença de Erb.

## Prefácio

O rastreio e diagnóstico genético molecular têm sido essenciais ao diagnóstico da doença de Erb mercê do pleomorfismo intrínseco e mimetização clínica por outras entidades nosológicas primárias e secundárias de distrofia muscular das cinturas incapacitarem a discriminação clínica. A necessidade de diagnóstico da etiologia molecular na DMC neste momento é importante sobretudo para o aconselhamento genético já que o tratamento é sintomático e a evolução clínica é relativamente variável.

A crescente solicitação da Genética Molecular para diagnóstico molecular de diversas patologias entre as quais a DMC, impõe que se disponha de metodologias capazes de identificar mutações desconhecidas de modo eficiente e expedito.

A doença de Erb independentemente de na prática, até ao momento, ser suspeita nas biópsias de DMC normais para a distrofina e sarcoglicanos, deixando outras patologias por excluir, tem a particularidade de apresentar uma distribuição aleatória das mutações e ter cerca de 100 mutações diferentes descritas o que obriga necessariamente à utilização de métodos de rastreio, porque não há focos típicos que permitam uma pesquisa dirigida segura.

Este trabalho surge no sentido de avaliar o desempenho da articulação da metodologia de rastreio por PCCS manual com a sequenciação automática, para diagnóstico de mutações imprevisíveis na miocalpaína, além de ter de discriminar entre outras etiologias de DMC.

Para a realização deste trabalho e respectivo mestrado onde ele se inclui, contribuíram diversas pessoas e instituições às quais apresento o meu apreço.

À Comissão de Coordenação do Mestrado: Doutora Maria Conceição Magalhães, Doutora Maria João Mascarenhas Saraiva e Doutor José Manuel Castro Lopes e a todos os professores que se disponibilizaram a participar no domínio curricular do mestrado por partilharem com os mestrandos o seu saber, dedicação e simpatia, proporcionando conhecer melhor diversas áreas da Ciência e Tecnologia e o desafio da busca do conhecimento e soluções no domínio biológico.

À Doutora Maria do Rosário dos Santos por me ter possibilitado, proposto, orientado e apoiado na realização deste trabalho.

A todos com quem convivi no IGMJM e no Serviço de Genética Molecular e me iniciaram nos meandros laboratoriais da Genética Molecular em particular a Tca. Maria Emília Vieira, autora dos resultados X1, a Dra. Carina Rodrigues e a Dra. Paula Jorge.

Aos meus colegas de mestrado pela suas contribuições na minha expansão do conhecimento de moto próprio das vicissitudes e potencialidades humanas.

À minha família e amigos pela disponibilidade, simpatia e boa vontade com que me acolhem e apoiam.

As pessoas que colocam no que fazem no seu dia a dia o sentido de contribuição para uma sociedade melhor.

Aos doentes, pelo incentivo e exemplo estóico com que enfrentam o sofrimento com a crença em “milagres da Ciência”.

À Faculdade de Medicina da Universidade do Porto pela criação e implementação de programas de enriquecimento científico-tecnológico.

Ao Instituto de Genética Médica Jacinto de Magalhães por me proporcionar os requisitos e disponibilidade necessários à elaboração da dissertação.

Ao Ministério da Ciência e Tecnologia, através da Fundação para a Ciência e Tecnologia e Programa PRAXIS XXI, por me patrocinar o mestrado através da bolsa PRAXIS XXI / BM / 6736 / 95.

Muito obrigado.

# Abreviaturas, acrónimos e neologismos

ADN: ácido desoxirribonucleico  
ADNc: ADN complementar do ARNm  
adsorção: “blot”  
aloga: “nonsense”  
ARNm: ácido ribonucleico mensageiro  
CAL: cromossoma artificial de levedura: “YAC”  
calpaínas gerais: “ubiquitous calpains”: “calpains I and II”  
CEPH: Centro de Estudos do Polimorfismo Humano  
CFC: creatina fosfocinase: “CPK”  
CLMcinase: cadeia leve da miosina cinase  
CPMs: cadeias pesadas de miosina: “MHC”  
cM: centimorgan  
contíguo: “contig”  
disfásica: “frameshift”  
disloga: “missense”  
DMC: distrofia muscular das cinturas: “LGMD”  
DMC 2A: DMC por mutação da miocalpaína  
doença de Erb: DMC 2A: “LGMD 2A”  
e.g.: por exemplo  
ECG: electrocardiograma  
EcoCG: ecocardiograma  
EMG: electromiografia  
EPCCS: electroforese de PCCS  
exclusão: excisão: “deletion”  
facilitador: “enhancer”  
FN-kB: “NF-kB”  
FCI-I: factor de crescimento tipo insulínico-1: “IGF-I”  
FNT $\alpha$ : factor de necrose tumoral  $\alpha$ : “TNF $\alpha$ ”  
focos típicos: “hot spots”  
hibridação: “hybridization”  
HDP: heterodúplex  
homóloga: “synonymous”, “silent”  
i.e.: isto é  
IGMJM: Instituto de Genética Médica Jacinto de Magalhães  
IL-6: interleucina-6  
iniciador: “primer”  
isolamento posicional: “positional cloning”  
juncional: “splicing”  
Kn: quilonucleótido: “Kb”  
ligação: “annealing”  
LPS: lipopolissacárido  
microplaca: “microchip”  
microfoco adsorção: “microchip dot blot”  
miocalpaína: calpaína 3: “CANP3”  
Mn: meganucleótido: “Mb”  
n: nucleótido  
P-ddF: perfil-didesoxifluorescente: “F-ddF”: “dideoxy fingerprinting”  
PCCS: polimorfismo conformacional de cadeia simples: “SSCP”  
pn: pares de nucleótidos: “bp”  
r: resíduo de aminoácido  
RCP: reacção em cadeia da polimerase: “PCR”  
reprodução: “amplification”  
sarcocalpaína: “CANP3”  
selo gamético: “imprinting”  
SMS: sequência marcadora de sítio: “site tagging sequence”  
TAC: tomografia axial computadorizada  
“TUNEL”: “TdT mediated dUTP nick end-labeling”  
UT: unidade de transcrição

# Introdução

A doença de Erb, DMC 2A (Bushby, K., Beckmann, J., 1995), é paradigmática da controvérsia epistemológica, gerada pela evolução nosológica baseada no empirismo clínico, resolvida pela intervenção de tecnologias desenvolvidas na investigação biológica molecular as quais prestaram um contributo precioso à definição, diagnóstico, e futuramente, espera-se, ao conhecimento da fisiopatologia e resolução terapêutica.

Trata-se de uma doença pleomórfica, de início, apresentação e curso variável (Bushby, K., Beckmann, J., 1995; Fardeau, M. et al., 1996; Richard, I. et al., 1997; Urtasun, M. et al., 1998; Passos-Bueno, M. et al., 1999; Chou, F. et al., 1999) onde é frequente a mimetização por outras nosologias tornando o diagnóstico clínico inseguro.

Há grande variabilidade interfamiliar na idade de início e na gravidade da evolução. Não há correlação segura entre o tipo de mutação e o início dos sintomas ou o ritmo de agravamento, ou entre a precocidade da instalação e a rapidez da evolução. Embora tenham sido propostas correlações nos primeiros estudos na Ilha da Reunião (Fardeau, M. et al., 1996a), em analogia com as distrofias de Duchenne, Becker e adalinopatias (Bushby, K. e Beckmann, J., 1995), não viriam a ser confirmadas em estudos subsequentes noutras populações (Fardeau, M. et al., 1996b; Urtasun, M. et al., 1998).

A esperança média de vida é próxima da normalidade e o falecimento predomina na meia idade. A motivação de viver, a satisfação das suas necessidades básicas e um acompanhamento terapêutico adequado são os principais determinantes da sobrevivência.

Os primeiros sintomas e sinais têm-se manifestado desde os 3 até aos 40 anos, mas o mais típico é o intervalo dos 6 aos 20 anos (Fardeau, M. et al., 1996a; Urtasun, M. et al., 1998) com pico entre os 8 e 12 anos.

As cinturas pélvica e escapular podem ser atingidas simultaneamente ou iniciar-se por uma delas, sendo mais frequente pela pélvica, com atingimento da outra 3 a 5 anos depois.

Nas fases iniciais, I a III da escala de Gardner-Medwin e Walton (1974), os indivíduos afectados começam por se sentir incapazes de acompanhar a resistência dos normais ao esforço físico. Ficam progressivamente com dificuldade em correr, são incapazes de se levantar sem apoio, apresentam “marcha de pato” e sofrem quedas amiúde.

O atingimento muscular inicia-se pelos músculos das cinturas, abdominais e proximais dos membros. Evidencia simetria e selectividade por certos grupos musculares. Afecta por exemplo intensamente os grandes glúteos, adutores e músculos posteriores da coxa, enquanto o quadrícipete se mantém incólume em tamanho e força durante muito mais tempo. Os gémeos podem apresentar contractura, obrigando a marcha em “bicos dos pés”.

Antes do indivíduo se queixar são já patentes atrofia do grande dorsal, grande dentado (sinal da escápula alada), grande peitoral e romboide enquanto que o supraespinhoso, infraespinhoso, triceps braquial e músculos distais permanecem intactos. Os músculos abdominais estão enfraquecidos acompanhando-se de ligeira hiperlordose.

A progressão lenta mas inexorável da perda muscular acaba por atingir o quadrícipete e os músculos da perna, com incapacidade de subir escadas, fase IV, de se levantar de uma cadeira, fase V, e de caminhar sózinho, fase VI. Nos membros superiores o deltóide, o

tríceps braquial e os músculos do antebraço estão atrofiados e com pouca força, limitando a mobilidade do membro superior.

As contracturas dos músculos flexores da anca, joelho e cotovelo marcam a fase terminal com perda total de capacidade deambulatoria, fase VII, 10 a 20 anos após o início dos sintomas. Em 50% dos casos do estudo da Ilha da Reunião esta fase ocorria cerca dos 20 anos (Fardeau, M. et al., 1996a). A hiperlordose é bastante acentuada podendo ocorrer cifoescoliose.

Durante esta evolução distrófica os músculos faciais, cervicais, velofaríngeos, oculares, supraespinhoso, infraespinhoso e músculos próprios da mão não são atingidos.

Os níveis séricos da creatina fosfoquinase reflectem o nível de actividade degradativa nos músculos em sofrimento, estando elevados nas fases iniciais e subnormais nas fases terminais (Fardeau, M. et al., 1996a) em paralelo com apoptose mionuclear (Baghdiguian, S. et al., 1999).

A função respiratória pode estar afectada com redução da capacidade vital para 30 ou 50% nas fases V/VII (Fardeau, M. et al., 1996a) e quando normal há geralmente redução na capacidade expiratória máxima demonstrando enfraquecimento dos músculos torácicos, diafragmáticos e abdominais (Urtasun, M. et al., 1998).

O atingimento cardíaco não é característico, correlacionando-se a doença com ECG e EcoCG normais.

A electromiografia apresenta um padrão miogénico de pequenos potenciais polifásicos compatível com um processo miopático, sem envolvimento neuropático, com velocidade de condução motora e sensitiva normal.

A avaliação psicométrica não revela diferenças para o indivíduo normal (Fardeau, M. et al., 1996 a,b).

A TAC revela o grau e selectividade de atingimento de grupos musculares e.g. adutores da coxa, semimembranoso, semitendinoso e bíceps crural.

A biópsia muscular exhibe arredondamento do contorno poligonal, redução do diâmetro das fibras musculares com empobrecimento de fibras tipo II, hipermarcação de enzimas oxidativas nas fibras tipo I, centralização de núcleos, necrose, fasciculação, fibras em regeneração, aumento de colagénio no endomísio, e normalidade enzimática do metabolismo energético. A doença pode apresentar-se como uma miopatia inflamatória necrosante grave, simulando a polimiosite (Richard, I. et al., 1997). A nível ultraestrutural há desarranjo miofibrilar e as placas motoras são normais. A imunocitoquímica é normal para a distrofina, utrofina e sarcoglicanos (Fardeau, M. et al., 1996a).

A marcação terminal de incisões do genoma, pela terminal desoxinucleotidil-transferase, usando a desoxiuridiniltrifosfo-fluoresceína, "TUNEL", permite detectar a fragmentação genómica nos mionúcleos apoptóticos. A co-marcação com anticorpos fluorescentes para o Ikb $\alpha$  nos mionúcleos (Baghdiguian, S. et al., 1999), própria da doença de Erb, vem provavelmente permitir o diagnóstico anatomopatológico reservando a Genética Molecular para confirmação e caracterização nucleotídica da mutação, assim como o estudo de segregação familiar e préssintomático.

O conceito seminal de doença muscular degenerativa hereditária, demarcada da neuropatologia, foi consolidado em 1891 (Erb, W., 1891) após em 1884 ser descrita a distrofia escápulo-humeral atrofica juvenil (Erb, W., 1884).

A epistemologia da DMC progrediu pela organização das distrofias musculares em 7 grupos (Batten, F., 1909), diferenciação de 3 grupos nas distrofias não miotónicas (Bell, J., 1943) e definição de DMC (Walton, J., Natrass, F., 1954).

A legitimidade da DMC como entidade nosológica acabou por ser posta em causa com o aperfeiçoamento da Electrofisiologia e Histopatologia ao revelar que atrofia muscular espinhais, distrofinopatias, miopatias congénitas, endócrinas, metabólicas e inflamatórias tinham sido diagnosticadas como DMC (Brooke, H., 1977; Munsat, T., 1977; Bradley, W., 1979; Arikawa, E. et al., 1991). O aparecimento de formas clínicas autossómicas dominantes (De Coster, W. et al. 1974; Chutkow, J. et al., 1986; Gilchrist, J. et al., 1988) veio também abalar a definição autossómica recessiva de DMC (Walton, J., Natrass, F., 1954).

A aplicação da Genética Molecular a uma população endogâmica de famílias numerosas da Ilha da Reunião com o fenótipo de Erb permitiu cartografar por desequilíbrio de ligação, com marcadores polimórficos de fragmentos de restrição bi-alélicos, o locus genético em 15q (Beckmann, J. et al. 1991) e confirmar noutras populações (Young, K. et al., 1992; Passos-Bueno, M. et al., 1993) a validade da segregação do locus com a doença.

O conceito de DMC ressuscitou ao ser provado com fundamento genético que a doença de Erb constituía uma entidade nosológica genuína (van der Kooi, A. et al., 1994).

A exploração da DMC em diversas populações acabou por demonstrar que o gene do locus 15q não era o único gene associado. Havia heterogeneidade genética (Passos-Bueno, M. et al., 1993; Allamand, V. et al., 1995a).

A discriminação nosológica baseada na heterogeneidade genética da DMC conduziu à reformulação de DMC (Bushby, K. et al., 1995). O fenótipo de Erb definido na ilha da Reunião foi denominado DMC 2A.

Os locus de genes autossómicos recessivos progressivamente definidos por análise de ligação permitiram estabelecer uma associação similar com uma designação DMC e.g. 13q12 com DMC 2C (Ben Othman, K. et al., 1992), 2p12 com DMC 2B (Bashir, R. et al., 1994), 17q21 com DMC 2D (Roberds, S. et al., 1994), 4q12 com DMC 2E (Lim, L. et al., 1995; Bonnemann, C. et al., 1995), 5q33 com DMC 2F (Passos-Bueno, M. et al., 1996), 17q11 com DMC 2G (Moreira, E. et al., 1997), 9q31 com DMC 2H (Weiler, T. et al., 1998). O mesmo sucedeu com os locus de genes autossómicos dominantes e.g. 5q22 com DMC 1A (Speer, M. et al. 1992), 1q11 com DMC 1B (van der Kooi, A. et al., 1997), 3p25 com DMC 1C (Minetti, C. et al., 1998), 6q23 com DMC 1D (Messina, D. et al., 1997).

A mutação de um gene produz geralmente alterações nos organismos, que permitem definir um defeito molecular, o que facilita a identificação do gene. Na doença de Erb assim como em muitas doenças humanas, a molécula alterada por mutação do gene era desconhecida. A informação limitada ao fenótipo clínico, constituiu um óbice à metodologia habitual de identificação e localização genética. A ausência de um modelo animal homólogo capaz de fornecer sondas, ou de um fenótipo específico conhecido a nível fisiopatológico, citogenético ou molecular que permitisse relacionar com o gene etiológico obrigou, como único recurso, ao método do isolamento posicional.

A genotipagem de marcadores microssatélites no cromossoma 15 definiu 2 marcadores cercando o locus da DMC 2A espaçados de 7 cM. Com estes microssatélites foi feito o rastreio de bancos de cromossomas artificiais de leveduras (CALs) do CEPH. Os CALs seleccionados permitiram definir um intervalo citogenético de 15q15.1-21.1 (Fougerousse,

F. et al. 1994).

A elaboração de um contíguo de CALs abrangendo cerca de 12 meganucleótido (Mn) com um mínimo de 10 CALs permitiu a obtenção do mapa físico deste intervalo com uma resolução de 50 Kn com sequências marcadoras de sítio (SMSs) e 300 Kn com microssatélites (Fougerousse, F. et al. 1994). Esta construção permitiu definir novos microssatélites para genotipagem em grandes genealogias consanguíneas afectadas pela doença de Erb de diversas origens geográficas. A identificação de casos de recombinação permitiu reduzir o intervalo para 1cM, cerca de 4Mn. Dados de desequilíbrio de ligação indicaram o CAL 774G4 reduzindo o intervalo a 1,6 Mn (Allamand, V. et al., 1995b). Este CAL foi depois organizado em contíguo de cosmídeos por rastreio de SMSs e hibridação de produtos da reacção em cadeia da polimerase (RCP) inter-Alu.

A identificação do gene procedeu pela técnica da selecção directa de ADNc (Tagle, A. et al., 1993) com 3 CALs intersectadores do locus em 2 bancos de ADNc muscular, um fetal e outro adulto. Cada CAL foi digerido com Mbo, biotinilado, imobilizado em contas magnéticas cobertas de estreptavidina e hibridado separadamente com insertos-RCP de bancos de ADNc de músculo fetal e adulto. Os ADNc capturados foram reproduzidos por RCP e sujeitos a novo ciclo de selecção directa para enriquecimento em produtos específicos. Os ADNc capturados foram reproduzidos (RCP), isolando-se 171 fragmentos de ADNc correspondentes a 17 unidades de transcrição (UT) que foram caracterizadas quanto à sequência, posição (no CAL e contíguo de cosmídeos) e padrão de expressão, constituindo um mapa de transcrição (Chiannilkulchai, N. et al., 1995). Das UTs com transcrição específica no músculo, confirmada por hibridação Northern, o gene da calpaína 3, miocalpaína, localizado em 15q15.2, era um bom candidato posicional e funcional. Este gene acabou por ser validado pela identificação de mutações co-segregantes com a doença em famílias com o fenótipo de Erb (Richard, I. et al., 1995).

As características epidemiológicas das famílias afectadas da doença de Erb na Ilha da Reunião faziam pressupor um efeito fundador.

A hipótese de efeito fundador (De Ubeda, 1992; Fardeau, M. et al., 1996a) na Ilha da Reunião foi arrasada pelo isolamento de 6 tipos de mutação distintos (Richard, I. et al., 1995). Ao contrário do que era esperado, embora já tivesse sido previsto pela análise de linhagens interrelacionadas, o isolamento de 6 haplótipos portadores independentes (Allamand, V. et al., 1995), reflectia a co-segregação de mutações múltiplas responsáveis pela miopatia na população. Contudo para a mutação predominante nos Amish, na Ilha da Reunião e em Guipúzcoa verificou-se um efeito fundador local próprio, inclusivé estendido a outros locais geográficos, patente na haplotipagem, assim como o inverso i.e. casos de recorrência independente da mesma mutação (Allamand, V. et al., 1995; Richard, I. et al., 1995 e 1999; Urtasun, M. et al., 1998).

Para explicar o paradoxo de uma população pequena com tantas mutações foi proposto o modelo digénico (Richard, I. et al., 1995) que foi desacreditado (Pratt, V. et al., 1997) e abandonado (Richard, I. et al., 1997) com algumas reticências. O fenómeno de múltiplas mutações numa pequena área geográfica não é raro acontecendo com outras patologias (Bach, G. et al., 1994; Zlotogora, J. et al., 1996).

A mutação do gene da miocalpaína é a determinante etiológica da doença de Erb (Chiannilkulchai, N. et al., 1995; Richard, I. et al., 1995).

Com locus em 15q15.2 (Beckmann, J. et al., 1996), o gene abrange cerca de 40 Kn, com 24 exões, totalizando 2466 pn (Ohno, S. et al., 1989; Richard, I. et al., 1995).

O promotor apresenta uma sequência tipo Kozak (Kozak, M. et al., 1984), caixas CAAT, TATA (Bucher, P., 1990), GC (Dyran, W. e Tjian, R., 1983), CArG (Minty, A., Kedes, L., 1986), E

(Blackwell, T., Weintraube, H., 1990) e um sítio de ligação de “MEF-2 “ (Gosset, L. et al., 1989). A cauda tem 2 sinais de poliadenilação e um grupo GT intermédio.

A ontogénese condiciona a expressão do gene ao músculo estriado esquelético. A expressão produz transcritos de 3,5 Kb (Chiannikulchai, N. et al., 1995) com níveis 10 vezes acima do ARNm das calpaínas gerais (Sorimachi, H. et al., 1995), traduzidos em enzimas de 94 kD. Não é um gene com selo gamético (Chou, F. et al., 1999).

A proteína e o gene, mesmo nas regiões não traduzidas, mostram um grau elevado de conservação entre espécies mamíferas acusando uma elevada selectividade filogenética (Richard, I. et al., 1995).

A miocalpaína é uma tiol-protease neutra, com 821r aminoácidos, da superfamília das calpaínas, com um domínio cisteína protease, representado nos mais diversos níveis filogenéticos e distinto dos de outras superfamílias cisteína-protease e.g. papaína, catépsina, actinidina e caspase (Berti, P., Storer, A., 1995; Sorimachi, H. et al., 1997; Wang, K. et al., 1998).

A superfamília das calpaínas em níveis filogeneticamente inferiores tem sido relacionada com funções de adaptação ao meio e.g. a adaptação à transição de meio ácido para alcalino pela intervenção da protease PalB no *Aspergillus nidulans* (Tilbum, J. et al., 1995) e com a ontogénese e.g. a determinação do sexo hermafrodita no *Caenorhabditis elegans* pela participação da protease Tra-3 (Hodgkin, J., 1986).

A miocalpaína é constituída pelo domínio I, provável regulador da actividade enzimática (Imajoh, S. et al., 1986) com a sequência única NS (1-61r), o domínio II, o centro activo da enzima, com a sequência única IS1 (267-329r, exão 6) necessária à autólise, o domínio III, de função desconhecida com um sinal de translocação nuclear e de ligação à titina (Sorimachi, H. et al., 1995) na sequência única IS2 (595-600 r), e o domínio IV com afinidade para o  $Ca^{2+}$  (Sorimachi, H. et al., 1989).

A miocalpaína forma um homodímero. Cada monómero tem uma estrutura base semelhante à subunidade maior das calpaínas gerais, mas com 3 regiões específicas extra, NS, IS1 e IS2.

A actividade proteolítica não depende da presença de  $Ca^{2+}$ , este apenas induzirá um rearranjo dos monómeros activando-a (Kinbara, K. et al., 1998). A miocalpaína não cliva calpaínas, titina e maioria das proteínas endógenas. O I $\kappa$ B $\alpha$  poderá ser um substrato (Baghdigian, S. et al., 1999), outros substratos potenciais seriam e.g. miotonina proteína cinase, fodrina (Sorimachi, H. et al., 1995) ou o receptor da rianodina (Shevchenko, S. et al., 1998).

A autólise ocorre por cisão na região IS1 (Kinbara, K. et al., 1998), na NS entre 30-31r e no exão 10 entre 412-413r (Federici, C. et al., 1999) e é independente da proteólise (Ono, Y. et al., 1998).

Os inibidores das calpaínas gerais não tem efeito na miocalpaína (Sorimachi, H. et al., 1993).

A função da miocalpaína ainda se encontra sob investigação. Aparece no músculo estriado esquelético do embrião a partir da oitava semana (Fougerousse, F. et al., 1998)

A miocalpaína opera na fase anabólica da fisiologia muscular de tal modo que a activação do catabolismo muscular, via FN-kB (Li, Y. et al., 1998), desliga a transcrição do gene. O aumento de expressão de IL-6, indutora de mioproteólise, em ratos transgénicos aumenta o ARNm das catépsinas e ubiquitina e diminui o da miocalpaína, levando à atrofia muscular (Tsujinaka, T. et al., 1996).

A função da miocalpaína é imprescindível, pelo menos em determinados tipos de miofibras, à manutenção da massa muscular. A diferenciação de mioblastos do rato é acompanhada do aumento de ARNm da miocalpaína. O bloqueio da expressão do gene

altera os miotubos diferenciados e a miofibrilogénese causando instabilidade miofibrilar e perda de integridade da linha-Z (Poussard, S. et al., 1996).

Outras situações ligadas a instabilidade miofibrilar são e.g. a inibição da transglutaminase (Khang, S. et al., 1995), os ésteres de forbol (Choi, J. et al., 1991; Lin, Z. et al., 1989), o bloqueio dos canais de  $\text{Na}^+$  (Crisona, N. et al., 1983), o bloqueio dos receptores da rianodina e da CLMcinase (Ferrari, M. et al., 1998), ou a dieta hipoproteica (Oumi, M. et al., 1999) sugerindo possíveis agonismos e antagonismos com a função da miocalpaína.

A miocalpaína dissociaria o complexo I $\kappa$ B $\alpha$  / FN-kB e manteria normais os níveis de I $\kappa$ B $\alpha$  por degradação (Miyamoto, S. et al., 1994), permitindo a sinalização via FN-kB (Baghdiguian, S. et al., 1999).

O bloqueio da via por falta de dissociação do complexo ou por sequestro de FN-kB por excesso de I $\kappa$ B $\alpha$  activariam a apoptose (van Antwerp, D. et al., 1996; Mayo, M. et al., 1997; Baghdiguian, S. et al., 1999).

A apoptose é um sinal da doença de Erb. Ausente no feto de 13 semanas, atinge o auge nas fases iniciais da doença. A percentagem de apoptose apresenta uma evolução paralela ao nível de CFC e inversa à gravidade clínica. A presença de I $\kappa$ B $\alpha$  nos mionúcleos apoptóticos constitui provavelmente um sinal patognomónico da doença de Erb (Baghdiguian, S. et al., 1999) de elevado potencial para o rastreio da doença de Erb nas DMCs.

Na doença de Erb o índice de regeneração avaliado pela percentagem de fibras musculares com expressão de formas pré-natais de CPMs embora superior ao normal é apenas 10% da média encontrada na D.M.Duchenne. Esta inferioridade regenerativa é atribuída ao declínio de células satélite por apoptose (Baghdiguian, S. et al., 1999), mas poderá também significar uma aceleração do desgaste do potencial cumulativo de proliferação das células satélites na regeneração muscular por apoptose intensa dos mionúcleos (Schultz, E., Jaryszak, D., 1985).

A apoptose afecta 0,4% dos mionúcleos das fibras musculares de Erb e apenas 0,007% nas distrofinopatias (Sandri, M. et al., 1998) e sarcoglicanopatias (Hack, A. et al., 1998), a maioria em núcleos exteriores à miofibrila, não estando descrita na disferlinopatia (Bashir, R et al., 1998), é invulgar na maioria das distrofias musculares (Olive, M. et al., 1997; Tews, D. et al., 1997, Aug.). No entanto basta ocorrer desnervação para ocorrer apoptose (Tews, D. et al., 1997, Dec.).

Nas miofibras afectadas por deficiência de miocalpaína coexistem mionúcleos normais com outros apoptóticos, agrupados. Os mionúcleos apoptóticos e raros pré-apoptóticos com I $\kappa$ B $\alpha$  na doença de Erb talvez sejam patognomónicos, já que o I $\kappa$ B $\alpha$  não é detectável nos mionúcleos apoptóticos das outras miodistrofias referidas.

A deficiência funcional de miocalpaína reflecte-se num excesso de I $\kappa$ B $\alpha$  no sarcoplasma e no núcleo. O FN-kB desaparece do núcleo e surge na região subsarcolémica, perinuclear. O decurso apoptótico manifesta-se e.g. por activação da calcineurina, calpaínas, “BAD”, “Bax” citoplasmáticos (Wang, H. et al., 1999; Wood, E. et al., 1998) e indução de transição de permeabilidade mitocondrial (Marzo, I. et al., 1998) por  $\text{Ca}^{2+}$  (Chakaborti, T. et al., 1999; Kass, G. et al., 1999;), ceramida e espécies reactivas de oxigénio e azoto (Quillet-Mary, A. et al., 1997; Katsuyama, K. et al., 1998; Brown, G., 1999; Murphy, M., 1999) com inactivação de “Bcl-xL” e “Bcl-2” e libertação de citocromo-c, caspase 9, complexação de citocromo-c com “APAF-1” e activação de caspases e endonucleases (Krajewski, S. et al., 1999; Eskes, R. et al., 1998; Yang, J. et al., 1997) resultando em sinais de apoptose e.g. escadagem do ADN e translocação da fosfatidilserina (Chien, M. et al., 1999).

Normalmente o FN-kB é detectável no núcleo e no sarcoplasma ligado ao IκBα. A miocalpaína é detectável no núcleo e no sarcómero ligada à titina (Sorimachi, H. et al., 1995; Kinbara, K. et al., 1997).

O IκBα é fosforilado por uma cinase activada por uma via de sinalização (Claudio, E. et al., 1996; Schouten, G. et al., 1997; Tanaka, M. et al., 1999) e clivado por uma protease para libertar o FN-kB (Lin, Y. et al., 1995; Griscavage, J. et al., 1996). O FN-kB é deslocado para o núcleo onde activa a transcrição de genes específicos. O IκBα recém-sintetizado é capaz de repressão pósindutiva deslocando o FN-kB nuclear para o sarcoplasma (Arenzana-Seisdedos, F. et al., 1997).

A hipótese da miocalpaína clivar o IκBα (Myamoto, S. et al., 1994; Baghdiguian, S. et al., 1999) levanta algumas objecções. Factores como e.g. FNTα, IL-6, LPS induzem caquexia muscular (Kawamura, I. et al., 1999; Li, Y., 1998) e bloqueiam o efeito anabólico de FCI-1 (Frost, R. et al., 1997) através do FN-kB. Se a miocalpaína tiver por função libertar o FN-kB e baixar os níveis de IκBα vai favorecer a persistência nuclear e aumento do nível de FN-kB promovendo a caquexia e a citotoxicidade (Claudio, E. et al., 1996; Frost, R. et al., 1997), o que nega a correlação da miocalpaína com a conservação muscular (Richard, I. et al., 1995; Ueyama, H. et al., 1998) e a diminuição do respectivo ARNm na presença de IL-6 (Tsujiyama, T. et al., 1996).

Como o sistema das calpaínas gerais e da ubiquitina-proteassoma se mantêm funcionais e têm potencialidade de libertar o FN-kB do IκBα fosforilado (Han, Y. et al., 1999) também não faz sentido que a miocalpaína seja necessária à cisão do complexo IκBα / FN-kB). A eventual necessidade de miocalpaína para clivar o complexo IκBα / FN-kB se a fibra muscular por programação ontogénica ou efeito epigenético e.g. maturação hormonal, passar a produzir uma isoforma resistente à cisão ou níveis superiores de expressão IκBα ou por alterações cinéticas de processamento, colidiria de novo com a objecção de falta de correlação da função da miocalpaína com a activação de FN-kB e indução de atrofia muscular (Ueyama, H. et al., 1998). Logo a função da miocalpaína deverá reflectir-se no controlo da sinalização via FN-kB, reduzindo os níveis e a persistência do FN-kB opondo-se à transição para a fase catabólica e indução de apoptose. A subida de FN-kB desencadearia a transcrição de genes como IκBα e “A20” produzindo uma retroacção oposta à activação.

Os níveis elevados de IκBα também contrariam a hipótese de bloqueio de dissociação do complexo IκBα / FN-kB por ocorrerem quando há activação transcricional de genes FN-kB dependentes (Brown, K. et al., 1993; Sun, S. et al., 1993). A persistência de IκBα elevado assinalaria uma disfunção de mecanismos reguladores dos níveis IκBα e FN-kB e.g. compartimentação (Arenzana-Seisdedos, F. et al., 1995, 1997), síntese (Weil, R. et al., 1997; Krappman, D. et al., 1997), processamento (Baldassarre, F. et al., 1995), degradação (Suyang, H. et al., 1996) ou estimulação (Pahl, H. et al., 1996; Guo, Q. et al., 1998) revertível por miocalpaína funcional.

O aumento reactivo de IκBα levaria ao bloqueio total da sinalização via FN-kB impedindo a manutenção da função antiapoptótica (Stehlik, C. et al., 1998; Wang, C. et al., 1998; Zhi-Lang, C. et al., 1997).

Existe uma multiplicidade de heterodímeros FN-kB (Beg, A. et al., 1994) e de isoformas IκB (Whiteside, S. et al., 1997; Baumann, Bernd et al., 1998) responsáveis por comportamentos diversos e mesmo antagónicos (Yi, A. et al., 1998) no sistema IκB/FN-kB (May, M. et al., 1997), o que dificulta a interpretação da desregulação na deficiência da miocalpaína.

Há uma certa analogia com a depressão prolongada de FN-kB, desregulação do  $Ca^{2+}$ , pressão oxidativa e disfunção mitocondrial nos mutantes pré-senilina-1, resgatada pela reposição da isoforma, “sAPP $\alpha$ ”, derivada da proteína precursora amiloide  $\alpha$ -secretase (Guo, Q. et al., 1998; De Strooper, B. et al., 1998), salientando o mecanismo regulador do processamento de proteínas a nível do retículo endoplasmático (Pahl, H. et al., 1996, 1997, 1999; Kretz-Remy, C. et al., 1998) e tráfego para o aparelho de Golgi (Lin, Z. et al., 1998) na estimulação do FN-kB. O efeito da activação vai depender de diversos factores podendo ou não induzir a apoptose (Mann, D., 1996; Lin, K. et al., 1998; Lin, B et al., 1999; Webster, G. et al., 1999; Teixeira, E. et al., 1999; Grumont, R. et al. 1999). A activação do FN-kB estimula a produção e.g. de I $\kappa$ B $\alpha$  e  $\beta$  (Krappman, D. et al., 1997), de “c-IAP1 e 2, TRAF 1 e 2” (Wang, c. et al., 1998) antiapoptóticos, de “A20” que reprime a activação do FN-kB (Ferran, C. et al., 1998), de FNT $\alpha$  que deprime via ceramidase (Oral, H. et al., 1997), tal como a tiol-protease p94, com imunoreactividade cruzada com a miocalpaína, via receptores da rianodina (Shevchenko, S. et al., 1998), as correntes de  $Ca^{2+}$  (Yokoyama, T. et al., 1993; 1997) envolvidas no reforço intrínseco (Dolmetsch, R. et al., 1998) ou sinérgico com espécies oxidantes (Sen, C. et al., 1996) da estimulação do FN-kB, revelando a complexidade potencial dos mecanismos envolvidos, em contraste com as conclusões algo controversas e imediatistas do estudo da interacção da miocalpaína com o sistema I $\kappa$ B $\alpha$ /FN-kB (Baghdiguian, S. et al., 1999), implicando inactividade do sistema ubiquitina-proteassoma e das calpaínas gerais e necessidade de miocalpaína para o funcionamento do sistema I $\kappa$ B $\alpha$ /FN-kB, a qual se encontra deprimida quando este sistema está estimulado (Tsujiyama, T. et al., 1996). A função processadora da família das calpaínas aliada à fase anabólica da correlação funcional dos níveis elevados da miocalpaína faz suspeitar da intervenção dum mecanismo análogo ao de desregulação retículo endoplasmático em que a perturbação do tráfego de proteínas induz alterações similares às que ocorrem e.g. na perda de  $Ca^{2+}$  pelo retículo endoplasmático, ou bloqueio da N-glicosilação, com produção de espécies reactivas de oxigénio pelas oxidases, activação de “Irep” com transcrição de genes “GADD” dependentes e activação de “PERK” e “PKR” com bloqueio da tradução por fosforilação de “eIF2 $\alpha$ ”, as quais seriam só por si responsáveis pela apoptose (Kaufman, R., 1999), embora o FN-kB que aumenta e.g. por efeito da “PKR” possa também contribuir (Gil, J. et al., 1999) e.g. pela indução do ligando “Fas” (Teixeira, E. et al., 1999), teria no entanto nesta situação um efeito protector contra a apoptose (Guo, Q. et al., 1998; Kaufman, R., 1999). A indução de proteínas companheiras envolvidas na maturação de proteínas no retículo endoplasmático, via “Irep”, coarcta o efeito deletério de agentes apoptóticos (Liu, H. et al., 1997; Guo, Q. et al. 1998 Mar; Kaufman, R., 1999) possivelmente por bloqueio da “Irep”, “PERK” e “PKR”.

A necrose frequentemente descrita nas biópsias é uma expressão alternativa da apoptose quando nos tecidos ocorrem níveis baixos de ATP (Halestrap, A., et al. 1998; Qian, T. et al., 1999).

A disfunção do retículo endoplasmático com activação da resposta de sobrecarga é admitida em diversas doenças e.g. fibrose cística, deficiência de  $\alpha$ 1-antitripsina, bócio hipotiroideo congénito e doença de Alzheimer (Kaufman, R., 1999). A miocalpaína sendo uma enzima processadora ligada à titina no sarcómero poderá de modo semelhante estar envolvida na maturação de uma isoforma de uma proteína do sarcómero, resultando a sua disfunção na activação patológica da “PKR”(Gil, J. et al., 1999), ou desregulação da homeostase do  $Ca^{2+}$ , e.g. via receptores da rianodina (Shevchenko, S. et al., 1998).

Seja qual for o mecanismo de intervenção da miocalpaína, ainda falta explicar a diferença de latência na deterioração da fibra muscular na disfunção da miocalpaína e a coexistência de grupos musculares que nunca são afectados.

A análise do modo da expressão do fenótipo implica a intervenção de factores que a condicionam, capazes de mascarar a deficiência de miocalpaína, período de latência ou préssintomático, ou evidenciá-la quando desactivados. Estes factores potencialmente ontogénicos e epigenéticos serão os principais responsáveis pela extrema variabilidade de latência e ritmo de evolução intra e interfamiliar, muito mais que o tipo de mutação (Fardeau, M. et al., 1996a,b; Urtasun, M. et al., 1998) ocorrido na miocalpaína.

O bloqueio do ARNm da miocalpaína do rato (Poussard, S. et al., 1996) provou uma dependência imediata da presença de miocalpaína para a estabilidade do sarcómero enquanto na doença de Erb há um período considerável (Fardeau, M. et al., 1996a; Urtasun, M. et al., 1998) de prescindibilidade da miocalpaína nos músculos afectados, com latências diferentes e variáveis antes de ela se tornar crucial para impedir a atrofia, em contraposição com outros músculos que permanecem inalterados, logo miocalpaína independentes.

O condicionalismo subjacente ao grau de dependência da miocalpaína para a manutenção muscular poderá ser explicado pela alteração da composição de isoformas moleculares (Silberstein, L. et al., 1986; Russell, S. et al., 1993) que se sucedem na maturação muscular (Soussi-Yanicostas, N. et al., 1990) alterando a fisiologia das miofibras por diferenças de linhagem miológica com programas ontogénicos distintos (Couly, G. et al., 1992), neste caso por substituição ou alteração de níveis de isoformas cuja formação defeituosa teria implicações na regulação do sistema I $\kappa$ B $\alpha$  / FN-kB e.g. via “PKR”.

Nos tipos de fibra muscular mais imaturos haverá prescindibilidade ou mecanismos supletivos da deficiência de miocalpaína. Uma alteração na regulação desses mecanismos, a expressão de uma isoforma de substrato resistente, uma alteração na cinética de processamento ou expressão de níveis sobressaturantes para o sistema supletivo, criariam um quadro fisiológico que requer intervenção específica da miocalpaína para suprir essa dependência, nas miofibras cujo programa peculiar de maturação, as sensibiliza à disfunção.

A síndrome da DMC comporta etiologias genéticas distintas com uma expressão fenotípica clínica pleomórfica e sobreponível, dificultando a discriminação clínica apesar de alguns detalhes indiciadores de um determinado tipo.

As sarcoglicanopatias (Ben Hamida, M. et al., 1983; Dubowitz, V. , 1980; Salih, M. et al., 1983; Zatz, M. et al., 1989; Passos-Bueno, M. et al., 1993), ao intervirem na disfunção do citoesqueleto podem apresentar algumas semelhanças com as distrofinopatias (Fardeau, M. et al., 1996b) manifestando-se por macroglossia, cardiopatia e hipertrofia dos gémeos. Embora predominem as formas de agravamento rápido (Passos-Bueno, M. et al. 1996), contudo também ocorrem formas de curso clínico suave o que associado a formas de Erb também de agravamento rápido (Passos-Bueno, M. et al. 1999) retira capacidade de destrição ao modo de evolução. A TAC ao demonstrar atrofia do quadricípete favorece o diagnóstico de sarcoglicanopatia (Eymard, B., 1997), enquanto que na doença de Erb demonstra atrofia dos adutores e flexores da coxa (Fardeau, M. et al., 1996a,b; Urtasun, M. et al., 1998).

A disferlinopatia, DMC 2B, afecta uma proteína sarcolémica (Anderson, L. et al., 1999). Nos casos conhecidos tem tido início na cintura pélvica e um curso mais suave que a doença de Erb, com atrofia dos gémeos e incapacidade de se pôr em “bicos dos pés” na maioria dos casos (Bushby, K., Beckmann, J., 1995; van der Kooi, A. et al., 1996; Passos-Bueno, M. et al., 1999).

Enquanto se aguarda que a colheita sistematizada em curso de informação clínica ajude a definir particularidades discriminadoras é de salientar que a TAC possa vir a ter esse papel ao determinar o grau e padrão exacto de atingimento muscular (Bushby, K., Beckmann,

J., 1995; Fardeau, M. et al., 1996; Urtasun, M. et al., 1998; Richard, I. et al., 1999), se permitir estabelecer correlações seguras com os diversos tipos genéticos.

Tem sido descritos diversos fenótipos clínicos de doença de Erb. A forma próximal ou canónica de Erb é a predominante, segue um padrão de atingimento simétrico, selectivo de grupos musculares das cinturas e proximais. A forma distal associa atingimento inicial do tibial anterior imitando a síndrome escápulooperonial. A forma rígida apresenta-se com contracturas dos flexores da coxa e do cotovelo além das dos gémeos. A forma pseudometabólica acusa mialgia de exercício, tem início tardio e paradoxalmente preservação muscular (Fardeau, M. et al., 1996b; Penisson-Besnier, I. et al., 1998), poderá estar relacionada com um efeito de acidose (Lemasters, J. et al., 1998) ou deficiência de complexo I (Kataoka, A. et al., 1997; Ausma, J. et al., 1998).

O pleomorfismo clínico da doença de Erb intersecta-se com o mimetismo e atipicidade de uma série de patologias intrínsecas e reflexas do músculo colocando diversos diagnósticos diferenciais.

As formas atróficas de DMC 2A podem ser mimetizadas e.g. por doenças neurológicas: e.g. atrofia muscular espinhal tipo III, síndrome escápulooperoneal; doenças inflamatórias: e.g. polimiosite, dermatomiosite, miosite dos corpos de inclusão, sarcoidose; doenças metabólicas: e.g. glicogenose adulta da maltase ácida, lipidose da desidrogenase de ácidos gordos curtos, lipidose miopática da carnitina; miopatias congénitas: e.g. nemalina, core central, miotubular; miopatias endócrinas: e.g. tirotoxicose, hipotireoidismo, síndrome de Cushing, acromegalia; miopatias iatrogénicas e.g. corticoterapia, antipalúdicos, inibidores da síntese do colesterol; e distrofias musculares: e.g. D. M. de Duchenne e de Becker, D.M. de Emery-Dreifuss, síndrome da espinha rígida, D. M. Facioescápulo humeral, D.M. Escápulooperoneal e DMCs .

A forma miálgica de DMC 2A pode simular e.g. doenças metabólicas: e.g. glicogenose da miofosforilase, fosfofrutocinase, fosfogliceratocinase, fosfogliceratomutase, lactato desidrogenase; lipidose da carnitina palmitoiltransferase; e doenças vasculares: e.g. displasia fibromuscular, doença de Buerger, esclerodermia e amiloidose (Shields Jr., R., 1994; Engel, A., 1996; Mendell, J. et al., 1998).

Os exames auxiliares de diagnóstico e.g. a Electrofisiologia e a Anátomopatologia são essenciais (van der Kooi, A. et al., 1996; Engel, A., 1996) na determinação do diagnóstico.

A imunohistoquímica desempenha actualmente um papel relevante na exclusão de distrofinopatias e sarcoglicanopatias reduzindo o número de casos de DMC que terão de ser sujeitos a genética molecular para decidir a possibilidade de doença de Erb (Anderson, L., 1996). O aparecimento recente de imunodiagnóstico para a doença de Erb, embora exija cautela nos perfis quase normais (Anderson, L. et al., 1998), ao detectar a ausência de miocalpaína nas mutações nulas (Spencer, M. et al., 1997), vem permitir reduzir ainda mais o número de casos a ser analisados, pela genética molecular.

A descoberta de apoptose mionuclear associada à presença de I $\kappa$ B $\alpha$  (Baghdigian, S. et al., 1999) vem revolucionar o rastreio e diagnóstico da doença de Erb reduzindo consideravelmente a quantidade de amostras que irão ser submetidas a rastreio exónico de miocalpaína para caracterização da mutação.

A prevalência da DMC varia com o tipo de população e vai determinar a carga de trabalho laboratorial a ser solicitada.

Os estudos epidemiológicos apontam para uma prevalência máxima em populações endogâmicas.

Na Ilha da Reunião, onde existe uma comunidade atingida por DMC 2A em condições de endogamia a prevalência de DMC 2A atinge  $48 \times 10^{-6}$  (Fardeau, M. et al., 1996). Em Guipúzcoa, com uma população genética e antropológicamente caracterizada pela estancuidade, a prevalência de DMC atinge  $69 \times 10^{-6}$  com 70% dos casos afectados à DMC 2A (Urtasun, M. et al., 1998).

Em populações exogâmicas é de esperar devido à permuta genética e à natureza hereditária recessiva da doença de Erb uma prevalência menor de DMC 2A.

Na Holanda num estudo epidemiológico sob critérios de diagnóstico rigorosos, abrangendo DMCs autossómicas dominantes, recessivas e inaugurais, apoiado em registos demográficos e clínicos fidedignos, a estimativa da prevalência de DMC foi de  $8,91 \times 10^{-6}$  (van der Kooi, A. et al., 1996). Embora neste género de populações a prevalência seja menor, o maior tamanho da população, a heterogeneidade genética da DMC, com diversas etiologias, e a diversidade de mutações esperada devido à aleatoriedade mutacional no gene da miocalpaína e menor influência de efeitos fundadores, dificulta consideravelmente o diagnóstico devido ao predomínio de casos inaugurais sem locus definido e casos representativos de mutações novas ou já conhecidas mas sem associação haplotípica definida.

A exploração de mutações desconhecidas e imprevisíveis em grandes genes e populações afectadas carece do emprego de um método de rastreio sensível e rápido para reduzir o número de casos ou exões a submeter a sequenciação. A sequenciação automática permite de uma forma expedita caracterizá-las logo que detectadas.

Actualmente estão publicadas 100 mutações distintas (97: Richard, I. et al., 1999; 3: Chou, F. et al., 1999) com 67% de mutações pontuais, 23% de excisões e 10% de inserções. 23% das mutações pontuais atingem CpGs, frequência inferior à média encontrada (35%) para a desaminação espontânea da 5-metil desoxicidina monofosfato nos vertebrados (Cooper, D., Youssoufian, H., 1988), o que poderá representar um excesso das outras formas de mutação neste gene, ou um gene com menos CpGs, ou um gene filogeneticamente menos recente.

A abundância e a eventualidade de novas mutações pontuais aleatórias obriga forçosamente ao uso de métodos muito sensíveis e expeditos para as detectar. Os métodos conhecidos aplicados a este fim são e.g. a electroforese em gel de gradiente desnaturante (Fischer, S. e Lerman, L., 1979), a cisão química (Cotton, R. et al., 1988) ou enzimática (Winter, E. et al., 1985) de desemparelhamentos, a electroforese de polimorfismos conformacionais de cadeia simples (Orita, M. et al., 1989), a electroforese de heteroduplexes (Keen, J. et al., 1991), a electroforese de polimorfismos conformacionais de ARN (Danenberg, P. et al., 1992; Sarkar, G. et al., 1992a), a electroforese conformacional de cadeia dupla (Saad, F. et al., 1994; Korkko, J. et al., 1998), PCCS com iniciadores fluorescentes (Makino, R. et al., 1992) e perfil-ddF uni- (Sarkar, G. et al., 1992b; Liu, Q. et al., 1994) e bidireccional (Liu, Q. et al., 1996).

O objectivo fundamental deste trabalho constituiu a experimentação de uma metodologia de rastreio mutacional, o PCCS, articulada ao diagnóstico por sequenciação automática de mutações no gene da miocalpaína, (calpaína 3). Pretende-se com esta metodologia aplicada a casos de DMC prévia e devidamente descartados de patologia concorrente por EMG e biópsia, seleccionar e diagnosticar os casos afectados de doença de Erb, (DMC 2A). O diagnóstico visa poder proporcionar aconselhamento genético, diagnóstico pré-natal e pré-sintomático, orientação terapêutica e prognóstico.

# Procedimento Experimental

## 1– Natureza das Amostras:

Amostras de sangue venoso periférico colhidas com anticoagulante, obtidas de casos com distrofia muscular das cinturas (DMC) e de controlos com outras patologias genéticas, com consentimento informado, em doentes do Instituto de Genética Médica Jacinto de Magalhães (IGMJM).

## 2 – Rastreamento de Polimorfismos Conformacionais de Cadeia Simples (PCCS):

I -Extração de ADN genómico de linfócitos de sangue total com precipitação salina de proteínas ( Miller, A. et al., 1988 ).

II- Reprodução exónica por reacção em cadeia da Taq ADN polimerase (RCP), ( Fougereuse, F. et al., 1994 ) com iniciadores intrónicos num termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400.

Formação de solução final, de 48µL, com: 45µL de PCR Supermix (GibcoBRL), 1µL(100ng) de iniciador F, 1µL(100ng) de iniciador R, (GibcoBRL), 1µL (100ng ) de ADN genómico.

Programa de termociclação: desnaturação a 95°C em 5 minutos, 30 ciclos ( com desnaturação a 92°C em 40 segundos, ligação ou hibridação do iniciador à temperatura adequada ( Richard, I. et al., 1995 ) em 30 segundos, extensão a 72°C em 30 segundos), polimerização final a 72°C em 6 minutos.

III-Verificação da pureza dos produtos de RCP corados com brometo de etídio por electroforese em gel de agarose 1%.

IV- Resolução de PCCSs (Glavac, D. et al., 1993; FMC BioProducts Catalog, 1998):

Solução com 5 µL de solução RCP e 5µL de solução com 93% formamida 25M, 5% ácido EDTA 0,5M, 1% xileno cianol 0,18M e 1% azul bromofenol 0,14M.

Desnaturação dos exões a 94°C durante 3 minutos. Arrefecimento em banho de gelo.

Aplicação da solução em gel “MDE” 0,5% de 0,75mm (FMC BioProducts). Electroforese a 240 V. Revelação por método de AgNO<sub>3</sub> (Budowle, B. et al., 1991).

### 3 – Pesquisa de Mutação na Sequência Exónica :

I- RCP das amostras com bandas desfasadas.

II- Purificação dos exões:

Electroforese em agarose 2% de 45µL de solução RCP com 5µL de corante. Excisão da banda do gel. Filtração do excerto em colunas 0,45µm (ULTRAFREE-MC MILIPORE) sob centrifugação a 6000 rpm, 15 minutos.

III-Semiquantificação do ADN purificado por electroforese em agarose 2 % de solução de 2µL de filtrado, 3µL de H<sub>2</sub>O e 1µL de corante.

IV- Produção de ADNs monocatenares para sequenciação com RCP assimétrica com terminadores fluorocrómicos, 3'-fluorocromo-didesoxinucleótido trifosfato, e Taq-FS-ADN-polimerase pelo método "BigDye Terminator" (PE Applied Biosystems).

Solução de: 4µL de solução BigDye, 4µL de iniciador (isoladamente só F ou só R por reacção), 3 µL de ADN semiquantificado (50 ng), ou até 15µL se o sinal for fraco. Termociclação segundo o programa do exão.

V- Preparação dos ADNs monocatenares.

Precipitação por adição de 20µL de MgCl<sub>2</sub> 2mM e 55µL de etanol absoluto.

Homogeneização. Centrifugação a 13 000 rpm, 30 minutos. Eliminação do sobrenadante.

Lavagem do depósito com 300µL de etanol 70%. Centrifugação a 13000 rpm, 5 minutos. Evaporação do etanol. Desnaturação por dissolução do depósito em 25µL de TSR ("template suppressor reaction") e incubação a 94°C 3 minutos.

VII - Sequenciação automática didesoxi-fluorocromática:

Sequenciador automático: ABI PRISM 310 GENETIC ANALYZER, PE

Programa: DNA Sequencing Analysis Software (PE Applied Biosystems).

VIII- Identificação da alteração de sequência do exão por comparação com a sequência padrão (Richard, I. et al., 1995).

# Resultados

Quadro sinóptico dos resultados do rastreio em curso da doença de Erb na síndrome da DMC

Nº	código	ex 1	ex 2	ex 3	ex 4	ex 5	ex 6	ex 7	ex 8	ex 9	ex 10	ex 11	ex 12	ex 13	ex 14	ex 15	ex 16	ex 17	ex 18	ex 19	ex 20/21	ex 22	ex 23	ex 24	Ind	
1	2	1	1	1	1	X1	1	1	1	1	1	1				1	1	1	1	1	X1				6	
2	6	1	1	1	1	X1	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	X1				4	
3	10	1	1	1	1	X1	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1		X1			8	
4	11	1	1	1	1	X1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	X1				3	
5	12	1	1	1	1	X1	1	1	1		1										X1	X1			12	
6	14	1	1	1	1	X1	1	1	1	1	1		1												12	
7	16	1	1		1	X1	1	1	1	1		1	1	1	1			1		1		X1	1	1	8	
8	17	1	1	1		X1		1	1	1	1	1		1		1	1	1	1	1	X1	X1		1	7	
9	23	1	1			X1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	X1	X1	1	1	4
10	24	1	1		1	X1	1	1	1	1	1				1					1		X1	X1	1	1	8
11	25	1	1	1	1	X1	1	1	1	1	1	1	1	1						1		X1	X1		1	6
12	32	1	1	1	1	X1	1	1	1	1			1	1	1	1	1	1	1	1	1	X1	X1			5
13	33	1	1		1	X1	1												1	1		X1	X1	1	1	12
14	34	1	1	1	1	X1	1	1	1	1	1			1		1	1	1	1	1	1	X1	X1			5
15	35	1	1	1	1	X1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1		X1	1	1	3
16	36	1	1	1	1	X1	1	1	1	1	1	1			1	1	1	1	1	1	1	X1	X1			4
17	43	M	1	1	1	X1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		X1	1	1	1	3
18	47	1	1	1	1	X1	1	1		1		1	1	1	1	1	1	1	1	1		X1		1	1	6
19	49	1		1		X1	1	1		1					1		1	1	1	1		X1	1	1	1	10
20	50	1	1			X1	1	1	1	1	1	1							1	1		X1	1	1	1	10
21	51					X1	1	1	1	1					1	1	1	1	1			X1				13
22	53	1	1	1		X1	1	1	1	1	1				1	1	1	1	1			X1	1	1	1	7
23	54	1	1	1	1	X1	1	1		1	1	1							1			X1	1	1	1	9
24	56					X1	X1			1		1	1	1	1	1	1	1	1			X1	1	1	1	10
25	57						X1			1	1	1	1	1				1				X1	1	1	1	14
26	58					X1	X1			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			X1	1	1	1	10
27	59					X1	X1				1	1	1	1	1	1	1	1	1			X1	1	1	1	12
28	60					X1	X1				1	1					1	1	1			X1		1	1	14
29	61					X1	X1				1	1	1	1	1	1	1	1	1		X1		1	1	1	12
30	62					X1	X1				1	1	1	1	1	1	1	1	1		X1	X1	1	1	1	10
31	63																		1			X1	1	1	1	18
32	70	1	1	1			1	1	1	1	1	1	1		1	1	1					X1	1	1	1	10
33	97	1		1			1	1	1	1			1									X1				15
34	115	1	1	1			1	1	1	1			1									X1				15
35	123			1			1	1			1	1														18
36	127	1	1	1	1		1	1								1						X1				15
37	129	1	1	1				1														X1	1			17
38	140	1	1	1			1	1			1	1				1	1	1	1	1		X1	1	1	1	9
39	146	1	1	1			1	1					1									X1				16
40	148	1	1	1			1	1			1											X1				16
41	161	1	1	1			1																			19
42	169	1	1	1			1			1																18
43	186	1		1						1	1											X1				18
44	C102	P		1			1			1		1					1	1	1	1	1					
45	C105	P		1				1		1	1	1				1	1	1	1	1						
46	C106	P							1	1			1			1	1	1	1					1	1	
47	C111	1		1									1	1		1	1	1	1	1				1	1	
48	C117	1	1	1	1		1	1		1	1		1	1		1										
49	C716															1	1	1							1	

legenda:

Nº : nº da amostra; código: código da DMC; ex: exão; Ind: nº de exões por definir no gene  
 1: exão com PCCS normal definido pelo autor; X1: exão com PCCS normal definido por outro autor  
 M: PCCS de uma mutação; P: PCCS de um polimorfismo; C: controlos  
 (resultados obtidos a 4°C, a 240V, sem aditivos e.g. glicerol)

# Rastreo e diagnóstico genético molecular de miocalpainopatias: mutação 60ΔA

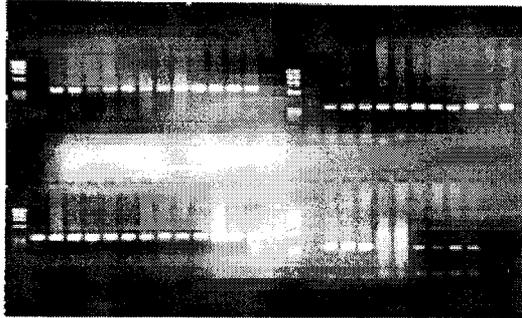


Fig.1  
Controlo da RCP por  
electroforese em gel  
de agarose 1%

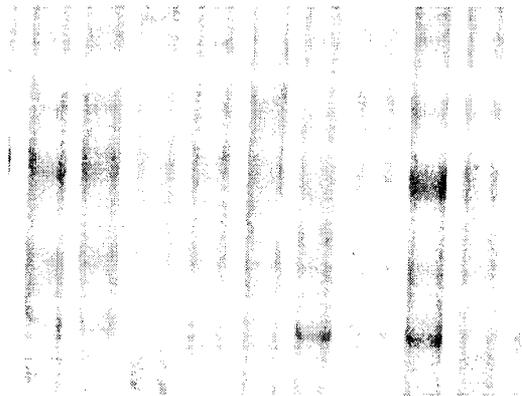


Fig. 2  
Rastreo de  
mutações por  
electroforese de  
polimorfismos  
conformacionais  
de cadeia simples

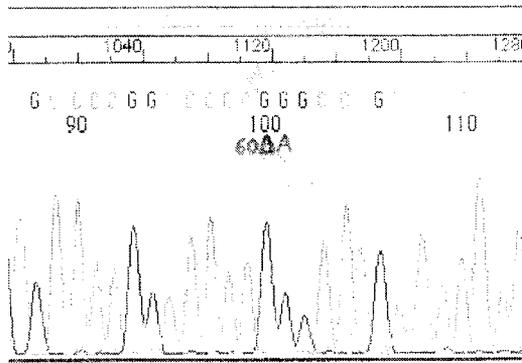


Fig.3  
Sequenciação  
automática por  
electroforese capilar  
de produtos  
didesoxiterminal  
fluorescentes da RCP  
assimétrica

```

      495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000 1001 1002 1003 1004 1005 1006 1007 1008 1009 1010 1011 1012 1013 1014 1015 1016 1017 1018 1019 1020 1021 1022 1023 1024 1025 1026 1027 1028 1029 1030 1031 1032 1033 1034 1035 1036 1037 1038 1039 1040 1041 1042 1043 1044 1045 1046 1047 1048 1049 1050 1051 1052 1053 1054 1055 1056 1057 1058 1059 1060 1061 1062 1063 1064 1065 1066 1067 1068 1069 1070 1071 1072 1073 1074 1075 1076 1077 1078 1079 1080 1081 1082 1083 1084 1085 1086 1087 1088 1089 1090 1091 1092 1093 1094 1095 1096 1097 1098 1099 1100 1101 1102 1103 1104 1105 1106 1107 1108 1109 1110 1111 1112 1113 1114 1115 1116 1117 1118 1119 1120 1121 1122 1123 1124 1125 1126 1127 1128 1129 1130 1131 1132 1133 1134 1135 1136 1137 1138 1139 1140 1141 1142 1143 1144 1145 1146 1147 1148 1149 1150 1151 1152 1153 1154 1155 1156 1157 1158 1159 1160 1161 1162 1163 1164 1165 1166 1167 1168 1169 1170 1171 1172 1173 1174 1175 1176 1177 1178 1179 1180 1181 1182 1183 1184 1185 1186 1187 1188 1189 1190 1191 1192 1193 1194 1195 1196 1197 1198 1199 1200 1201 1202 1203 1204 1205 1206 1207 1208 1209 1210 1211 1212 1213 1214 1215 1216 1217 1218 1219 1220 1221 1222 1223 1224 1225 1226 1227 1228 1229 1230 1231 1232 1233 1234 1235 1236 1237 1238 1239 1240 1241 1242 1243 1244 1245 1246 1247 1248 1249 1250 1251 1252 1253 1254 1255 1256 1257 1258 1259 1260 1261 1262 1263 1264 1265 1266 1267 1268 1269 1270 1271 1272 1273 1274 1275 1276 1277 1278 1279 1280 1281 1282 1283 1284 1285 1286 1287 1288 1289 1290 1291 1292 1293 1294 1295 1296 1297 1298 1299 1300 1301 1302 1303 1304 1305 1306 1307 1308 1309 1310 1311 1312 1313 1314 1315 1316 1317 1318 1319 1320 1321 1322 1323 1324 1325 1326 1327 1328 1329 1330 1331 1332 1333 1334 1335 1336 1337 1338 1339 1340 1341 1342 1343 1344 1345 1346 1347 1348 1349 1350 1351 1352 1353 1354 1355 1356 1357 1358 1359 1360 1361 1362 1363 1364 1365 1366 1367 1368 1369 1370 1371 1372 1373 1374 1375 1376 1377 1378 1379 1380 1381 1382 1383 1384 1385 1386 1387 1388 1389 1390 1391 1392 1393 1394 1395 1396 1397 1398 1399 1400 1401 1402 1403 1404 1405 1406 1407 1408 1409 1410 1411 1412 1413 1414 1415 1416 1417 1418 1419 1420 1421 1422 1423 1424 1425 1426 1427 1428 1429 1430 1431 1432 1433 1434 1435 1436 1437 1438 1439 1440 1441 1442 1443 1444 1445 1446 1447 1448 1449 1450 1451 1452 1453 1454 1455 1456 1457 1458 1459 1460 1461 1462 1463 1464 1465 1466 1467 1468 1469 1470 1471 1472 1473 1474 1475 1476 1477 1478 1479 1480 1481 1482 1483 1484 1485 1486 1487 1488 1489 1490 1491 1492 1493 1494 1495 1496 1497 1498 1499 1500 1501 1502 1503 1504 1505 1506 1507 1508 1509 1510 1511 1512 1513 1514 1515 1516 1517 1518 1519 1520 1521 1522 1523 1524 1525 1526 1527 1528 1529 1530 1531 1532 1533 1534 1535 1536 1537 1538 1539 1540 1541 1542 1543 1544 1545 1546 1547 1548 1549 1550 1551 1552 1553 1554 1555 1556 1557 1558 1559 1560 1561 1562 1563 1564 1565 1566 1567 1568 1569 1570 1571 1572 1573 1574 1575 1576 1577 1578 1579 1580 1581 1582 1583 1584 1585 1586 1587 1588 1589 1590 1591 1592 1593 1594 1595 1596 1597 1598 1599 1600 1601 1602 1603 1604 1605 1606 1607 1608 1609 1610 1611 1612 1613 1614 1615 1616 1617 1618 1619 1620 1621 1622 1623 1624 1625 1626 1627 1628 1629 1630 1631 1632 1633 1634 1635 1636 1637 1638 1639 1640 1641 1642 1643 1644 1645 1646 1647 1648 1649 1650 1651 1652 1653 1654 1655 1656 1657 1658 1659 1660 1661 1662 1663 1664 1665 1666 1667 1668 1669 1670 1671 1672 1673 1674 1675 1676 1677 1678 1679 1680 1681 1682 1683 1684 1685 1686 1687 1688 1689 1690 1691 1692 1693 1694 1695 1696 1697 1698 1699 1700 1701 1702 1703 1704 1705 1706 1707 1708 1709 1710 1711 1712 1713 1714 1715 1716 1717 1718 1719 1720 1721 1722 1723 1724 1725 1726 1727 1728 1729 1730 1731 1732 1733 1734 1735 1736 1737 1738 1739 1740 1741 1742 1743 1744 1745 1746 1747 1748 1749 1750 1751 1752 1753 1754 1755 1756 1757 1758 1759 1760 1761 1762 1763 1764 1765 1766 1767 1768 1769 1770 1771 1772 1773 1774 1775 1776 1777 1778 1779 1780 1781 1782 1783 1784 1785 1786 1787 1788 1789 1790 1791 1792 1793 1794 1795 1796 1797 1798 1799 1800 1801 1802 1803 1804 1805 1806 1807 1808 1809 1810 1811 1812 1813 1814 1815 1816 1817 1818 1819 1820 1821 1822 1823 1824 1825 1826 1827 1828 1829 1830 1831 1832 1833 1834 1835 1836 1837 1838 1839 1840 1841 1842 1843 1844 1845 1846 1847 1848 1849 1850 1851 1852 1853 1854 1855 1856 1857 1858 1859 1860 1861 1862 1863 1864 1865 1866 1867 1868 1869 1870 1871 1872 1873 1874 1875 1876 1877 1878 1879 1880 1881 1882 1883 1884 1885 1886 1887 1888 1889 1890 1891 1892 1893 1894 1895 1896 1897 1898 1899 1900 1901 1902 1903 1904 1905 1906 1907 1908 1909 1910 1911 1912 1913 1914 1915 1916 1917 1918 1919 1920 1921 1922 1923 1924 1925 1926 1927 1928 1929 1930 1931 1932 1933 1934 1935 1936 1937 1938 1939 1940 1941 1942 1943 1944 1945 1946 1947 1948 1949 1950 1951 1952 1953 1954 1955 1956 1957 1958 1959 1960 1961 1962 1963 1964 1965 1966 1967 1968 1969 1970 1971 1972 1973 1974 1975 1976 1977 1978 1979 1980 1981 1982 1983 1984 1985 1986 1987 1988 1989 1990 1991 1992 1993 1994 1995 1996 1997 1998 1999 2000 2001 2002 2003 2004 2005 2006 2007 2008 2009 2010 2011 2012 2013 2014 2015 2016 2017 2018 2019 2020 2021 2022 2023 2024 2025 2026 2027 2028 2029 2030 2031 2032 2033 2034 2035 2036 2037 2038 2039 2040 2041 2042 2043 2044 2045 2046 2047 2048 2049 2050 2051 2052 2053 2054 2055 2056 2057 2058 2059 2060 2061 2062 2063 2064 2065 2066 2067 2068 2069 2070 2071 2072 2073 2074 2075 2076 2077 2078 2079 2080 2081 2082 2083 2084 2085 2086 2087 2088 2089 2090 2091 2092 2093 2094 2095 2096 2097 2098 2099 2100 2101 2102 2103 2104 2105 2106 2107 2108 2109 2110 2111 2112 2113 2114 2115 2116 2117 2118 2119 2120 2121 2122 2123 2124 2125 2126 2127 2128 2129 2130 2131 2132 2133 2134 2135 2136 2137 2138 2139 2140 2141 2142 2143 2144 2145 2146 2147 2148 2149 2150 2151 2152 2153 2154 2155 2156 2157 2158 2159 2160 2161 2162 2163 2164 2165 2166 2167 2168 2169 2170 2171 2172 2173 2174 2175 2176 2177 2178 2179 2180 2181 2182 2183 2184 2185 2186 2187 2188 2189 2190 2191 2192 2193 2194 2195 2196 2197 2198 2199 2200 2201 2202 2203 2204 2205 2206 2207 2208 2209 2210 2211 2212 2213 2214 2215 2216 2217 2218 2219 2220 2221 2222 2223 2224 2225 2226 2227 2228 2229 2230 2231 2232 2233 2234 2235 2236 2237 2238 2239 2240 2241 2242 2243 2244 2245 2246 2247 2248 2249 2250 2251 2252 2253 2254 2255 2256 2257 2258 2259 2260 2261 2262 2263 2264 2265 2266 2267 2268 2269 2270 2271 2272 2273 2274 2275 2276 2277 2278 2279 2280 2281 2282 2283 2284 2285 2286 2287 2288 2289 2290 2291 2292 2293 2294 2295 2296 2297 2298 2299 2300 2301 2302 2303 2304 2305 2306 2307 2308 2309 2310 2311 2312 2313 2314 2315 2316 2317 2318 2319 2320 2321 2322 2323 2324 2325 2326 2327 2328 2329 2330 2331 2332 2333 2334 2335 2336 2337 2338 2339 2340 2341 2342 2343 2344 2345 2346 2347 2348 2349 2350 2351 2352 2353 2354 2355 2356 2357 2358 2359 2360 2361 2362 2363 2364 2365 2366 2367 2368 2369 2370 2371 2372 2373 2374 2375 2376 2377 2378 2379 2380 2381 2382 2383 2384 2385 2386 2387 2388 2389 2390 2391 2392 2393 2394 2395 2396 2397 2398 2399 2400 2401 2402 2403 2404 2405 2406 2407 2408 2409 2410 2411 2412 2413 2414 2415 2416 2417 2418 2419 2420 2421 2422 2423 2424 2425 2426 2427 2428 2429 2430 2431 2432 2433 2434 2435 2436 2437 2438 2439 2440 2441 2442 2443 2444 2445 2446 2447 2448 2449 2450 2451 2452 2453 2454 2455 2456 2457 2458 2459 2460 2461 2462 2463 2464 2465 2466 2467 2468 2469 2470 2471 2472 2473 2474 2475 2476 2477 2478 2479 2480 2481 2482 2483 2484 2485 2486 2487 2488 2489 2490 2491 2492 2493 2494 2495 2496 2497 2498 2499 2500 2501 2502 2503 2504 2505 2506 2507 2508 2509 2510 2511 2512 2513 2514 2515 2516 2517 2518 2519 2520 2521 2522 2523 2524 2525 2526 2527 2528 2529 2530 2531 2532 2533 2534 2535 2536 2537 2538 2539 2540 2541 2542 2543 2544 2545 2546 2547 2548 2549 2550 2551 2552 2553 2554 2555 2556 2557 2558 2559 2560 2561 2562 2563 2564 2565 2566 2567 2568 2569 2570 2571 2572 2573 2574 2575 2576 2577 2578 2579 2580 2581 2582 2583 2584 2585 2586 2587 2588 2589 2590 2591 2592 2593 2594 2595 2596 2597 2598 2599 2600 2601 2602 2603 2604 2605 2606 2607 2608 2609 2610 2611 2612 2613 2614 2615 2616 2617 2618 2619 2620 2621 2622 2623 2624 2625 2626 2627 2628 2629 2630 2631 2632 2633 2634 2635 2636 2637 2638 2639 2640 2641 2642 2643 2644 2645 2646 2647 2648 2649 2650 2651 2652 2653 2654 2655 2656 2657 2658 2659 2660 2661 2662 2663 2664 2665 2666 2667 2668 2669 2670 2671 2672 2673 2674 2675 2676 2677 2678 2679 2680 2681 2682 2683 2684 2685 2686 2687 2688 2689 2690 2691 2692 2693 2694 2695 2696 2697 2698 2699 2700 2701 2702 2703 2704 2705 2706 2707 2708 2709 2710 2711 2712 2713 2714 2715 2716 2717 2718 2719 2720 2721 2722 2723 2724 2725 2726 2727 2728 2729 2730 2731 2732 2733 2734 2735 2736 2737 2738 2739 2740 2741 2742 2743 2744 2745 2746 2747 2748 2749 2750 2751 2752 2753 2754 2755 2756 2757 2758 2759 2760 2761 2762 2763 2764 2765 2766 2767 2768 2769 2770 2771 2772 2773 2774 2775 2776 2777 2778 2779 2780 2781 2782 2783 2784 2785 2786 2787 2788 2789 2790 2791 2792 2793 2794 2795 2796 2797 2798 2799 2800 2801 2802 2803 2804 2805 2806 2807 2808 2809 2810 2811 2812 2813 2814 2815 2816 2817 2818 2819 2820 2821 2822 2823 2824 2825 2826 2827 2828 2829 2830 2831 2832 2833 2834 2835 2836 2837 2838 2839 2840 2841 2842 2843 2844 2845 2846 2847 2848 2849 2850 2851 2852 2853 2854 2855 2856 2857 2858 2859 2860 2861 2862 2863 2864 2865 2866 2867 2868 2869 2870 2871 2872 2873 2874 2875 2876 2877 2878 2879 2880 2881 2882 2883 2884 2885 2886 2887 2888 2889 2890 2891 2892 2893 2894 2895 2896 2897 2898 2899 2900 2901 2902 2903 2904 2905 2906 2907 2908 2909 2910 2911 2912 2913 2914 2915 2916 2917 2918 2919 2920 2921 2922 2923 2924 2925 2926 2927 2928 2929 2930 2931 2932 2933 2934 2935 2936 2937 2938 2939 2940 2941 2942 2943 2944 2945 2946 2947 
```

## Discussão

Nenhum dos genes dos 44 doentes completou o rastreio exónico. No entanto um dos exões 1 pertencentes a uma DMC exibiu um PCCS, M, diferente dos controlos. A sequenciação de M revelou a mutação em homozigotia 60ΔA.

Foram detectados mais 3 PCCSs suspeitos, Ps, que aguardam sequenciação. Como pertencem a controlos, poderão ser mutações em hemizigotia, i.e. portadores, ou polimorfismos.

Os resultados obtidos para os restantes exões são função das condições experimentais em que foram realizados, a 4°C, 240V, sem aditivos, sendo necessário explorar sob uma série de outras condições experimentais para se conseguir uma sensibilidade de 100% (Michaud, G. et al., 1991; Hayashi, K. et al., 1993), eventualmente revelando a existência de falsos negativos.

Qualquer um dos doentes tem ainda de completar a exploração da totalidade dos exões do gene nas condições experimentais adoptadas e repeti-la sob outras.

A expectativa máxima de doentes a identificar se for tomada como referência para esta série de doentes a proporção de 60% de formas recessivas que ocorrem nos casos familiares de DMC na Holanda (van der Kooi, A. et al., 1996) articulada com a proporção de 30 a 50% de doença de Erb nas formas recessivas familiares de DMC (Passos-Bueno et al., 1996; Richard, I. et al., 1997; Dinçer, P. et al., 1997) é entre 8 a 13.

Um modelo alternativo, de referência, é um estudo realizado por selecção de DMC idiopática com distrofina, merosina e  $\alpha$ -sarcoglicano normal num banco de biópsia muscular com origens geográficas diversas, apontando uma frequência de 9,2% de doença de Erb na DMC (Chou, F. et al., 1999). Segundo este modelo apenas se identificariam 4 doentes nesta série.

Na exploração genética molecular realizada até ao momento no IGMJM da DMC envolvendo 68 doentes, 47 % dos casos foram identificados, contabilizando 25% de  $\gamma$ -sarcoglicanopatias, 12% de  $\alpha$ -sarcoglicanopatias, 6% de sarcocalpaínoptia (doença de Erb) e 4% de  $\beta$ -sarcoglicanopatias. Estas proporções reflectem uma exploração inicial de mutações conhecidas frequentes e.g. de  $\gamma$ -sarcoglicanos (47% 521ΔT homozigótica; 35% C283Y homozigótica) seguida da pesquisa de mutações desconhecidas, de concretização mais laboriosa. O desvio actual em relação às distribuições familiares encontradas (Passos-Bueno, M. et al., 1996, 1999) reflectem uma análise não restricta a casos familiares, a presença de casos de etiologia ainda por determinar, uma metodologia diferente ou talvez uma distribuição peculiar de patologia genética na população, a qual se reflectirá na proporção de casos de DMC 2A, a definir quando a série estiver concluída. Se a tendência colhida nos dados de DMC obtidos se mantiver esta série deverá revelar pelo menos mais 2 doentes com mutação na miocalpaína.

Em séries analisadas por PCCS tem havido desde 100% (Michaud, J. et al., 1991) das amostras com mutações até 20% (Grodén, J. et al., 1993). A eficiência publicada varia desde eg. 35% (Sarkar, G. et al., 1992a, b), 73% (Michaud, J. et al., 1992), até quase 100% (Orita, M. et al., 1989; Glavac, D. et al., 1993; van der Sijs-Bos, C. et al., 1996). Nem todas as mutações são detectáveis por este método (Sarkar, G. et al., 1992a,b; Chou, F. et al., 1999) e falsos positivos ou falsos negativos não podem ser excluídos porque a sensibilidade não é 100%. A estratégia adoptada para aumentar a sensibilidade é repetir o PCCS sob 2 ou 3 condições experimentais diferentes o que em geral permite detectar a grande maioria das mutações em fragmentos até 300n (Hayashi, K. et al., 1993).

A EPCCS é um método de rastreio muito divulgado na pesquisa de mutações desconhecidas. Baseia-se na migração diferencial em gel de fragmentos de ADN monocatenar dotados de estruturas secundárias e terciárias individualizantes. A conformação estrutural ao resultar do emparelhamento interno dos nucleótidos é específica da sequência correspondente.

Demonstra-se por análise de variação da mobilidade, contribuições da natureza da mutação pontual, sequência envolvente e composição nucleotídica da cadeia, além de influência do tamanho do fragmento, temperatura e força iónica, fazendo depender a detecção de alteração da conformação, de condições peculiares restrictas a estabelecer por optimização empírica, pelo que um resultado normal em certas condições, pode ocultar uma mutação que se revela sob outras (Orita, M. et al., 1989b; Suzuki, Y. et al., 1990; Hayashi, K. et al., 1993).

A 4°C as cadeias ricas em pirimidinas apresentam menor variação de mobilidade que as ricas em purinas (Szalay, A. et al., 1977; Glavac, D. et al., 1993) e a mobilidade aumenta nas mutações nas regiões ricas em AT das cadeias ricas em pirimidinas e nas regiões ricas em GC nas cadeias ricas em purinas.

A sequência envolvente é mais importante que o próprio tipo de transição ou transversão ocorrido na determinação da variação da mobilidade (Glavac, D. et al., 1993).

A sensibilidade da EPCCS é influenciada pela composição do gel, tamponamento (pH), temperatura e tamanho do fragmento, reflectindo a variação conformacional do fragmento (Savov, A. et al., 1992; Hayashi, K. et al., 1993; Kukita, Y. et al., 1997).

Uma variável importante a optimizar na EPCCS é a porosidade do gel. A maior concentração de acrilamida (8 a 10%) e menor ligação cruzada (1,3 a 2,6 %) produz geis de fibras longas e poros largos, facilitando a expressão da diversidade conformacional na mobilidade electroforética e reduzindo o tempo de electroforese resultando em 100% de sensibilidade para fragmentos de 100 a 200n (Savov, A. et al., 1992; Glavac, D. et al., 1993).

Os aditivos polares, a 4°C, e.g. o glicerol e a glicose (5 ou 10%) tem efeito similar melhorando a resolução de fragmentos com mais de 200n a 25°C (Orita, M. et al., 1989; Hayashi, K. et al., 1993); a sacarose (10 ou 15%) melhora ainda mais a resolução. O efeito da formamida e ureia é menor, invertem a ordem de mobilidade das cadeias ricas em purinas e pirimidinas e tem pouco efeito na separação de bandas, assim como o butanol e o dimetilsulfóxido (Glavac, D. et al., 1993). O polietileno glicol além de melhorar a separação de bandas, diminui o tempo de electroforese e estende o tamanho dos fragmentos analisáveis até aos 500n (Markoff, A. et al., 1997).

A temperatura tem efeito na conformação da cadeia. A 4°C pode ocorrer multiplicidade de bandas, por efeito de cadeias ricas em CG possibilitando mais de uma conformação metaestável (Orita, M. et al., 1989) podendo desaparecer em condições de temperatura ambiente. A sensibilidade de detecção decresce com o aumento da temperatura (Glavac, D. et al., 1993; Larsen, L. et al., 1999) mas há determinadas alterações conformacionais que só se exprimem a temperaturas mais altas (Kanters, J. et al., 1998) obrigando a explorar uma gama de temperaturas para contribuir para uma sensibilidade de 100%.

O tamanho do fragmento também afecta a mobilidade e condiciona a sensibilidade do método. Há sensibilidade para fragmentos desde os 50n (Glavac, D. et al., 1993). O método a 4°C mantém uma sensibilidade superior a 90% para fragmentos entre 100 e 300n (Sheffield, V. et al., 1993; Hayashi, K. et al., 1993; van der Sijs-Bos, C. et al., 1996), mas decresce para fragmentos maiores (Michaud, J. et al., 1992; Sarkar, G. et al., 1992a,b).

Fragmentos até 800n podem ser analisados sob pH ácido (Kukita, Y. et al., 1997) ou por electroforese capilar (Inazuka, M. et al., 1997), ou ainda por recurso à produção de subfragmentos de tamanho adequado por cisão enzimática (Glavac, D. et al., 1993; Hayashi, K. et al., 1993).

A revelação da EPCCS pode ser feita por e.g. autorradiografia (Orita, M. et al., 1989; Hayashi, K. et al., 1989), quimiluminescência (Vignal, A. et al., 1993), luminescência (Winterpacht, A. et al., 1991), fluorescência (Makino, R. et al., 1992; Iwahana, H. et al., 1995) ou coloração argêntica (Ainsworth, P. et al., 1991; Budowle, B. et al., 1991).

A detecção de uma alteração na EPCCS pode levar à identificação de uma mutação, um polimorfismo, ou um artefacto.

Os artefactos podem ocorrer por erro da RCP. A Taq ADN polimerase apresenta uma taxa de erro médio de 1,1 a  $2,8 \times 10^{-9}$  por nucleótido adicionado, com predomínio de transições AT → GC (Saiki, R. et al., 1988; Keohavong, P. et al., 1989). Os efeitos desta taxa podem ser minimizados pelo uso de pelo menos 100.000 ADNs molde iniciais. Em quantidade inferior a probabilidade de erro é cerca de 1% (Krawczak, M. et al., 1989).

Outras causas de artefactos são e.g. iniciadores com nucleótidos degradados (Bauer, B. et al., 1989; Eadie, J. et al., 1987), recombinação durante a RCP de fragmentos longos (Meyerhans, A. et al., 1990), ou excesso de nucleótidos e  $MgCl_2$  (Larsen, L. et al., 1999). A repetição da RCP permite em princípio descartar o artefacto.

Os polimorfismos nucleotídicos ocorrem com uma frequência de cerca de 1pn por cada 100 ou 200pn (Botstein, D. et al., 1988), mantêm-se na repetição de RCPs e são também detectáveis em controlos, a maioria sem expressão fenotípica, contribuindo para a constituição da variação polimórfica (Cotton, R., Scriver, S., 1998).

Polimorfismos fisiológicos ocorrem, por definição, na população com uma frequência não inferior a 1% (Vogel, F., Motulsky, A., 1986) e podem ter outros determinantes genotípicos além dos simples polimorfismos mononucleotídicos.

As mutações nem sempre são inequívocas. Ao contrário das mutações alogas, disfásicas, juncionais e grandes exclusões ou inserções, as mutações dislogas são susceptíveis de induzir em erro devido ao seu potencial de ambiguidade etiopatogénica, obrigando à expressão *in vitro* do produto e teste de actividade para conclusão definitiva. Em alternativa, a análise de co-segregação do fenótipo com a mutação, o grau de conservação do aminoácido afectado, o domínio onde está incluído, a extensão da exploração do gene e a prevalência da alteração, são critérios alternativos de recurso.

A ambiguidade resulta e.g. de a mutação aparentemente homóloga do 3º nucleótido do codão, possibilitar junção aberrante ou ARNm instável, ou substituição aparentemente inócua de um aminoácido não conservado resultando em patologia ou substituição aparentemente patológica de um aminoácido conservado mas fisiologicamente mudo presumir uma falsa mutação.

A detecção de alteração de sequência dum exão não deve necessariamente obstar à exploração da totalidade dum gene. Outra mutação coexistente, *cis*-alelismo, (Cotton, R. e Scriver, S., 1998) pode coparticipar no fenótipo ou até ser a causa real.

Na doença de Erb tem ocorrido mutações que iludem o diagnóstico por serem aparentemente sinónimas ou homólogas mas que criam sítios de junção aberrante (Richard, I. et al., 1995b; Beckmann, J. et al., 1996), ou escapam ao HDP e sequenciação por mutação de sítios de junção (Richard, I. et al., 1995) sendo necessário na suspeita destas situações recorrer à análise de transcritos juncionados pelo método da transcrição ilegítima (Chelly, J. et al., 1989) ou ao teste de síntese de proteínas truncadas (Bateman, F. et al., 1999) com avaliação da actividade da proteína (Ono, Y. et al., 1998).

Embora ainda não descritas (Richard, I. et al., 1999), as mutações nos elementos reguladores da expressão e.g. no promotor ou num hipotético facilitador podem impedir a transcrição de exões normais, tal como mutações do sinal poliA da cauda podem instabilizar transcritos normais reduzindo ou anulando a expressão do gene, pelo que poderão

eventualmente simular uma menor sensibilidade do método usado (Richard, I. et al., 1997; Chou, F. et al., 1999) quando se restringe a exploração genética molecular aos exões. O gene tem cerca de um elemento Alu por 2,5 Kn (Richard, I. et al., 1995) podendo ocorrer excisão de alguns exões por recombinação entre elementos Alu orientados no mesmo sentido, repercutindo-se em RCP nula nos exões atingidos, e adjacência de exões distantes nos produtos de transcrição ilegítima (Richard, I. et al., 1999).

Outras causas de RCP nula são as mutações pontuais ou as exclusões nos segmentos de hibridação de iniciadores (Kukita, Y. et al., 1997).

As mutações podem ainda escapar ao rastreio por PCCS quando não causam alterações conformacionais capazes de produzirem diferenças de migração, ou se localizam fora do segmento reproduzido na RCP i.e. nos intrões ou no promotor (Kukita, Y. et al., 1997).

As mutações isoladas são geralmente confirmadas por análise de segregação da mutação, por sequenciação das duas cadeias, cisão enzimática (Richard, I. et al., 1995 e 1997), ou RCP alélica específica (Newton, C. et al., 1989; Urtasun, M. et al., 1998), demonstrando a presença da mutação nos cromossomas dos progenitores e contribuindo para a descrição da distribuição na linhagem.

Na prática a demonstração de que uma mutação disloga não é um polimorfismo é feita pelo teste de pelo menos 100 cromossomas na população controlo (Richard, I. et al., 1995, 1999; Chou, F et al., 1999).

A mutação encontrada no decurso deste rastreio pertencia a um doente do sexo feminino, filha de pais consanguíneos do segundo grau, com início de sintomas cerca dos 15 anos.

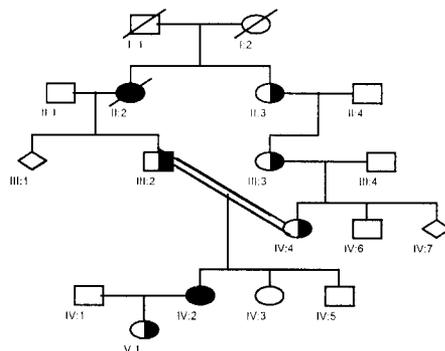


Fig.5: Genealogia da doente (IV:2) afectada de doença de Erb.  
(Dados colhidos pela Sra. Dra. Margarida Lima; programa Cyrillic 2.10).

Aos 17 anos fez biópsia muscular que pelo “quadro distrófico incipiente”, sugeriu a “exclusão de polimiosite”. A repetição de biópsia aos 23 anos revela “lesões distróficas graves com destruição do tecido muscular, substituído por tecido fibroso e fibroadiposo e sem alteração sugestiva de patologia inflamatória”. Actualmente com 33 anos apresenta incapacidade de se levantar dum assento e sérias limitações locomotoras (fase V/VI da escala de Gardner-Medwin e Walton, 1974).

A mutação ocorre no exão I, com 309 pn, alterou a migração das bandas, concorrendo para o efeito a alteração conformacional e a redução de tamanho. A perda de um desoxinucleótido de adenina causou desfasamento do código de leitura, ocorrendo um codão terminador (TGA)108 pn a jusante. Em principio seria produzida uma proteína truncada de 56 aminoácidos pertencente à sequência única NS do domínio I da sarcocalpaína, regulador da actividade catalítica (Imajoh, S. et al., 1986; Sorimachi, H. et al., 1989), sem qualquer hipótese funcional, mesmo se por hipótese o respectivo ARNm for

estável, o que parece improvável (Maquat, L., 1995; Bateman, J. et al., 1999). Logo trata-se de uma mutação nula.

Este exemplo ilustra a prescindibilidade da sarcocalpaína à fisiologia dos tipos de fibra muscular dominantes antes do aparecimento dos sinais e sintomas. Estes traduzirão as substituições progressivas em isoformas sarcomoleculares cuja funcionalidade exige sarcocalpaína funcional, que ocorrem na maturação normal do indivíduo, reflectindo a sua individualidade ontogenética e epigenética na diversidade da história natural da doença, sem correlação com o tipo de mutação.

A exclusão 60ΔA cria um sítio de corte para a SmaI proporcionando um método alternativo de análise da segregação na linhagem. Outras enzimas de restrição específicas para a mutação encontrada são a Aval, BstNI e XmaI, segundo o programa PC/GENE.

Os haplótipos definidos na genotipagem de marcadores polimórficos, para teste de efeito fundador, ligação ao locus da sarcocalpaína ou deriva genética, podem permitir no caso de haver haplótipos portadores recorrentes correlacionados com mutações específicas, passar directamente ao diagnóstico por sequenciação, cisão enzimática, ou RCP alélica específica do exão suspeito (Allamand, V. et al., 1995; Richard, I. et al. 1995, 1997; Urtasun, M., 1998).

A metodologia adoptada na detecção e diagnóstico da doença de Erb procura ser sensível ao predomínio de mutações pontuais recorrendo à discriminação de mutações por um método de rastreio adequado e à sequenciação automática como forma incontornável e expedita de diagnóstico genético. A inexistência de mutações predominantes ou agrupamento em exões específicos obriga à exploração total do gene.

Como métodos empregados no rastreio de doença de Erb tem sido usado e.g. o heteroduplex (HDP) etídio bromídico (Richard, I. et al., 1995 e 1997), o PCCS quimiluminescente (Urtasun, M. et al., 1998) e o PCCS isotópico (Chou, F. et al., 1999).

O HDP tem vantagens em exões pobres em GC, de 200 a 600 pn e na pesquisa de heterozigotia, patente no aumento do nº de bandas.

O PCCS tem demonstrado sensibilidade elevada nos exões ricos em CG até 300pn, nos exões pobres em GC até 200pn, ou nos intermédios a 4° C, embora a 4°C possam ocorrer bandas múltiplas metaestáveis (FMC BioProducts Catalog, 1998).

O método de rastreio usado neste trabalho foi o PCCS argêntico associando rapidez, baixo custo e menor toxicidade que os radioisótopos a uma sensibilidade da ordem do nanograma (Budowle, B. et al., 1991).

Os métodos de rastreio imunológicos não permitem afirmar que a sarcocalpaína presente seja funcional nem definir qual a mutação, requerem ainda cautela na interpretação de resultados quase normais (Anderson, L. et al., 1998), mas a ausência é de grande ajuda ao rastreio de mutações (Spencer, M. et al., 1997).

A existência de mionúcleos apoptóticos com IκBα (Baghdigian, S. et al., 1999) na DMC 2A muda o protagonismo da Genética Molecular no rastreio de doença de Erb nas DMCs para a Histopatologia. A fluorescência terminal de cortes genómicos (“TUNEL”) associada à imunofluorescência de IκBα vai permitir provavelmente de modo inequívoco caracterizar uma DMC por disfunção da miocalpaína como doença de Erb no estudo da biópsia muscular.

A análise genética molecular de genes grandes e o rastreio de populações requer metodologias eficientes, rápidas, económicas, de alta sensibilidade, reprodutibilidade, exactidão e produtividade.

Vários métodos tem surgido para selecção de produtos de RCP (Mullis, K., Faloona, F., 1987; Saiki, R. et al. 1988) a sujeitar a sequenciação para identificação de mutações desconhecidas, e.g.: a electroforese em gel de gradiente desnaturante (Fischer, S., Lerman, L., 1979; Myers, R. et al. 1987; Sheffield, V. et al., 1989; Satoh, C. et al., 1993), cisão química ou enzimática de desemparelhamentos (Cotton, R. et al., 1988; Winter, E. et al., 1985), electroforese de polimorfismos conformacionais de cadeia simples (Orita, M. et al., 1989), electroforese de heteroduplexes (Keen, J. et al. 1991; White, M. et al., 1992), electroforese de polimorfismos conformacionais de ARNm (Danenberg, P. et al. 1992; Sarkar, G. et al., 1992a), a electroforese conformacional de cadeia dupla (Saad, F. et al., 1994; Korkko, J. et al., 1998), PCCS com iniciadores fluorescentes (Makino, R. et al., 1992) e perfil-ddF uni- (Sarkar, G. et al., 1992b; Liu, Q. et al., 1994) e bidireccional (Liu, Q. et al., 1996).

A evolução, automatização e produção em larga escala de tecnologia microplaca de ADN (Southern, E., 1996) para análise de sequências baseada na hibridação ou polimerização sobre a totalidade de iniciadores possíveis, ou com iniciadores degenerados (Sachadyn, P., Kur, J., 1999), ou para detecção de polimorfismos mononucleotídicos por microfoco adsorção (Gilles, P. et al., 1999) ou sequenciação por microelectroforese capilar de alta velocidade (Liu, S. et al., 1999) poderá no futuro permitir análise mutacional mais eficiente, rápida e acessível.

Actualmente as propostas para enfrentar as solicitações crescentes ao diagnóstico de mutações desconhecidas passam pela aplicação de tecnologias de rastreio programáveis, de elevada produtividade, envolvendo injeção automática, recorrendo das propriedades de electroforese capilar automática (ECA) sob diversas condições de temperatura, articulada ao PCCS fluorescente. Esta metodologia em relação à EPCCS em placa reduz a carga de trabalho, aumenta a produtividade e reprodutibilidade ao reduzir o grau de manuseio pessoal, além de ao funcionar sobre uma gama de tamanhos de fragmentos maior e definir um perfil individualizante, capaz de discriminação alélica sem recurso a sequenciação, permitir um nível de resolução e exactidão superior (Larsen, L. et al., 1999). Se substituirmos a opção de iniciadores fluorescentes por didesoxinucleótidos fluorescentes, ainda mais sensível se torna o método, P-ddF, e para implementar esta metodologia apenas falta no IGMJM associar aos sequenciadores automáticos dispositivos de controlo de temperatura, para permitir operar sob diferentes condições experimentais (Ellison, J. et al., 1994; Liu, Q. 1994, 1996, 1999) intrínsecas à optimização dos métodos com componentes PCCS.

Enfim, a experiência adquirida na metodologia adoptada no rastreio e diagnóstico de mutações confirmou a simplicidade do método de rastreio por PCCS, mas também o carácter de passo limitante, tendo como pontos mais sensíveis a polimerização dos geis de "MDE" (FMC Bioproducts), devido à instabilidade do persulfato de amónio e o momento de inactivação da solução de carbonato de cálcio na coloração argêntica. A tentação de um pouco mais de tempo para melhorar a intensidade das bandas pode ser fatal. O outro óbice do método é o tempo. O método é extremamente demorado e para ser rentável obriga ao processamento de uma grande série de amostras. Mas apesar destas medidas a exploração de um gene com muitos exões é uma tarefa dantesca sem possibilidade de resultados a curto prazo a menos que se melhorem e aumentem os recursos disponíveis, além dos pequenos imponderáveis, que por vezes ao ocorrerem prejudicam consideravelmente o rendimento do trabalho. Por tudo isto é recomendável a automatização, por prescindir dos numerosos passos de intervenção humana, mais susceptíveis de erro no processamento de rotina de grandes séries, e permitir uma maior capacidade e rapidez de trabalho, eficiência e rigor, necessários a satisfazer

atempadamente as crescentes solicitações clínicas, além de que à semelhança do que é conhecido na história da industrialização ou informatização aplicada aos mais diversos sectores, se traduzir a médio prazo em melhor rentabilidade custo-produção que o processamento artesanal.

O método já foi avaliado por diversos autores, apresentando uma eficiência satisfatória, que melhora variando as condições de análise, as quais são estabelecidas empiricamente pelo método tentativa-erro. Apesar das virtudes do método, a fazer fé nas publicações seria melhor substituí-lo por um método perfil-ddF, ao que rezam inexcusável em termos de sensibilidade e rapidez (Liu, Q. et al., 1996, 1999) para melhorar a eficiência de atendimento às solicitações de análise genética molecular.

Neste trabalho não houve disponibilidade para definir as melhores condições relativamente às condições base adoptadas para o gene da miocalpaína. O melhor que se conseguiu foi definir para muitos dos exões normalidade sob as condições usadas e uma mutação, faltando ainda pelo menos mais duas para se assemelhar aos 6 % de DMC 2A obtidos no IGMJM admitindo idêntica homogeneidade da série.

A descoberta de apoptose mionuclear com I $\kappa$ B $\alpha$ , vai permitir reduzir o número de amostras a submeter ao rastreio, estritamente às que tiverem mutações de miocalpaína, pelo que a dificuldade irá se resumir ao rastreio entre os exões, eliminando o peso do rastreio entre amostras com DMCs de etiologias diversas.

## Conclusão

A doença de Erb define-se numa dicotomia crono-topológica onde após um período de latência grupos musculares específicos são sucessivamente atingidos na presença de outros que permanecem refractários evidenciando a heterogeneidade fisiológica da musculatura esquelética.

O fundamento da heterogeneidade na susceptibilidade à eclosão da doença radica em diferenças moleculares expressas em obediência a um programa de ontogénese (Crow, M. et al., 1986; d'Albis, A. et al., 1989; Russell, S. et al. 1993; Staron, R., Johnson, P., 1993; McKoy, G. et al., 1998) e senescência (Monemi, M. et al., 1998) inscrito nos genomas das diversas linhagens miogénicas (DiMario, J. et al., 1993; Barjot, C. et al., 1995).

Cada linhagem miogénica (Braun, T., Arnold, H., 1996; Ghosh, S., Dhoot, G., 1998, May, Oct; Edom-Vovard, F., et al., 1999) tem um programa próprio que define a agenda e as espécies das isoformas moleculares a exprimir (Butler-Browne, G. et al., 1984; d'Albis, A. et al., 1986; Hartley, R. et al., 1991; Soussi-Yanicostas, N. et al., 1990; Yablonka-Reuveni, Z. et al., 1990; Pavlath, G. et al., 1998).

Este programa prédefinido (Brand-Saberri, B., Christ, B., 1999) é praticamente autónomo (Silberstein, L. et al., 1986), ocorre independentemente do ambiente biológico, mas é susceptível de ser influenciado e.g. pelo ambiente hormonal (Mahdavi, V. et al., 1987; van der Linden, C. et al., 1996; Houmard, J. et al., 1999), inervação (Gundersen, K., 1998), desnervação (Yoshimura, K., Hairii, K., 1999), actividade (Goldspink, G. et al., 1991; Talmadge, R. et al., 1996), repouso (Taillandier, D. et al., 1996; Jankala, H. et al., 1997; Cros, N. et al., 1999), patologia (Sullivan, N. et al., 1997; Fang, C. et al., 1995), estimulação eléctrica (Cotter, M. et al., 1991; Pette, D., Vrbova, G., 1999), nutrição (Zdanowicz, M. et al., 1995 e 1997; Oumi, M., Yamamoto, T., 1999) e fármacos (Tsunekawa, N. et al., 1998; Vescovo, G. et al., 1998).

O isoformismo ocorre praticamente na generalidade das moléculas constituintes do músculo (Schiaffino, S., Reggiani, C., 1996), explica a plasticidade adaptativa do músculo esquelético (Pette, D., Staron, R., 1988, 1997) e o espectro de desempenho das miofibras (Bottinelli, R. et al., 1999).

As alterações moleculares que se têm de produzir para que a deficiência funcional da miocalpaína se manifeste, associada ao potencial polimorfo da agenda e isoformas explicam o tempo de latência, a variabilidade intra- e interfamiliar da evolução, devido a factores genéticos e epigenéticos individuais, e a selectividade de grupos musculares, pela diferença de programa em cada linhagem miogénica.

Uma intervenção terapêutica eficiente vai depender do grau de conhecimento adquirido no âmbito da fisiologia das variantes das linhagens miogénicas e do comportamento face a factores externos manipuláveis.

A suplementação nutritiva tem uma função fundamental na conservação da massa muscular nas distrofias (Winghertzan, M. et al., 1998; Zdanowicz, M. et al., 1995 e 1997). O défice ou o desequilíbrio nutritivo levam à aceleração da degradação muscular (Ilian, M. et al., 1992; Oumi, M., Yamamoto, T., 1999).

As situações inflamatórias ou infecciosas aceleram a atrofia muscular (Temparis, S. et al., 1994; Fang, C. et al., 1995; Tsujinaka, T. et al., 1996; Li, Y. et al., 1998) pelo que devem ser acauteladas e tratadas vigorosamente.

Há diversos fármacos com potencialidades na disfunção muscular e.g. inibidores das calpaínas (Wang, K. et al., 1994; Debiasi, R. et al., 1999; Iwamoto, H. et al., 1999), retentores do  $\text{Ca}^{2+}$  no retículo sarcoplásmico (Louis, C. et al., 1997; Fruen, B. et al., 1997; Manev, H. et al., 1997; Yu, Z. et al., 1999), inibidores da angiotensina (Vescovo, G. et al., 1998; Yamaguchi, F. et al., 1999), inibidores do sistema ubiquitina-proteassoma (Attaix, D., 1997; Breuille, M., 1993; Tischler, M. et al., 1997), esteróis (Lewis, M. et al., 1999) e inibidores da transição de potencial da

mitocôndria e.g. ciclosporina A, trifluoperazina, (Friberg, H. et al., 1998; Lemasters, J. et al., 1998), deprenil (Wadia, J. et al., 1998), 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> (Wang, X. et al., 1997), flupirtina (Zimmer, G. et al., 1998) e tamoxifeno (Custódio, J. et al., 1998).

A genética molecular além do contributo decisivo no diagnóstico da doença e participação fulcral no desvendar dos mecanismos fisiopatológicos é também o campo mais promissor no tratamento de doenças genéticas. A possibilidade de por recombinação homóloga substituir o gene mutado por um gene funcional sem outras alterações genómicas, em células precursoras colhidas do doente, cultivá-las e recolonizar, permitirá logo que se resolva o problema da eficiência da transfecção, extremamente baixa, libertar o doente da dependência terapêutica.

A injeção intramuscular de mioblastos de um dador já é prática corrente na D. M. de Duchenne. O êxito depende do uso de um protocolo adequado (Beauchamp, J., 1999; Law, P., 1994; Meyer, S. et al., 1984; Qu, Z. et al., 1998) e poderá ser estendida a outras distrofias. Outra hipótese a explorar é o transplante de medula óssea para produção de precursores mioblásticos funcionais (Ferrari, G. et al., 1998; Bittner, R. et al., 1999). Para obviar o inconveniente da dependência de dadores e imunossupressores o ideal seria administrar mioblastos do doente préviamente corrigidos *ex-vivo* (Yanez, R., Porter, A., 1998; Moisset, P. et al., 1998a,b) para a o defeito genético. Uma alternativa aos mioblastos é a mioconversão de fibroblastos (Huard, C. et al., 1998; Lattanzi, L. et al., 1998).

A existência de músculos que prescindem da miocalpaína por disporem de uma programação genética diferente, suscita a possibilidade de se tornarem fontes para autotransplante de células satélites que poderiam repor o potencial regenerativo em territórios diferentes dos destinados (Pavlat, G. et al., 1998).

A injeção intramuscular experimental de vectores víricos recombinantes no modelo animal da  $\delta$ -sarcoglicanopatia, aparentemente um sucesso, poderá tornar-se o modelo a recomendar nas DMCs (Greelish, J. et al., 1999; Holt, K. et al., 1998; Ishii, A. et al., 1999; Li, J. et al., 1999) se mantiverem níveis adequados de expressão indefinidamente. Outros vectores possíveis incluem e.g. os ligandossomas (Feero, W. et al., 1997), lipossomas e complexos de oligopéptidos sintéticos (Baranov, V. et al., 1998).

O estudo da expressão diferencial entre as miofibras pré- e pós-sintomáticas, refractárias e normais poderá contribuir para a elucidação dos mecanismos de maturação das miofibras e condições de dependência da função da miocalpaína no processamento de proteínas ou na homeostase do Ca<sup>2+</sup> e repercussão da desregulação no sistema I $\kappa$ B $\alpha$  /FN-kB.

O rastreio e diagnóstico de mutações sofreu uma revolução fundamental ao ser provada a existência de apoptose e presença de I $\kappa$ B $\alpha$  nos mionúcleos na doença de Erb. A biópsia adquiriu o potencial de assinalar a doença de Erb nas DMCs reservando-se à genética molecular a triagem exónica e definição das alterações na sequência nucleotídica da miocalpaína patológica.

No campo da genética molecular também se assiste a uma evolução tecnológica considerável. A automatização do PCCS recorrendo à electroforese capilar fluorescente permite tirar maior rendimento e melhorar a eficiência dos métodos de rastreio. A miniaturização em microplaca constitui o expoente máximo dessa evolução ao permitir passar para o domínio da microanálise e reduzir os custos de produção maximizando o número de amostras processáveis.

O rastreio e diagnóstico da doença de Erb na DMC pelo método de PCCS com sequenciação automática tem como passo limitante o PCCS em placa. Embora tecnicamente simples é demorado e requer a repetição sob diferentes condições experimentais para se atingir o máximo de sensibilidade.

A série de amostras rastreada neste trabalho não completou a exploração exónica nem foi testada sob outras condições experimentais, pelo que os resultados apresentados são provisórios, sendo de esperar que sejam encontradas mais algumas mutações.

A eventual automatização do rastreio permitirá obter resultados com maior eficiência e celeridade além de por efeito de escala reduzir os custos de produção.

A definição nosológica das DMCs analisadas contribuirá para um tratamento e prognóstico mais ajustado ao doente e por estudos subsequentes de segregação da mutação permitirá a detecção pré-sintomática, diagnóstico pré-natal e aconselhamento genético pelo rastreio de portadores na família.

A redução da prevalência pelo aconselhamento genético e a eventual evolução na metodologia do tratamento permitirá proporcionar uma qualidade de vida minimamente digna a qualquer pessoa afectada, reduzir o ónus material e psicológico ao recuperar o indivíduo para a normalidade funcional, limitando a ocorrência à incidência do acasalamento entre portadores de mutação e ou à mutação de novo nos gâmetas.

A mutação espontânea é um fenómeno intrínseco à biologia das moléculas naturais da célula, em princípio não irradicável, prejudicial quando gera alterações incompatíveis com a biologia celular, fisiologia ou ambiente, mas com o mérito da inovação biológica, permitindo aos organismos compatibilizarem-se com os mais diversos ecossistemas, gerar a diversidade biológica e a evolução das espécies pela selecção das melhor adaptadas. A manipulação das imperfeições genéticas naturais significa a concretização de modo próprio da transcendência dos limites biológicos impostos pelos mecanismos mutacionais mercê da selecção evolutiva de características reunidas na espécie humana criadoras das tecnologias capazes de acertar os passos em falso da evolução, i.e. a geração de mutações como erros inerentes ao processo intrínseco de funcionamento biológico resultou na evolução das espécies e na patologia genética. Este processo do tipo ensaio-erro ao gerar a espécie humana culminou na criação de um automecanismo capaz de corrigir o efeito patológico nos organismos, i.e. autocorrigir-se de modo inteligente.

# Referências

- Ainsworth, P. et al. Diagnostic single strand conformational polymorphism, (SSCP): A simplified non-radioisotopic method applied to a Tay-Sachs B1 variant. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19: 405-406.
- Allamand, V. et al. Genetic heterogeneity of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in a genetic isolate (Amish) and evidence of a new locus. *Hum. Mol. Genet.* 1995a; 4: 459-464.
- Allamand, V. et al. Preferential Localization of the Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2A Gene in the Proximal Part of a 1-cM 15q15.1-q15.3 Interval. *Am. J. Hum. Genet.* 1995b; 56: 1417-1430.
- Anderson, L. Optimized protein diagnosis in the autosomal recessive limb-girdle dystrophies. *Neuromusc. Disord.* 1996; 6: 443-446.
- Anderson, L. et al. 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 ( 4 ): 1169-1179.
- Anderson, L. et al. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Hum. Mol. Genet.* 1999; 8(5): 855-861.
- Arenzana-Seisdedos, F. et al. Inducible nuclear expression of newly synthesized I $\kappa$ B $\alpha$  negatively regulates DNA-binding and transcriptional activation of NF- $\kappa$ B. *Mol. Cell Biol.* 1995; 15: 2689-2696.
- Arenzana-Seisdedos, F. et al. Nuclear localization of I $\kappa$ B $\alpha$  promotes active transport of NF- $\kappa$ B from the nucleus to the cytoplasm. *J. Cell Sci.* 1997; 110: 369-378.
- Arikawa, K. et al. The frequency of patients with dystrophin abnormalities in a limb-girdle patient population. *Neurology.* 1991; 41: 1491-1496.
- Attaix, D. Expression of the 19S complex and of the PA28 activator in rat skeletal muscle. *Mol. Biol. Rep.* 1997; 24: 95.
- Ausma, J. et al. Dedifferentiated cardiomyocytes from chronic hibernating myocardium are ischemia-tolerant. *Mol. Cell Biochem.* 1998; 186 (1-2): 159-168.
- Bach, G. et al. Molecular analysis of Hurler syndrome in Druze and Muslim Arab patients in Israel: multiple allelic mutations of the IDUA gene in a small geographic area. *Am. J. Hum. Genet.* 1993; 53: 330-338.
- Baghdiguian, S. et al. Calpain 3 deficiency is associated with myonuclear apoptosis and profound perturbation of the I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B pathway in limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Nature Medicine.* 1999; 5 (5): 503-511.
- Baldassarre, F. et al. Regulation of NF- $\kappa$ B through the nuclear processing of p 105 (NF- $\kappa$ B1) in Epstein-Barr virus-immortalized B cell lines. *J. Biol. Chem.* 1995; 270 (52): 31244-31248.
- Baranov, V. et al. [Expression of the human dystrophin gene in mdx mouse muscle fibers after transfection using liposomes and synthetic oligopeptides.] *Genetika.* 1998; 34(7): 876-882.
- Barjot, C. et al. Expression of myosin heavy chain and of myogenic regulatory factor genes in fast or slow rabbit muscle satellite cell cultures. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 1995; 16(6): 619-628.
- Bashir, R. et al. A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 2p. *Hum. Mol. Genet.* 1994; 3: 455-457.
- Bashir, R. et al. A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet.* 1998; 20 (1): 37-42.
- Bateman, J. et al. Reliable and Sensitive Detection of Premature Termination Mutations Using a Protein Truncation Test Designed to Overcome Problems of Nonsense-Mediated mRNA instability. *Human Mutation.* 1999; 13: 311-317.
- Bauer, B. et al. Cloning of synthetic oligodeoxynucleotides may result in high frequency promoter mutation in *E. coli*. *Nucleic Acid Res.* 1989; 17: 812.
- Batten, F. The myopathies or muscular dystrophies. *Q. J. Med.* 1909; 3: 313.
- Baumann, Bernd et al. The mutant Plasmacytoma Cell Line S107 Allows Identification of Distinct Pathways Leading to NF- $\kappa$ B Activation. *J. Biol. Chem.* 1998; 273 (19): 11448-11455.
- Beauchamp, J. et al. Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. *J. Cell Biol.* 1999; 144 (6): 1113-11122.
- Beckmann, J. et al. A gene for limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 15 by linkage. *CR Acad. Sci. Paris.* 1991; 312: 141-148.
- Beckmann, J. et al. Identification of muscle-specific calpain and  $\beta$ -sarcoglycan genes in progressive autosomal recessive muscular dystrophies. *Neuromusc. Disord.* 1996; 6: 455-462.

- Beg., A. et al. Activation of multiple NF- $\kappa$ B/Rel DNA-binding complexes by tumor necrosis factor. *Oncogene*. 1994; 9 (5): 1487-1492.
- Bell, J. On pseudohypertrophic and allied types of progressive muscular dystrophy. Em: Fischer, R. editor. *The treasury of human inheritance*, Vol. 4, Pt. 4. London: Cambridge University Press, 1943: 283-342.
- Ben Hamida, M. et al. Severe childhood muscular dystrophy affecting both sexes frequent in Tunisia. *Muscle Nerve*. 1983; 6: 469-480.
- Ben Othmane, K. Linkage of Tunisian autosomal recessive Duchenne-like muscular dystrophies to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nat. Genet.* 1992; 2: 315-317.
- Berti, P., Storer, A. Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases. *J. Mol. Biol.* 1995; 246: 273-283
- Bittner, R. et al. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat. Embryol. (Berl.)*. 1999; 199(5): 391-396.
- Blackwell, T., Weintraube, H. Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science*. 1990; 250: 1104-1110.
- Bonnemann, C. et al.  $\beta$ -sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nat. Genet.* 1995; 11: 266-273.
- Bottinelli, R., et al. Specific contributions of various muscle fibre types to human muscle performance: an in vitro study. *J. Electromyogr. Kinesiol.* 1999; 9 (2): 87-95.
- Botstein, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genetics*. 1980; 69: 201-205.
- Bradley, W. The limb-girdle syndromes. Em: Vinken, P., Bruyn, G., Ringel, S., editors. *Handbook of clinical neurology*, Vol. 40. Amsterdam: North-Holland, 1979: 433-469.
- Brand-Saberi, B., Christ, B. Genetic and epigenetic control of muscle development in vertebrates. *Cell Tissue Res.* 1999; 296(1): 199-212.
- Braun, T., Arnold, H. Myf-5 and myoD are activated in distinct mesenchymal stem cells and determine different skeletal muscle cell lineages. *EMBO J.* 1996; 15 (2): 310-318.
- Breuille, M. Pentoxifylline decreases body weight loss and muscle protein wasting characteristics of sepsis. *Am. J. Physiol.* 1993; 265: E660.
- Brooke, M. A clinician's view of neuromuscular diseases. Baltimore: Williams and Wilkins, 1977.
- Brown, G. Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999; 1411 (2-3): 351-359.
- Brown, K. et al. Mutual regulation of the transcriptional activator NF- $\kappa$ B and its inhibitor, I $\kappa$ B $\alpha$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993; 90(6): 2532-2536.
- Bucher, P. Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J. Mol. Biol.* 1990; 212: 563-578.
- Budowle, B. et al. Analysis of the VNTR locus DIS 80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am. J. Hum. Genetics*. 1991; 48: 137-144.
- Bushby, K., Beckmann, J. Report of the 30<sup>th</sup> and 31<sup>st</sup> ENMC International Workshop—the limb-girdle muscular dystrophies—and proposal for a new nomenclature. *Neuromusc. Disord.* 1995; 5: 337-344.
- Butler-Browne, G. et al. Myosin isozyme transitions occurring during the postnatal development of the rat soleus muscle. *Dev. Biol.* 1984; 102(2): 324-334.
- Chelly, J. et al. Illegitimate transcription: Transcription of any gene in any cell type. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989; 86: 2617-2621.
- Chakraborti, T. et al. Oxidant, mitochondria and calcium: an overview. *Cell Signal.* 1999; 11(2): 77-85.
- Chiannilkulehai, N. et al. A primary expression map of the chromosome 15q15 region containing the recessive form of limb-girdle muscular dystrophy (LGMD 2A) gene. *Hum. Mol. Genet.* 1995; 4: 717-725.
- Chien, M. et al. Fas-induced B cell apoptosis requires an increase in free cytosolic magnesium as an early event. *J. Biol. Chem.* 1999; 274 (11): 7059-7066.
- Choi, J. et al. Phorbol esters selectively and reversibly inhibit a subset of myofibrillar genes responsible for the ongoing differentiation program of chick skeletal tubes. *Mol. Cell Biol.* 1991; 11(9): 4473-4482.
- Chou, F. et al. Calpain III mutation analysis of a heterogeneous limb-girdle muscular dystrophy population. *Neurology*. 1999; 52: 1015-1020.

- Chutkov, J. et al. Adult-onset autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* 1986; 20: 240-248.
- Claudio, E. et al. Molecular mechanisms of TNF $\alpha$  cytotoxicity: activation of NF- $\kappa$ B and nuclear translocation. *Exp. Cell Res.* 1996; 224 (1): 63-71.
- Cooper, D., Youssoufian, H. The CpG dinucleotide and the human genetic disease. *Hum. Genet.* 1988; 78: 151-155.
- Cotter, M. et al. Chronic stimulation accelerates functional recovery of immobilized soleus muscles of the rabbit. *Exp Physiol.* 1991; 76(2):201-212.
- Cotton, R. et al. Reactivity of cytosine and thymine in single-base-pair mismatches with hydroxylamine and osmium tetroxide and its application to the study of mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988; 43:97-4401.
- Cotton, R. and Scriver, C. Proof of "Disease Causing" Mutation. *Human Mutation.* 1998; 12: 1-3.
- Couly, G. et al. The development fate of the cephalic mesoderm in quail-chick chimeras. *Development* 1992;114:1-15.
- Crisona, N. et al. Inhibition of contraction of cultured muscle fibres results in increased turnover of myofibrillar proteins not of intermediate-filament proteins. *J. Cell Biol.* 1983; 96(3): 684-692.
- Cros, N. et al. Upregulation of M-creatine kinase and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase: two markers of muscle disease. *Am J Physiol* 1999; 276(2 Pt 2):R308-316.
- Crow, M. et al. The Development program of fast myosin heavy chain expression in avian skeletal muscles. *Devel Biol.* 1986;118 (2): 333-342.
- Custódio, J. et al. Tamoxifen inhibits induction of the mitochondrial permeability transition by Ca<sup>2+</sup> and inorganic phosphate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1998; 152(1): 10-17.
- Danenberg, P. et al. Detection of point mutations in human DNA by analysis of RNA conformation polymorphism(s). *Nucleic Acid Res.* 1992; 20: 573-579.
- d'Albis, A. et al. Specific programs of myosin expression of rat muscles. *Eur J Biochem* 1989; 183(3):583-590.
- d'Albis, A. et al. Comparison of myosins from the masseter muscle of the adult rat, mouse and guinea-pig. Persistence of neonatal-type isoforms in the murine muscle. *Eur. J. Biochem.* 1986; 156(2): 291-296.
- De Coster, W. et al. A late autosomal dominant form of limb-girdle muscular dystrophy. A clinical, genetic, and morphological study. *Eur. Neurol.* 1974; 12: 159-172.
- De Strooper, B. et al. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature.* 1998; 391(6665): 387-390.
- De Ubeda, B. Formule clinique et evolution longitudinale de la Dystrophie Musculaire des Ceintures "réunionnaise", Vol. I. Tours: Faculty of Medicine. Med. Thesis, 1992.
- Debiasi, R. et al. Reovirus-induced apoptosis is preceded by increased cellular calpain activity and is blocked by calpain inhibitors. *J. Virol.* 1999; 73(1): 695-701.
- DiMario, J. et al. Myoblasts transferred to the limbs are committed to specific fibre fates. *Nature.* 1993; 362(6416): 165-167.
- Dinçer, P. et al. A biochemical, genetic, and clinical survey of autosomal recessive limb girdle muscular dystrophies in Turkey. *Ann. Neurol.* 1997; 42: 222-229.
- Dolmetsch, R. et al. Calcium oscillations increase in the efficiency and specificity of gene expression. *Nature.* 1998; 392 (6679): 933-936.
- Dubowitz, V. Rapidly progressive limb girdle muscular dystrophy in childhood. Em Angelini, C. et al. editors. *Muscular dystrophy research: advances and new trends.* Amsterdam; Excerpta Medica. 1980; 129-133.
- Dynan, W., Tjian, R. The promoter-specific transcription factor binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell.* 1983; 35: 79-87.
- Eadie, J. et al. Guanine modification during chemical DNA synthesis. *Nucleic Acid Res.* 1987; 15: 8333-8349.
- Edom-Vovard, F. et al. The four populations of myoblasts involved in human limb formation are present from the onset of myotube formation. *J. Cell Sci.* 1999; 112 (Pt 2): 191-199.
- Ellison, J. et al. Detection of mutations and polymorphisms using fluorescent-based dideoxy fingerprinting (F-ddF). *Biotechniques.* 1994; 17(4): 742-743, 746-747, 748-753.
- Engel, A. et al. Section Sixteen-Diseases of Muscle (Myopathies) and Neuromuscular Junction. Em: Burnett and Plum editors. *Cecil Textbook of Medicine, 20<sup>th</sup> ed.,* W.B. Saunders Company. 1996: 2158-2173.

- Erb, W. Ueber die "juvenile Form" der progressiven Muskelatrophie und ihre Beziehungen zur sogentagen Pseudohypertrophie der Muskeln. Deut. Arch. Klin. Med. 1884; 34: 467-519.
- Erb, W. Dystrophia muscularis progressiva: Klinische und pathologisch anatomische Studien. Deut. Nervenheilk. 1891; 1: 13-94, 173-261.
- Esker, R. et al. Bax-induce cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg<sup>2+</sup> ions. J. Cell Biol. 1998; 143 (1): 217-224.
- Eymard, B. et al. Primary adhalinopathy ( $\alpha$ -sarcoglycanopathy): clinical, pathological and genetic correlation in twenty patients with autosomal recessive muscular dystrophy. Neurology. 1997; 1227-1234.
- Fang, C. et al. Insulin-like growth factor I stimulates protein synthesis and inhibits protein breakdown in muscle from burned rats. J. Parenter. Enter. Nutr., 1997; 21 (5): 245-251.
- Fardeau, M. et al. Juvenile limb-girdle muscular dystrophy. Clinical, histopathological and genetic data from a small community living in the Reunion Island. Brain. 1996a; 119: 295-308.
- Fardeau, M. et al. Chromosome 15-Linked Limb-Girdle Muscular Dystrophy: Clinical Phenotypes in Reunion Island and French Metropolitan Communities. Neuromusc. Disord. 1996b; 6: 447-455.
- Federici, C. et al. Purification and identification of two putative autolytic sites in human calpain 3 (p94) expressed in heterologous systems. Arch. Biochem. Biophys. 1999; 363 (2): 237-245.
- Fero, W. et al. Selection and use of ligands for receptor-mediated delivery to myogenic cells. Gene Ther. 1997; 4(7): 664-674.
- Ferran, C. et al. A20 inhibits NF- $\kappa$ B activation in endothelial cells without sensitizing to TNF-mediated apoptosis. Blood. 1998; 91 (7): 2249-2258.
- Ferrari, G. et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. Science. 1998; 279: 1528-1530.
- Ferrari, M. et al. A calcium signaling cascade essential for myosin thick filament assembly in *Xenopus* myocytes. J. Cell Biol. 1998; 141 (6): 1349-13456.
- Fischer, S., Lerman, L. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. Cell. 1979; 16: 191-200.
- Fougerousse, F. et al. Mapping of a chromosome 15 region involved in limb girdle muscular dystrophy. Hum. Mol. Genet. 1994; 3: 285-293.
- Fougerousse, F. et al. Expression of Genes (CAPN3, SGCA, SGCB, and TTN) Involved in Progressive Muscular Dystrophies during Early Human Development. Genomics. 1998; 48: 145-156.
- Friberg, H. et al. Cyclosporin A, but not FK506, protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates the mitochondrial permeability transition in cell death. J. Neurosci. 1998; 18 (14): 5151-5159.
- Frost, R. et al. Transient exposure of human myoblasts to tumor necrosis factor-alpha inhibits serum and insulin-like growth factor-I stimulated protein synthesis. Endocrinology. 1997; 138 (10): 4153-4159.
- Fruen, B. et al. Dantrolene inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release by direct and specific action at skeletal muscle ryanodine receptors. J. Biol. Chem. 1997; 272(43): 26965-26971.
- Gardner-Medwin, G., Walton, J. The clinical examination of the voluntary muscles. Em: Walton J.N. editor. Disorders of voluntary muscles. 3<sup>rd</sup> ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1974: 517-560.
- Ghosh, S., Dhoot, G. Evidence for distinct fast and slow myogenic cell lineages in human foetal skeletal muscle. J. Muscle Res. Cell Motil. 1998 May; 19 (4): 431-441.
- Ghosh, S., Dhoot, G. Both avian and mammalian embryonic myoblasts are intrinsically heterogeneous. J. Muscle Res. Cell Motil. 1998 Oct; 19 (7): 787-795.
- Gil, J. et al. Induction of apoptosis by double-stranded-RNA-dependent protein kinase (PKR) involves the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 and NF- $\kappa$ B. Moll. Cell. Biol. 1999; 19(7): 4653-4663.
- Gilchrist, J. et al. Clinical and genetic investigation in autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. Neurology. 1988; 38: 5-9.
- Gilles, P. et al. Single nucleotide polymorphic discrimination by an electronic dot blot assay on semiconductor microchips. Nat. Biotechnol. 1999; 17 (4): 365-370.
- Glavac, D. et al. Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for the detection of point mutations. Human Mutation 1993; 2: 404-414.
- Goldspink, G. et al. Stretch and force generation induce rapid hypertrophy and myosin isoform gene switching in adult skeletal muscle. Biochem. Soc. Trans. 1991; 19(2): 368-373.

- Gondret, F. et al. Myosin isoform transitions in four rabbit muscles during postnatal growth. *J Muscle Res. Cell Motil.* 1996; 17 (6): 657-667.
- Gosset, L. et al. A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple specific genes. *Mol. Cell Biol.* 1989; 9: 5022-5033.
- Greelish, J. et al. Stable restoration of the sarcoglycan complex in dystrophic muscle perfused with histamine and a recombinant adeno-associated viral vector. *Nat. Med.* 1999; 5(4): 439-443.
- Griscavage, J. et al. Inhibitors of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF- $\kappa$ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 93 (8): 3308-3312.
- Groden, J. et al. Mutation analysis of patients with adenomatous polyposis: identical inactivating mutations in unrelated individuals. *Am. J. Hum. Genet.* 1993; 52: 263-272.
- Grumont, R. et al. Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation-induced apoptosis. *Genes Dev.* 1999. 13(4): 400-411.
- Gundersen, K. Determination of muscle contractile properties: the importance of the nerve. *Acta Physiol. Scand.* 1998; 162(3): 333-341.
- Guo, Q. et al. Calbindin D28k blocks the proapoptotic actions of mutant presenilin 1: reduced oxidative stress and preserved mitochondrial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998 Mar; 95(6): 3227-3232.
- Guo, Q. et al. Secreted beta-amyloid precursor protein counteracts the proapoptotic action of mutant presenilin-1 by action of NF- $\kappa$ B and stabilization of calcium homeostasis. *J. Biol. Chem.* 1998 ; 273(20): 12341-12351.
- Hack, A. et al.  $\gamma$ -sarcoglycan deficiency leads to muscle membrane defects and apoptosis independent of dystrophin. *J. Cell. Biol.* 1998; 142: 1279-1287.
- Halestrap, A. et al. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim. Biophys. Acta.* 1998; 1366(1-2): 79-94.
- Han, Y. et al. Tumor necrosis factor  $\alpha$ -inducible I $\kappa$ B $\alpha$  proteolysis mediated by cytosolic m-calpain. A mechanism parallel to the ubiquitin-proteasome pathway for NF- $\kappa$ B activation. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 787-794.
- Hartley, R. et al. Myoblasts from fetal and adult skeletal muscle regulate myosin expression differently. *Dev. Biol.* 1991; 148(1): 249-260.
- Hayashi, K., Yandell, D. How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat.* 1993; 2: 338-346.
- Hodgkin, J. Sex determination in the nematode *C. elegans*: analysis of tra-3 suppressors and characterization of fem genes. *Genetics.* 1986; 114 (1): 15-52.
- Holt, K. et al. Functional rescue of the sarcoglycan complex in the BIO 14.6 hamster using delta-sarcoglycan gene transfer. *Mol. Cell.* 1998;1(6): 841-848.
- Houmar, J. et al. Impact of hyperinsulinemia on myosin heavy chain gene regulation. *J. Appl. Physiol.* 1999; 86 (6): 1828-1832.
- Huard, C. et al. Transplantation of dermal fibroblasts expressing MyoD1 in mouse muscles. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1998; 248(3): 648-654.
- Huan, M. et al., Gene expression of calpains and their specific endogenous inhibitor, calpastatin, in skeletal muscle of fed and fasted rabbits. *Biochem. J.* 1992; 287; (Pt 1):163-171.
- Imajoh, S. et al. Limited autolysis of calcium-activated neutral protease (CANP): reduction of the Ca<sup>2+</sup> requirement is due to NH<sub>2</sub>-terminal processing of the large subunit. *J. Biochem.* 1986; 100: 633-642.
- Inazuka, M. et al. A streamlined mutation detection system: multicolor post-PCR fluorescence labeling and single-strand conformational polymorphism analysis by capillary electrophoresis. *Genome Res.* 1997; 7: 1094-1103.
- Ishii, A. et al. Effective adenovirus-mediated gene expression in adult murine skeletal muscle. *Muscle Nerve.* 1999; 22(5): 592-599.
- Iwahana, H. et al. Multiple fluorescence-based PCR-SSCP analysis with postlabeling. *PCR Methods Appl.* 1995; 4: 275-282.
- Iwamoto, H. et al. Calpain inhibitor-1 reduces infarct size and DNA fragmentation of myocardium in ischemia/reperfused rat heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1999; 33(4): 580-586.
- Jankala, H. et al. Myosin heavy chain mRNA transform to faster isoforms in immobilized skeletal muscle: a quantitative PCR study. *J Appl. Physiol* 1997; 82(3): 977-982.
- Kanters, J. et al. A novel donor splice site mutation in the KVLQT1 gene is associated with Long QT Syndrome. *J. Cardiovasc. Electrophys.* 1998; 9: 620-624.
- Kass, G. et al. Calcium signaling and citotoxicity. *Environment Health Perspect.* 1999; 107 Suppl 1: 25-35.

- Kataoka, A. et al. NADH dehydrogenase deficiency in an apoptosis-resistant mutant isolated from a human HL-60 leukemia cell line. *Cancer Res.* 1997; 57 (23): 5243-5245.
- Katsuyama, K. et al. Role of NF- $\kappa$ B activation in cytokine- and spingomyelinase-stimulated inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology.* 1998; 139(11): 4506-4512.
- Kaufman, R. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* 1999; 13(10): 1211-1233.
- Kawamura, I. et al. Intratumoral injection of oligonucleotides to the NF- $\kappa$ B binding site inhibits cachexia in a mouse tumor model. *Gene Ther.* 1999; 6 (1): 91-97.
- Kcen, J. et al. Rapid detection of single base mismatches as heteroduplexes on Hydrolink gels. *Trends Genet.* 1991; 7: 5.
- Keohavong, P. et al. Fidelity of DNA polymerase in DNA amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989; 89: 9253-9257.
- Khang, S. et al. Involvement of transglutaminase in myofibril assembly of chick embryonic myoblasts in culture. *J. Cell Biol.* 1995; 130(5): 1127-1136.
- Kinbara, K. et al. Muscle specific calpain, p94, interacts with the extreme C-terminal region of connectin, a unique region flanked by two immunoglobulin C2 motifs. *Arch. Biochem. Biophys.* 1997; 342: 99-107.
- Kinbara, K. et al. Purification of native p94, a muscle-specific calpain, and characterization of its autolysis. *Biochem. J.* 1998; 335: 589-596.
- Kinbara, K. et al. Skeletal muscle-specific calpain, p94: structure and physiological function. *Biochem. Pharmacol.* 1998; 56 (4): 415-420.
- Korkko, J. et al. Conformation sensitive gel electrophoresis for simple and accurate detection of mutations: comparison with denaturing gradient gel electrophoresis and nucleotide sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998; 95(4): 1681-1685.
- Kozak, M. et al. Compilation and analysis of sequences upstream from the translation start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 1984; 12: 857-872.
- Krajewski, S. et al. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96 (10): 5752-5757.
- Krawczak, M. et al. Polymerase chain reaction: replication errors and reliability of gene diagnosis. *Nucleic Acid Res.* 1989; 17: 2197-2201.
- Kretz-Remy, C. et al. Amino Acid Activate NF- $\kappa$ B through Redox-dependent I $\kappa$ B $\alpha$  Degradation by the Proteasome without Apparent I $\kappa$ B $\alpha$  Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 1998; 273 (6): 3180-3191.
- Kukita, Y. et al. SSCP analysis of long DNA fragments in low pH gel. *Hum Mutat.* 1997; 10: 400-407.
- Larsen, L. et al. High-Throughput Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis by Automated Capillary Electrophoresis: Robust Multiplex Analysis and Pattern-Based Identification of Allelic Variants. *Hum. Mutat.* 1999; 13: 318-327.
- Lattanzi, L. et al. High efficiency myogenic conversion of human fibroblasts by adenoviral vector-mediated MyoD gene transfer. An alternative strategy for ex-vivo gene therapy of primary myopathies. *J. Clin. Invest.* 1998; 101(10): 2119- 2128.
- Law, P. *Gene Therapy for Muscular Dystrophy.* Texas: R.G. Landes. 1994; 83-135.
- Lemasters, J. et al. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochem. Biophys. Acta.* 1998; 1366(1-2): 177-196.
- Lewis, M. et al. Alterations in diaphragm contractility after nandrolene administration: an analysis of potential mechanisms. *J. Appl. Physiol.* 1999; 86(3): 985-992.
- Li, J. et al. rAAV vector -mediated sarcoglycan gene transfer in a hamster model for limb girdle muscular dystrophy. *Gene Ther.* 1999; 6(1): 74-82.
- Li, Y. et al. Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF- $\kappa$ B activation in response to TNF $\alpha$ . *FASEB J.* 1998; 12 (10): 871-880.
- Lim, L. et al.  $\beta$ -sarcoglycan (43 DAG): characterization and involvement in a recessive form of limb-girdle muscular dystrophy linked to chromosome 4q12. *Nat. Genet.* 1995; 11: 257-265.
- Lin, B. et al. NF- $\kappa$ B functions as both proapoptotic and antiapoptotic regulatory factor within a single cell type. *Cell Death Differ.* 1999; 6(6): 570-582.
- Lin, K. et al. Suppression of steady-state, but not stimulus-induced NF- $\kappa$ B activity inhibits alpha-virus induced apoptosis. *J. Cell. Biol.* 1998; 141 (7): 1479-1487.

- Lin, Z. et al. Sequential disassembly of myofibrils induced by myristate acetate in cultured myotubes. *J. Cell Biol.* 1987; 105(3): 1365-1376.
- Lin, Z. et al. Prevention of brefeldin A-induced resistance to teniposide by the proteasome inhibitor MG-132: involvement of NF- $\kappa$ B activation in drug resistance. *Cancer Res.* 1998; 58(14): 3059-3065.
- Lin, Y. et al. Activation of NF- $\kappa$ B requires proteolysis of the inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$ : signal-induced phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  alone does not release active NF- $\kappa$ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92 (2): 552-556.
- Liu, J. et al. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Myoshi myopathy and limb-girdle muscular dystrophy. *Nature Genetics.* 1998; 20 (1): 31-36.
- Liu, S. et al. Optimization of high-speed DNA sequencing on microfabricated capillary electrophoresis channels. *Anal. Chem.* 1999; 71(3): 566-573.
- Liu, H. et al. Endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and calreticulin prevent oxidative stress, Ca<sup>2+</sup> disturbances, and cell death in renal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 1997; 272(35): 21751-21759.
- Liu, Q. et al. Parameters affecting the sensitivities of dideoxy fingerprinting and SSCP. *PCR Methods Appl.* 1994; 4(2): 97-108.
- Liu, Q. et al. Bi-directional dideoxy fingerprinting (Bi-ddF): a rapid method for quantitative detection of mutations in genomic regions of 300-600 bp. *Hum. Mol. Genet.* 1996; 5(1): 107-114.
- Liu, Q. et al. Detection of virtually all mutations-SSCP (DOVAM-S): a rapid method for mutation scanning with virtually 100% sensitivity. *Biotechniques.* 1999; 26 (5): 932, 936-938, 940-942.
- Louis, C. et al. Dantrolene inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release by direct and specific action at skeletal muscle ryanodine receptors. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 26965.
- Mahdavi, V. et al. Developmental and hormonal regulation of sarcomeric myosin heavy chain gene family. *Circ. Res.* 1987; 60 (6): 804-814.
- Makino, R. et al. F-SSCP: fluorescence-based polymerase chain reaction-single stranded conformation polymorphism (PCR-SSCP) analysis. *PCR Methods Appl.* 1992; 2: 10-13.
- Manev, H. et al. Characterization of zinc-induced neuronal death in primary cultures of rat cerebellar granule cells. *Exp. Neurol.* 1997; 146 (1): 171-178.
- Mann, D. The effect of TNF- $\alpha$  on cardiac structure and function: a tale of two cytokines. *J. Card. Fail.* 1996; 2 (4 Suppl): S165-S172.
- Maquat, L. When cells stop making sense: effects of nonsense codons on RNA metabolism in vertebrate cells. *RNA.* 1995; 1: 453-465.
- Markoff, A. et al. Optimization of single-strand conformation polymorphism analysis in the presence of polyethylene glycol. *Clin. Chem.* 1997; 43(1): 30-33.
- May, M. et al. Rel/NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: an overview. *Semin. Cancer Biol.* 1997; 8(2): 75-82.
- Mayo, M. et al. Requirement of NF- $\kappa$ B activation to suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenic ras. *Science.* 1997; 278: 1812-1815.
- McKoy, G. et al. Differential expression of myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in four functionally diverse rabbit skeletal muscles during pre- and postnatal development. *Dev. Dyn.* 1998; 211(3): 193-203.
- Mendell, J. et al. Disease of muscle, Chap. 383. Em: Fauci, A. et al. eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 14<sup>th</sup> Ed., McGraw-Hill Health Professional Division 1998: 2473-2461.
- Messina, D. et al. Linkage of familial dilated cardiomyopathy with conduction defect and muscular dystrophy to chromosome 6q23. *Am. J. Hum. Genet.* 1997; 61: 909-917.
- Meyer, S. et al. Enhancement of muscle regeneration by bone marrow cells in the monkey. *Experientia.* 1984; 40(5): 490-492-
- Meyerhans, A. et al. DNA recombination during PCR. *Nucleic Acid Res.* 1990; 18 ( 7 ): 1687-1691.
- Michaud, J. et al. Strand-separating conformational polymorphism analysis: efficacy of detection of point mutations in the human ornithine  $\delta$ -aminotransferase gene. *Genomics.* 1992; 13: 380-394.
- Miller, S. et al. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16(3): 1215.
- Minetti, C. et al. Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nature Genetics.* 1998; 18: 365-368.
- Minty, A., Kedes, L. Upstream regions of the human cardiac actin gene that modulate its transcription in muscle cells: presence of an evolutionarily conserved repeated motif. *Mol. Cell Biol.* 1986;6: 2125-2136.

- Miyamoto, S. et al. TNF- $\alpha$ -induced phosphorylation of I $\kappa$ B is a signal for its degradation but not for dissociation from NF- $\kappa$ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994; 12740-12744.
- Moisset, P. et al. Expression of human dystrophin following the transplantation of genetically modified mdx myoblasts. *Gene Ther.* 1998 a; 5 (10):1340-1346.
- Moisset, P. et al. Successful transplantation of genetically corrected DMD myoblasts following ex vivo transduction with the dystrophin minigene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998 b; 247(1): 94-99.
- Monemi, M. et al. Adverse changes in fibre type composition of the human masseter versus biceps brachii muscle during aging. *J. Neurol. Sci.* 1998; 154(1):35-48.
- Moreira, E. et al. The seventh form of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy is mapped to 17q11-12. *Am. J. Hum. Genet.* 1997; 61: 151-159.
- Munsat, T. Classification of human dystrophies and pathogenesis of human muscular dystrophies. *Proceedings of the V<sup>th</sup> International Congress on Neuromuscular Diseases.* Amsterdam: Excerpta Medica; 1977: 23-31.
- Mullis, K., Faloona, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987; 155: 335-350.
- Murphy, M. Nitric oxide and cell death. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999; 1411 (2-3): 401-414.
- Myers, R. et al. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 1987; 155: 501-527.
- Newton, C. et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 1989; 17: 2503-2516.
- Oral, H. Sphingosine mediates the immediate negative inotropic effects of TNF- $\alpha$  in the adult mammalian cardiac myocyte. *J. Biol. Chem.* 1997; 272 (8): 4836-4842.
- Ohno, S. et al. Four genes for the calpain family locate on four different chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* 1989; 51, 1054.
- Olive, M. et al. Apoptosis is not the mechanism of cell death of muscle fibers in human muscular dystrophies and inflammatory myopathies. *Muscle Nerve.* 1997; 20(10):1328-1330.
- Ono, Y. et al. Functional defects of a muscle-specific calpain, p94, caused by mutations associated with limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 1078-1080.
- Orita, M. et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86:2766-2770.
- Oumi, M., Yamamoto, T. Ultrastructural changes in myocardial cells of rats fed a low protein diet. *Virchows Arch.* 1999; 434 (2): 159-165.
- Pahl, H. et al. Activation of transcription factor NF- $\kappa$ B by the adenovirus E3/19K protein requires its ER retention. *J. Cell. Biol.* 1996;132(4): 511-512.
- Pahl, H. et al. The ER-overload response: activation of NF- $\kappa$ B. *Trends Biochem. Sci.* 1997; 22(3): 63-67.
- Pahl, H. Signal transduction from the endoplasmic reticulum to the cell nucleus. *Physiol. Rev.* 1999; 79(3): 638-701.
- Passos-Bueno, M. et al. Evidence of genetic heterogeneity in the autosomal recessive adult forms of limb-girdle muscular dystrophy following linkage analysis with 15q probes in Brazilian families. *J. Med. Genet.* 1993; 30: 385-387.
- Passos-Bueno, M. et al. Main clinical features of the three mapped autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies and estimated proportion of each form in 13 Brazilian families. *J. Med. Genet.* 1996;33: 97-102.
- Passos-Bueno, M. et al. Seven Autosomal Recessive Limb-Girdle Muscular Dystrophies in the Brazilian Population: From LGMD2A to LGMD2G. *Am J Med Genet.* 1999; 82: 392-398.
- Pavlyth, G. et al. Heterogeneity among muscle precursor cells in adult skeletal muscles with differing regenerative capacities. *Dev. Dyn.* 1998; 212(4): 495-508.
- Pette, D., Staron, R. Molecular basis of the phenotypic characteristics of mammalian muscle fibres. *Cyba Found. Symp.* 1988; 138: 22-34.
- Pette, D., Vrbova, G. What does chronic electrical stimulation teach us about muscle plasticity? *Muscle Nerve* 1999; 22(6): 666-677.
- Penisson-Besnier, I. et al., Pseudometabolic expression and phenotypic variability of calpain deficiency in two siblings. *Muscle Nerve.* 1998; 21(8): 1078-1080.
- Poussard, S. et al. Evidence for implication of muscle-specific calpain (p94) in myofibrillar integrity. *Cell Growth Differ.* 1996; 7 (11): 1461-1469.

- Pratt, V. et al. DNA Studies of Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2A in the Amish Exclude a Modifying Mitochondrial Gene and Show no Evidence for a Modifying Nuclear Gene. *Am. J. Hum. Genet.* 1997; 61: 231-233.
- Qian, T. et al. The mitochondrial permeability transition mediates both necrotic and apoptotic death of hepatocytes exposed to Br-A23187. *Toxic Appl. Pharmacol.* 1999; 154(2): 117-125.
- Qu, Z. et al. Development of approaches to improve cell survival in myoblasts transfer therapy. *J. Cell Biol.* 1998; 142 (5): 1257-1267.
- Quillet-Mary, A. et al. Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1997; 272(34): 21388-21395.
- Richard, I. et al. Mutations in the Proteolytic Enzyme Calpain 3 Cause Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2A. *Cell.* 1995; 81: 27-40.
- Richard, I. et al. How neutral are synonymous codon mutations. *Nature Genetics.* 1995; 10: 259.
- Richard, I. et al. Multiple Independent Molecular Etiology for Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2A Patients from Various Geographical Origins. *Am J Hum Genet.* 1997; 60: 1128-1138.
- Richard, I. et al. Calpainopathy –A survey of Mutations and Polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 1999; 64: 1524- 1540.
- Roberds, S. et al. Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell* 1994; 78: 625-633.
- Russell, S. et al. Two types of neonatal-to-adult fast myosin heavy chain transition in rat hindlimb muscle fibers. *Dev Biol.* 1993; 157(2):359-370
- Saad, F. et al. Single base substitutions are detected by double strand conformation analysis. *Nucleic Acid Res.* 1994; 22: 4352-4353.
- Sachadyn, P., Kur, J. Reducing the number of microlocations in oligonucleotide microchip matrices by the application of degenerate oligonucleotides. *J. Theor. Biol.* 1999; 197(3): 393-401.
- Saiki, R. et al. Primer directed amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988; 239: 487.
- Salih, M. et al. Severe autosomal recessive muscular dysrophy in an extended Sudanese kindred. *Dev. Med. Child. Neurol.* 1983; 25: 43-52.
- Sandri, M. et al. Apoptotic myonuclei in human Duchenne muscular dystrophy. *Lab. Invest.* 1998; 78: 1005-1016.
- Sarkar, G. et al. Screening for mutations by RNA single-strand conformation polymorphism (rSSCP): comparison with DNA-SSCP. *Nucleic Acids Res.* 1992a; 20: 871-878.
- Sarkar, G. et al. Dideoxy fingerprinting (ddF): a rapid and efficient screen for the presence of mutations. *Genomics.* 1992 b; 13: 441- 443.
- Satoh, C. et al. Variations among Japanese of the factor IX gene (F9) detected by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Am. J. Hum. Genet.* 1993; 52: 167-175.
- Savov, A. et al. High percentage acrylamide gels improve resolution in SSCP analysis. *Nucleic Acid Res.* 1992; 20: 6741-6742.
- Schiaffino, S., Reggiani, C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol. Rev.* 1996; 76 (2): 371-423.
- Schouten, G. et al. I $\kappa$ B $\alpha$  is a target for the mitogen-activated 90kDa ribosomal S6 kinase. *EMBO J.* 1997; 16 (11): 3133-3144.
- Schultz, E., Jaryszak, D. Effects of muscle regeneration on the proliferation potential of satellite cells. *Mech. Ageing Dev.* 1985; 30(1): 63-72.
- Sen, C. Involvement of intracellular Ca<sup>2+</sup> in oxidant-induced NF- $\kappa$ B activation. *FEBS Lett.* 1996; 385 (1-2): 58-62.
- Sheffield, V. et al. Attachment of a 40-base-pair G+C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989;86: 232-236.
- Sheffield, V. et al. The sensitivity of the single stranded conformation polymorphism analysis for the detection of of single base substitutions. *Genomics.* 1993; 16: 325-332.
- Shevchenko, S. et al. Identification, characterization and partial purification of a thiol-protease which cleaves specifically the skeletal muscle ryanodine receptor/Ca<sup>2+</sup> release channel. *J. Membr. Biol.* 1998; 161(1): 33-43.
- Shields Jr., R. Limb Girdle Syndromes, Chap 47. Em: Engel, A. et al. editors. *Myology*, 2<sup>nd</sup> ed., International Ed., McGraw Hill Inc. 1994: 1258-1274.
- Sorimachi, H. et al. Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and  $\mu$ -type: specific expression of the mRNA in the skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 20106-20111.
- Sorimachi, H. et al. Muscle-specific calpain, p94, is degraded by autolysis immediately after translation, resulting in disappearance from muscle. *J. Biol. Chem.* 1993; 268 (14): 10593-10605.

- Sorimachi, H. et al. Muscle-specific calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connectin through IS2, a p94 specific sequence. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 31158-31162.
- Sorimachi, H. et al. Structure and physiological function of calpains. *Biochem. J.* 1997; 328: 721-723.
- Soussi-Yanicostas, N. et al. Transition of myosin isozymes during development of human masseter muscle. Persistence of developmental isoforms during postnatal stage. *Development* 1990; 108(2):239-249.
- Southern, E. Analysing sequence by hybridization to oligonucleotides on a large scale. *Trends Genet* 1996; 12: 110.
- Speer, M. 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: 1211-17.
- Spencer, M. et al. Absence of calpain 3 in a form of limb-girdle muscular dystrophy (LGMD2A). *J. Neurol. Sci.* 1997; 146 (2 ): 173-178.
- Staron, R., Johnson, P. Myosin polymorphism and differential expression in adult human skeletal muscle. *Compar. Biochem Physiol* 1993; 106(3): 463-475.
- Staron, R. Human skeletal muscle fiber types: delineation, development and distribution. *Can J Appl Physiol* 1997; 22 (4): 307-327.
- Stehlik, C. et al. Cytokine induced expression of porcine inhibitor of apoptosis protein (iap) family members is regulated by NF- $\kappa$ B. *Biochem. Biophys. Res.* 1998; 243: 827-832.
- Sullivan, N. et al. Altered expression of myosin heavy chain in human skeletal muscle in chronic heart failure. *Med Sci Sports Exerc* 1997; 29(7): 860-866.
- Sun, S. et al. NF- $\kappa$ B controls expression of I $\kappa$ B $\alpha$ : evidence of an inducible autoregulatory pathway. *Science.* 1993; 259 (5103): 1912-1915.
- Suyang, H. et al. Role of unphosphorylated, newly synthesized I $\kappa$ B $\beta$  in persistent activation of NF- $\kappa$ B. *Moll. Cell Biol.* 1996; 16(10): 5444-5449.
- Suzuki, Y. et al. Detection of ras gene mutations in human lung cancers by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. *Oncogene.* 1990; 5: 1037-1043.
- Szalay, A. et al. Separation of the complementary strands of DNA fragments on polyacrylamide gels. *Nucleic Acid Res.* 1977; 4: 1569-1578.
- Tagle, D. et al. Magnetic bead capture of expressed sequence encodes within large genomic segments. *Nature.* 1993; 361: 751-753.
- Taillandier, D. et al. Coordinated activation of lysosomal, Ca<sup>2+</sup>-activated and ATP-ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle. *Biochem. J.* 1996; 316 (Pt 1): 65-72.
- Talmadge, R. et al. MHC and sarcoplasmic reticulum protein isoforms in functionally overloaded cat plantaris muscle fibers. *J. Appl. Physiol.* 1996; 80(4):1296-1303.
- Tanaka, M. et al. Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF- $\kappa$ B activation in IKK-beta-deficient mice. *Immunity.* 1999; 10(4): 421-429.
- Teixeiro, E. et al. Apoptosis-resistant T cells have a deficiency in NF- $\kappa$ B –mediated induction of Fas ligand transcription. *Eur. J. Immunol.* 1999; 29 (3): 745-754.
- Temparis, S. et al. Increased ATP-ubiquitin-dependent proteolysis in skeletal muscles of tumor-bearing rats. *Cancer Res.* 1994; 54 (2): 5568-5573
- Tews, D. et al. DNA-fragmentation and expression of apoptosis-related proteins in muscular dystrophies. *Neuropat. Appl. Neurobiol.* 1997, Aug; 23(4): 331-338.
- Tews, D. et al. DNA-fragmentation and expression of apoptosis-related proteins in cell motor neuron disorders. *Acta Neurol. Scand.* 1997, Dec ; 96 (6): 380-386.
- Tilburn, J. et al. The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* 1995; 14 (4): 779-790.
- Tischler, M. et al. Insulin attenuates atrophy of unweighted soleus muscle by amplified inhibition of protein degradation. *Metabolism.* 1997; 46: 673-679.
- Tsujiinaka, T. et al. Interleukin 6 receptor antibody inhibits muscle atrophy and modulates proteolytic systems in interleukin 6 transgenic mice. *J. Clin. Invest.* 1996; 96: 244-249.
- Tsunekawa, N. et al. Effects of continual administration of clenbuterol on skeletal muscles of mice. *Jap. J. Physical Fitness and Sports Med.* 1998; 47(6): 967.
- Ueyama, H. et al. Expression of three calpain isoform genes in human skeletal muscles. *J. Neurol. Sci.* 1998; 155(2): 163-169.
- Urtasun, M. et al. Limb-girdle muscular dystrophy in Guipúzcoa (Basque Country, Spain). *Brain.* 1998; 121: 1735-1747.
- van Antwerp, D. et al. Suppression of TNF- $\alpha$ -induced apoptosis by NF- $\kappa$ B. *Science.* 1996; 274 (5288): 787-789.

- van der Kooi, A. et al. Limb girdle muscular dystrophy: reappraisal of a rejected entity. *Clin Neurol Neurosurg.* 1994; 96 (3): 209-18.
- van der Kooi, A. et al. The clinical spectrum of limb girdle muscular dystrophy. A survey in the Netherlands. *Brain* 1996; 119: 1471-1480.
- van der Kooi, A. et al. Genetic localization of a newly recognized autosomal dominant limb-girdle dystrophy with cardiac involvement (LGMD 1B) to chromosome 1 q11-21. *Am. J. Hum. Genet.* 1997; 60: 891-895.
- van der Linden, C. et al. Fiber-specific regulation of Ca<sup>2+</sup>-ATPase isoform expression by thyroid hormone in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 1996; 271(6 Pt 1): C1908-C1919.
- van der Sijs-Bos, C. et al. Phenylketonuria in The Netherlands: 93% of the mutations are detected by single-strand conformation analysis. *Hum. Hered.* 1996; 46: 185-190.
- Vescovo, G. et al. Improved exercise tolerance after Losartan and Enalapril in heart failure. *Circulation.* 1998; 98: 1742-1749.
- Vignal, A. et al. Nonradioactive multiplex procedure for genotyping of microsatellite markers. Em Adolph, K., editor. *Methods in molecular genetics*, Vol. 1 San Diego: Academic Press; 1993. p.1: 211-221.
- Vogel, F., Motulsky, A. *Human genetics – problems and approaches.* 1986, 2<sup>nd</sup> Ed, Springer, Berlin
- Wadia, J. et al. Mitochondrial membrane potential and nuclear changes in apoptosis caused by serum and nerve growth factor withdrawal: time course and modification by (-)-deprenyl. *J. Neurosci.* 1998; 18(3): 932-947.
- Wang, C. et al. NF- $\kappa$ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP 1 and c-IAP 2 to suppress caspase-8 activation. *Science.* 1998; 281: 1680-1583.
- Wang, X. et al. Antiapoptotic action of 1,25-dihydroxvitamin D<sub>3</sub> is associated with increased mitochondrial MLC-1 and Raf-1 proteins and reduced release of cytochrome c. *Exp. Cell Res.* 1997; 235 (1): 210-217.
- Walton, J., Natrass, F. On the classification, natural history and treatment of the myopathies. *Brain.* 1954; 77: 169-231.
- Wang, H. et al. Ca<sup>2+</sup> induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science.* 1999; 284 (5412): 339-343.
- Wang, K., Yuen, P. Calpain inhibition: an overview of its therapeutic potential. *Trends Pharmacol. Sci.* 1994; 15(11): 412-419.
- Wang, K. et al. Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys.* 1998; 356(2): 187-196.
- Webster, G. et al. Transcriptional cross talk between NF- $\kappa$ B and p53. *Mol. Cell Biol.* 1999; 19 (5): 3485-3495.
- Weil, R. et al. Control of NF- $\kappa$ B activity by the I $\kappa$ B $\beta$  inhibitor. *Immunobiology.* 1997; 198 (1-3):14-23.
- Weiler, T. et al. A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in Manitoba Hutterites maps to chromosome region 9q31-q33: evidence for another limb-girdle muscular dystrophy locus. *Am J. Hum Genetics.* 1998; 63: 140-147.
- White, M. et al. Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms. *Genomics.* 1992; 12: 301-306.
- Whiteside, S. et al. I $\kappa$ B epsilon, a novel member of the I $\kappa$ B family, controls RelA and cRel NF- $\kappa$ B activity. *EMBO J.* 1997; 17(16): 1413-1426.
- Winghertzan, M. et al. Insulin-like growth factor-I and high protein diet decrease calpain-mediated proteolysis in murin muscular dystrophy. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1998; 218 (3): 244-250.
- Winter, E. et al. A method to detect and characterize point mutations in transcribed genes: amplification and overexpression of the mutant c-Ki-ras allele in human tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985; 82: 7575-7579.
- Winterpacht, A. et al. Nonradioactive multiplex-SSCP analysis: detection of a new type II procollagen (COLA1) mutation. *Hum. Genet.* 1995; 437-439.
- Wood, D. et al. Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis. *Oncogene.* 1998; 17(9): 1069-1078.
- Yablonka-Reuveni, Z., Nameroff, M. Temporal differences in desmin expression between myoblasts from embryonic and adult chicken skeletal muscle. *Differentiation.* 1990; 45(1): 21-28.
- Yamaguchi, F. et al. Improvement of exercise capacity of rats with chronic heart failure by long-term treatment with trandolopril. *Br. J. Pharmacol.* 1999; 276(5 Pt 1): 1585-1592.
- Yanez, R., Porter, A. Therapeutic gene targeting. *Gene Therapy.* 1998; 5: 149-159.
- Yang, J. et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science.* 1997; 275: 1129-1132.
- Yokoyama, T. et al. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian heart. *J. Clin. Invest.* 1993; 92 (5): 2303-2312.

- Yokoyama, T. et al. Tumor necrosis factor-alpha provokes a hypertrophic growth response in adult cardiac myocytes. *Circulation*. 1997; 95(5): 1247-1252.
- Yoshimura, K., Hairii, K. A regenerative change during muscle adaptation to denervation in rats. *J. Surg. Res.* 1999; 81(2): 139-146.
- Young, K. et al. Confirmation of Linkage of Limb-Girdle Muscular Dystrophy, Type 2, to Chromosome 15. *Genomics*. 1992; 13: 1370-1371.
- Yu, Z. et al. The endoplasmic reticulum stress-responsive protein GRP78 protects neurons against excitotoxicity and apoptosis: suppression of oxidative stress and stabilization of calcium homeostasis. *Exp. Neurol.* 1999; 155(2): 302-314.
- Zatz, M. et al. Estimate of the proportion of Duchenne muscular dystrophy with autosomal recessive inheritance. *Am. J. Med. Genet.* 1989; 32: 407-410.
- Zdanowicz, M. et al. High protein diet has beneficial effects in murine muscular dystrophy. *J. Nutr.* 1995; 125 (5): 1150-1158.
- Zdanowicz, M. et al. Metabolic and structural effects of insulin-like growth factor-1 and high-protein diet on dystrophic hamster skeletal muscle. *Proc.Soc. Exp. Biol. Med.* 1997; 215 (2): 168-173.
- Zhi-Liang, C. et al. Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor apoptosis c-IAP 2 is under NF-kB control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997; 94: 10057-10062.
- Zimmer, G. et al. Effect of triaminopyridine flupirtine on calcium uptake, membrane potential and ATP synthesis in rat heart mitochondria. *Br. J. Pharmacol.* 1998; 123 (6): 1154-1158.
- Zlotogora, J. et al. Multiple mutations in a specific gene in a small geographic area: a common phenomenon? *Am. J. Hum. Genet.* 1996; 58: 241-243.