



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Marcus Alexandre Mendes Luz

**DINITRATO DE ISOSSORBIDA CONTRIBUI PARA A REGENERAÇÃO
MUSCULAR EM MODELO EXPERIMENTAL DA DISTROFIA
MUSCULAR DE DUCHENNE**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
MARCUS ALEXANDRE MENDES LUZ
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do título de
Doutor em Biologia Celular e Estrutural
na área de Histologia.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Santo Neto

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC
CHAMADA	L979d
EX	
COMBO BC	63817
ROC.	16-86-05
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
REÇO	11,00
ATA	10/05/05
% CPD	

lib-id 351031

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

L979d

Luz, Marcus Alexandre Mendes

Dinitrato de isossorbida contribui para a regeneração muscular em modelo experimental da distrofia muscular de Duchenne / Marcus Alexandre Mendes Luz. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Humberto Santo Neto.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Músculos - Regeneração.
 2. Óxido nítrico.
 3. Dinitrato de isossorbida.
 4. Células satélites.
 5. Distrofia muscular de Duchenne.
- I. Humberto Santo Neto. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**“ Esforçar-se e lutar com resistência constitui a necessidade
mais essencial da natureza humana.”**

Schopenhauer

SUMÁRIO

Resumo	
Abstract	
I. Introdução.....	12
1.1. Apresentação.....	12
1.2. Regeneração muscular.....	15
1.3. Distrofia muscular de Duchenne.....	18
1.3.1. Aspectos clínico, etiologia e fenotipia das fibras.....	18
1.3.2. Aspectos da terapia.....	21
1.3.2.1. Terapia gênica.....	22
1.3.2.2. Terapia celular.....	23
1.3.2.3. Terapia farmacológica.....	25
1.4. Óxido nítrico.....	28
1.4.1. Bioquímica e fisiologia.....	28
1.4.2. Óxido nítrico no músculo esquelético.....	29
1.5. Objetivos.....	32
II. Materiais e Métodos.....	33
1. Animais e grupos experimentais.....	33
2. Administração das drogas e solução salina.....	34
2.1. Vasodilatador doador de óxido nítrico (DNIS).....	34
2.2. Vasodilatador não doador de óxido nítrico (Verapamil).....	34
2.3. Solução salina.....	35
3. Procedimentos experimentais.....	35

AGRADECIMENTOS

À minha mãe **Marilurdes**, pelo apoio oferecido sempre.

Ao **Prof. Dr. Humberto Santo Neto**, pela dedicação, compreensão e confiança.

À **Profa. Dra. Maria Júlia Marques** pelas sugestões oferecidas sempre.

Ao amigo **Jeferson Luiz Pereira**, pelo companheirismo, pelas palavras sempre pertinentes e pela amizade sincera.

Ao amigo fiel e irmão **José Henrique**, por estar sempre ao meu lado, nos bons e maus momentos.

À amiga **Dra. Elaine Minatel**, pela amizade valiosa e pelo apoio sincero.

À **Dra. Sônia Oliani**, pela solicitude na viabilização do material fotográfico deste trabalho.

Ao **HT. Domingos Zanchetta Neto**, pelo auxílio irrestrito oferecido sempre e pela valiosa amizade.

Ao **Dr. Felipe Rafael Torres**, pelas orientações nas análises estatísticas.

À **Lilian Alves Senne Panagio**, pela generosidade, solicitude e eficiência com que sempre me auxiliou.

Ao **Centro Universitário do Norte Paulista**, pelo apoio irrestrito na formação e capacitação de seus docentes.

200509705

3.1. Indução de necrose/ regeneração das fibras musculares.....	35
3.2. Sobrevida e sacrifício dos animais.....	36
4. Processamento do músculo.....	36
5. Avaliação da regeneração muscular e tratamento estatístico.....	37
III . Resultados.....	39
IV. Discussão.....	41
1. Sobre a metodologia.....	41
1.1. O modelo experimental (camundongo mdx).....	41
1.2. Uso da lidocaína.....	43
1.3. Tratamento com vasodilatadores.....	46
2. Considerações gerais.....	47
V. Conclusão.....	56
VI. Referências bibliográficas.....	57

RESUMO

Na distrofia muscular de Duchenne (DMD) as fibras musculares não expressam distrofina, uma proteína da membrana plasmática, deixando-a instável. Por isto as fibras sofrem sucessivos ciclos de necrose, o que é no começo da doença contrabalanceada pela regeneração muscular. Com o passar do tempo a capacidade de regeneração da fibra muscular é perdida, o que resulta em fraqueza muscular e morte por insuficiência respiratória. As estratégias terapêuticas devem incluir, portanto, a prevenção da necrose ou a estimulação da regeneração muscular e existe atualmente uma grande busca para a identificação de fármacos que possam fazer isto. A ativação das células satélites, que são responsáveis pela regeneração, é mediada pelo óxido nítrico (NO). Considerando-se que a produção de NO está reduzida na fibra muscular distrófica, a idéia de se usar doadores de NO para reativar a regeneração foi recentemente proposta. Neste trabalho investigou-se a possibilidade de se usar dinitrato de isossorbida (DNIS), um doador de NO amplamente empregado no tratamento de coronariopatias. Para isto utilizamos o camundongo *mdx*, que é o modelo animal para a DMD e o camundongo da linhagem C57Bl/10. Com a finalidade de produzir mionecrose, e posteriormente regeneração das fibras, o músculo tibial anterior foi injetado com cloridrato de lidocaína. Os animais foram divididos em 4 grupos. Os animais do Grupo I foram tratados com DNIS, os do Grupo II com verapamil, os do Grupo III com solução salina, todos por via intraperitoneal. Os animais do Grupo IV não receberam nenhum tratamento. Dez dias após os animais foram sacrificados e os músculos tibiais anteriores retirados, processados e corados com hematoxilina e eosina. A avaliação da regeneração foi feita pela contagem direta das fibras com o objetivo de se avaliar o total de fibras de cada músculo. Os dados foram analisados pelo teste t de Student,

considerando-se o nível de significância de $p < 0.05$. Nossos resultados mostram que o DNIS melhora significativamente a regeneração muscular. Apesar do verapamil, em camundongos *mdx* ter também produzido melhora na regeneração muscular, o DNIS é capaz de promover um ganho adicional significativo em relação ao verapamil. Sugere-se aqui que o ganho seletivo em fibras distróficas seja devido a ação da calcineurina. Em suma nossos resultados mostram que o DNIS é uma droga potencialmente útil na terapia da DMD que visa restaurar a capacidade de regeneração das fibras musculares.

ABSTRACT

In the Duchenne muscular dystrophy (DMD), the lack of dystrophin expression compromise the structural integrity of muscle fiber membrane resulting in necrosis of muscle fibers. The muscle regeneration ability is lost, and myonecrosis is not counterbalanced by muscle regeneration leading progressive loss of skeletal fiber muscle and death by respiratory failure. It is feasible therefore that protecting muscle fibers from necrosis and enhanced muscle regeneration are useful in the DMD treatment and there is currently a great search for pharmacological agents. Activation of muscle satellite cells, the myogenic cells, is mediate by nitric oxide (NO) and it is a fundamental step to the successful of muscle regeneration. Because the expression of the nitric oxide synthase (nNOS), the signaling molecule for NO synthesis, is largely reduced in muscles fibers of DMD patients it has been hypothesized that NO based therapy can be useful in DMD treatment. At the present we investigate whether the isosorbide dinitrate (ISDN), a well studied NO donor that is widely used in the management of coronary artery disease, interferes on muscle regeneration of *mdx* mice, a murine model of DMD. Adult *mdx* mutant and C57BL/10 male mice were used. Drugs were dissolved in saline and solutions were prepared immediately prior to administration. Necrosis of muscle fibers was then induced by injecting lidocaine hydroclorydre on right tibialis anterioris muscle. *Mdx* and C57/BL/10 mice were divided in 4 groups. Animals of Group I were given ISDN; mice of Group II received verapamil, Group III was treated with saline and Group IV was not treated. Ten days after mice were killed and right tibialis anterioris muscles were removed and the middle belly were processed to be sectioned and stained with hematoxylin and

eosin. Muscle regeneration was assessed by counting the total of muscle fibers. The data of all were analyzed statistically by the Student's test t, with the level of significance set at $p < 0.05$. Results shows that DNIS ameliorates in a significance level muscle repair in both non dystrophic and *mdx* mice and despite verapamil alone is able to improve muscle repair DNIS showed to produce a more extensive regeneration. Interestingly DNIS is able to support an significance additional gain in *mdx* mice and we speculate that it can be mediate by calcineurin. Our results clearly demonstrated that DNIS is a potential drug to be used in the NO-based therapy for DMD treatment.

I – INTRODUÇÃO

1.1. Apresentação

Distrofias musculares são doenças hereditárias, caracterizadas por alterações degenerativas progressivas das fibras musculares. Dentre as distrofias, destaca-se a distrofia muscular de Duchenne (DMD), uma miopatia cuja origem está ligada ao cromossomo X, é transmitida pela mãe assintomática ao filho do sexo masculino e acomete 1 em cada 3500 crianças (ENGEL, *et al.*, 1998).

Na DMD as fibras musculares esqueléticas não apresentam distrofina, uma proteína estrutural da membrana citoplasmática da fibra muscular, o sarcolema, e que desempenha papel fundamental na estabilidade sarcolemal (HOFFMANN *et al.*, 1987; BONILLA *et al.*, 1988). Admite-se que com a falta da distrofina, ocorra aumento da entrada de cálcio no sarcoplasma, a partir do meio extracelular, resultando em hipercontração das fibras musculares seguida por necrose das mesmas (BERTORINI *et al.*, 1982). Nas fases iniciais da doença existe discreto processo de regeneração das fibras musculares, mas a capacidade regenerativa declina rapidamente e, com isto, o tecido muscular é substituído por tecido fibro-adiposo. Conseqüente a isto ocorre perda da função muscular.

Esse processo compromete inicialmente os músculos posturais, fazendo com que o paciente apresente dificuldade de locomoção e também em se manter na posição ereta. Com o passar do tempo, ocorre comprometimento progressivo dos músculos da respiração, resultando finalmente em óbito, principalmente por falência respiratória (ENGEL *et al.*,

1998).

Portanto, as estratégias empregadas no tratamento da DMD devem considerar: 1) a prevenção da necrose das fibras musculares; 2) recuperar a capacidade de regeneração das mesmas. Muito embora as terapias celular e gênica tenham propiciado resultados promissores, há, no momento, uma grande busca para a o tratamento farmacológico através da identificação de moléculas que possam evitar a mionecrose ou estimular a regeneração (BIGGAR *et al.*, 2002; BOGDANOVICH *et al.*, 2003; NOVAK & DAVIES, 2004). No presente trabalho objetiva-se estimular o processo de regeneração das fibras musculares distróficas.

Estudos *in vitro* (LEE *et al.*, 1994) com músculo esquelético não distrófico demonstraram que a ativação das células satélites, que são células quiescentes responsáveis pela regeneração do tecido muscular, é mediada pelo óxido nítrico (NO).

Um fato relevante ocorreu quando BRENMAN *et al.*, (1995) descobriram que fibras musculares de pacientes com DMD apresentam acentuada redução na expressão de óxido nítrico sintase (NOS), molécula responsável pela síntese do NO. Imediatamente após, observou-se também que as fibras musculares de camundongos *mdx* (*x chromosome-linked muscular dystrophy*), um modelo experimental para estudos da DMD (BULFIELD *et al.* 1984), apresentam redução na expressão de NOS (CHANG *et al.*, 1996).

Em função disto a Dra. Judy Anderson e seus colaboradores do Department of Human Anatomy, University of Manitoba, Canadá, passaram a investigar a relação entre a deficiência de NO e perda da capacidade de regeneração em fibras musculares distróficas. Demonstraram inicialmente, que a inibição da síntese de NO, através da administração de N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), um inibidor da NOS, produz acentuada

redução na regeneração de fibras musculares em camundongos *mdx* após uma lesão provocada por esmagamento do músculo (ANDERSON, 2000). Com isto demonstrou-se que também nas fibras distróficas a regeneração muscular depende da presença de NO.

Os aspectos mais relevantes sobre a regeneração muscular em camundongos *mdx*, foram publicados recentemente (ANDERSON & VARGAS, 2003). Observou-se que a regeneração muscular sincronizada (aquela que ocorre após uma lesão provocada por agentes físicos ou químicos, como por exemplo, esmagamento do músculo) pode ser acelerada (ocorrer em tempo mais curto) e mais extensa (aumento no número de fibras regeneradas) após a administração de l-arginine (L-arg), o substrato da NOS, e portanto um doador indireto de NO. Com isto abriu-se a possibilidade do emprego do NO na terapia da DMD.

Embora a L-arg já venha sendo empregada clinicamente como doador de NO no tratamento de diversas doenças, seu uso ainda é recente. Além disto, quando administrada por longos períodos, o que deve ser feito no caso da DMD, pode provocar efeitos colaterais como, por exemplo, hipercalcemia e reações alérgicas, inclusive com choque anafilático (BOGER & BODE-BOGER, 2001).

1.2. Regeneração muscular

Em músculos esqueléticos a regeneração muscular depende da presença e da ativação molecular das células satélites. Estas células, presentes em todos os vertebrados, permanecem quiescentes e são ativadas, dentre outros mecanismos, por uma lesão mecânica ou química das fibras musculares para reparar a fibra muscular lesada (CHARGÈ & RUDNICKI, 2004; ANDERSON & WOSNIAK, 2004).

Ultraestruturalmente, estas células podem ser descritas com um núcleo oval grande e heterocromático considerado inativo; ribossomos, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, numerosas vesículas junto à membrana plasmática e centríolos visíveis, que desaparecem durante a miogênese (MAURO, 1978). Distribui-se pela extensão das fibras, alojando-se em suas depressões, logo acima do sarcolema, numa frequência bastante variável relacionada a diversos fatores como a topografia da fibra, o tipo de fibra muscular e a idade do indivíduo. No músculo sóleo, por exemplo, encontra-se uma média de 5000 células satélite/mm³, enquanto que o tibial anterior apresenta apenas 900 células satélites/mm³ (SCHMALBRUCH & HELLHAMER, 1976).

Os fatores que controlam esta distribuição desigual não são bem conhecidos, mas podem estar associados ao processo de maturação do músculo, desempenho contrátil e idade do indivíduo. Durante a fase inicial do desenvolvimento as células satélites são mais abundantes, quando contribuem para o desenvolvimento do músculo no período pós-natal, diminuindo abruptamente em poucos meses. Esse declínio é consequência da fusão das células satélite entre si durante o crescimento muscular. A diminuição numérica destas células torna-se mais acentuada conforme se aproxima à senilidade. Devido a isso, o

potencial proliferativo das células torna-se limitado (SCHMALBRUCH & HELLHAMMER, 1976).

Após uma lesão sarcolemal, qualquer que seja a natureza do agente agressor, ocorre um aumento no influxo de cálcio para o interior do citosol resultando em hipercontração imediata das miofibrilas, com formação de uma massa densa e irregular de miofilamentos que caracteriza a necrose da fibra muscular. Na maioria dos casos, entretanto, a membrana basal muscular não sofre alteração, permanecendo ao redor dos restos necróticos. A integridade da membrana basal na forma de um tubo endomisial é importante para o sucesso da regeneração muscular (KARPATI & CARPENTER, 1988).

Já nos primeiros minutos após a mionecrose inicia-se uma série de eventos celulares e moleculares que acarretam a regeneração muscular. Esses eventos, que ocorrem de forma simultânea e sincronizada, têm como objetivos remover o material necrótico e ativar as células satélites. Os restos necróticos dispostos no interior do tubo endomisial, são progressivamente destruídos por proteases endógenas, juntamente com a atuação do infiltrado celular de polimorfonucleares. Dentro de 48 horas o material necrótico é completamente removido por macrófagos derivados dos monócitos do sangue circulante (CARLSON, 1986).

Paralelamente a isso, as células satélites são inicialmente ativadas passando da fase G0 para a fase G1 do ciclo celular, seguido por rápida proliferação e diferenciação em mioblastos culminando em miotubo. Nesta fase, portanto, observa-se mitoses abundantes e a formação de um aglomerado de células no espaço formado pela remoção do material necrótico. O tubo endomisial coordena a mobilização das células satélites no início da regeneração, orienta o posicionamento dos mioblastos neoformados através das proteínas

presentes na lâmina basal. A seguir há uma migração centrípeta das células, que passam a se dispor linearmente no centro do tubo endomisial. Seqüencialmente, as células formadoras do miotubo fundem-se numa única estrutura que irá reconstituir a cito-arquitetura da fibra muscular (PEARSON, 1973). Ao final deste processo tem-se uma fibra regenerada.

Assim sendo, após um processo regenerativo decorrente de uma lesão qualquer, a fibra muscular regenerada perde suas características de fibra muscular normal. A distribuição centralizada dos núcleos constitui o processo de centronucleação (TORRES & DUCHEN, 1987; NARITA *et al.*, 1999). Além disto os núcleos apresentam-se volumosos, de aspecto vesicular, com cromatina descondensada e nucléolo proeminente (ZACHARIAS & ANDERSON, 1991; TORRES & DUCHEN, 1987), características de núcleos presentes em células em atividade de síntese. Esta atividade é ainda evidenciada pela presença de um citoplasma basofílico (BENOIT & BELT, 1970) e de escassez de elementos contráteis, visíveis pelo número reduzido de estriações.

Atualmente, acredita-se que a centronucleação é o indicativo de um processo de regeneração que se desenvolve numa determinada fibra, sendo o parâmetro adotado para a distinção da fibra regenerada de uma não regenerada (TORRES & DUCHEN, 1987; NARITA *et al.*, 1999), atuando ainda na compensação da fragilidade da fibra muscular regenerada em animais distróficos como suporte mecânico (NARITA *et al.*, 1999).

1.3. Distrofia muscular de Duchenne

1.3.1. Aspectos clínicos, etiologia e fenotipia das fibras musculares

Apesar das investigações bioquímicas, histopatológicas e moleculares serem recentes, as primeiras observações sobre esta miopatia foram publicadas por Duchenne em 1861 (ENGEL *et al.*, 1998).

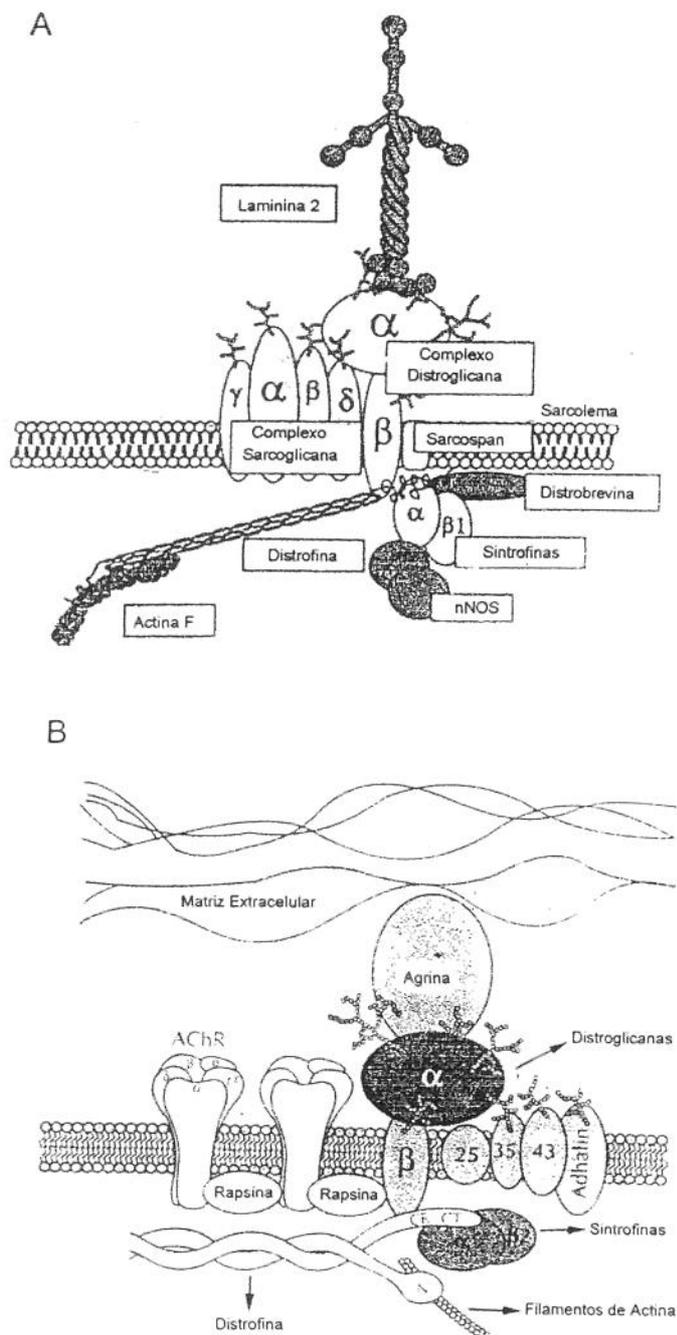
Estudos subseqüentes realizados por Gowers, 1886 e Erb, 1891 (ENGEL *et al.*, 1998) descreveram aspectos histológicos e clínicos do músculo distrófico. As observações realizadas revelaram heterogeneidade no diâmetro das fibras, proliferação do conjuntivo intersticial e substituição fibro-adiposa do tecido muscular. A isto se associava enfraquecimento da musculatura das extremidades do corpo, lordose, hipertrofia muscular do segmento atingido, redução da motricidade, ausência de distúrbios sensoriais e protusão das escápulas.

A doença é clinicamente diagnosticada durante a infância. Entre 3 e 6 anos de idade inicia-se a lordose lombar e os primeiros sinais, como hipertrofia dos músculos gastrocnêmios, dificuldade de levantar-se e quedas freqüentes. Por volta de 11 anos de idade, a força dos músculos dos membros pélvicos diminui rapidamente, sendo que os músculos flexores dos dedos, bíceps femoral e quadríceps femoral são os mais atingidos, podendo ter sua função reduzida de 50 a 70%. O comprometimento destes músculos reduz significativamente a atividade motora do indivíduo, impossibilitando-o muitas vezes de caminhar ou exercer qualquer tipo de ação que dependa destes músculos. A atividade física portanto, decresce abruptamente entre os 7 e 11 anos de idade. As alterações subseqüentes resultam da perda da capacidade de locomoção e na redução da massa muscular dos

membros acompanhada de uma cifo-escoliose pronunciada. Em seguida, ocorre comprometimento parcial dos músculos respiratórios, levando a uma insuficiência progressiva nas pressões inspiratória e expiratória, culminando em falência respiratória. O óbito decorre, portanto, de insuficiência respiratória, e numa porcentagem menor, de insuficiência cardíaca (ENGEL *et al.*, 1998).

A DMD é uma miopatia ligada ao cromossomo X decorrente de translocações e deleções na banda 1 da região 2 do braço curto do cromossomo, denominada de banda Xp21. Essa banda apresenta uma seqüência de nucleotídeos responsáveis pela expressão de uma proteína composta por 3685 aminoácidos que integra o sarcolema da fibra muscular denominada distrofina (VERELLEN *et al.*, 1984; FRANCKE *et al.*, 1985).

A distrofina localiza-se junto ao sarcolema, unida a proteínas integrantes que se comunicam com os elementos da matriz extracelular na face externa, e com as proteínas do citoesqueleto na face interna (Fig. A - B). Este modelo sugere que a distrofina, unida às proteínas integrantes, confere a estabilidade da superfície da membrana da fibra muscular durante sua contração e relaxamento. Esta proteína apresenta-se na forma de um dímero antiparalelo associado a outras proteínas estruturais do sarcolema. O dímero de distrofina apresenta-se dividido em quatro domínios; o primeiro relacionado com a α -actina, o segundo ligado a espectrina, o terceiro a ancarina e o último à um complexo de proteínas unidas à laminina (ENGEL *et al.*, 1998).



Figura

(A) Complexo distrofina-glicoproteínas no sarcolema extrajuncional. Os componentes integrais do complexo estão indicados por elipses vazias e as proteínas que estão associadas a este complexo estão sombreadas. Adaptado de Lim e Campbell, *Curr. Op. Neurology*, 11, p. 443-452, 1998.

(B) Complexo distrofina-glicoproteínas na junção neuromuscular. Adaptado de Sunada e Campbell, *Curr. Op. Neurology*, 8, p. 379-384, 1995.

A expressão da distrofina muscular é regulada de acordo com as etapas do desenvolvimento. Nos músculos fetais, a distrofina é detectada no sarcolema depois da nona semana de gestação, aumentando progressivamente sua expressão nas junções neuromusculares e miotendinosas, na superfície das membranas dos túbulos T e junto à diversas junções celulares (ENGEL *et al.*, 1998).

Assim sendo, o domínio associado à α -actina promove uma interação entre os elementos do sarcolema e do citoesqueleto com a distrofina, de modo que uma deficiência na expressão desta compromete a expressão e organização das demais proteínas, causando a deterioração da fibra, diante de uma lesão (BONILLA *et al.*, 1988). Portanto, uma deficiência na síntese de distrofina resultaria na fragilidade da fibra muscular tornando-a suscetível à lesão e à necrose a partir do acúmulo intracelular de cálcio na região subsarcolemal da fibra (BERTORINI *et al.*, 1982).

1.3.2. Aspectos da terapia

As duas características fenotípicas mais acentuadas das fibras musculares distróficas são sua susceptibilidade à necrose e a perda da capacidade de regeneração. Portanto, as estratégias terapêuticas na DMD têm como objetivos: 1) impedir ou retardar a mionecrose e/ou estimular a regeneração muscular (BIGGAR *et al.*, 2002; BOGDANOVICH *et al.*, 2003; NOVAK & DAVIES, 2004).

De uma forma geral as terapias são classificadas em três categorias; 1) gênica, 2) celular e 3) farmacológica.

1.3.2.1. Terapia Gênica

Os procedimentos enquadrados no grupo das terapias genéticas têm como objetivo restaurar a síntese de distrofina e, dessa forma, devolver ao sarcolema sua estabilidade. Portanto elas visam corrigir o problema primário da DMD. Uma delas, talvez a mais extensivamente examinada, diz respeito ao uso de vírus como vetores de transferência do DNA que codifica distrofina. Apesar de inúmeros estudos experimentais terem demonstrado que esta é uma abordagem potencialmente promissora, uma das maiores dificuldades reside no tamanho da molécula de DNA. Outra dificuldade reside na quantidade de vetores a ser administrada, visto que moléculas de DNA devem alcançar a musculatura de todo o corpo e coração (WELLS & WELLS, 2002; XU *et al.*, 2004). Em função do aumento do tamanho do vírus/vetor ocorre também aumento da antigenicidade e, portanto, da resposta imune.

Na tentativa de contornar os efeitos colaterais, alguns pesquisadores têm tentado restaurar a expressão de distrofina através do uso de algumas regiões do DNA ao invés da molécula inteira. Com isto a reação imune torna-se menos vigorosa e a expressão de distrofina pode ser restaurada de forma razoável. Outra estratégia tem sido o emprego das mesmas técnicas para restaurar a expressão de “mini-utrofina”, a qual parece devolver certa estabilidade ao sarcolema e que devido ao menor tamanho do gene não suscita a possibilidade de resposta imune. Além disto, utiliza-se vetores virais menores (WANG *et al.*, 2000; EBIHARA *et al.*, 2000; GREGOREVIC *et al.*, 2004).

No momento, essa estratégia terapêutica está sendo aplicada em um grupo de pacientes no Hospital Pitie-Salpetriere da França e seus resultados não foram ainda avaliados.

1.3.2.2. Terapia celular

Entre as técnicas de terapia celular destaca-se o transplante de mioblastos. Representa de fato a mais antiga das técnicas de terapia celular. Baseia-se no fato de que, durante a regeneração muscular pós- trauma, nova fibra muscular é gerada pela fusão de milhares de mioblastos, os quais por sua vez originam-se de mioblastos que se replicam centenas de vezes. Consiste na injeção de mioblastos normais dentro de músculos distróficos. A maioria dos estudos experimentais, cujo início deu-se em 1989 (PARTIDRGE *et al.*, 1989) utiliza-se de camundongos distróficos da linhagem *mdx*, propiciam resultados bastante otimistas (PAGEL & MORGAN, 1995; GUSSONI *et al.*, 1999). Embora também em humanos alguns estudos tenham sido razoavelmente bem sucedidos, pois um número significativo de novas fibras musculares passa a expressar distrofina (GUSSONI *et al.*, 1999), há um consenso de que a médio e longo prazo o transplante de mioblastos não traz benefícios ao paciente (GUSSONI *et al.*, 1992; TREMBLAY *et al.*, 1993; MILLER *et al.*, 1997; NEUMEYER *et al.*, 1998).

No primeiro mês após o transplante, a percentagem de fibras musculares é de 36%, o que se configura suficiente para restaurar, de modo significativo, a função muscular. Entretanto, para a grande maioria dos pacientes, ao final de 6 meses, a expressão de distrofina não pode mais ser detectada (MILLER *et al.*, 1997).

É possível que o insucesso do transplante de mioblastos deva-se também à reação imune contra os mesmos, pois a administração de imunossuppressores, simultaneamente ao transplante, tem gerado melhores resultados (OHTSUKA *et al.*, 1998). Contudo, a maior dificuldade pode estar associada ao fato da baixa capacidade de migração dos mioblastos. Isto explicaria o sucesso da terapia em camundongos, pois, migrando distância de apenas

alguns milímetros os mioblastos podem restaurar quase que inteiramente alguns músculos desses animais.

Mais recentemente a terapia celular da DMD incorporou a possibilidade de se empregar células da linhagem hematopoiética (GUSSONI *et al.*, 1999). Essa idéia baseou-se nos achados de Ferrari *et al.*, (1998) que foram os primeiros a observar que a regeneração de músculo normal não é feita exclusivamente pelas células satélites. Uma vez injetadas em um camundongo receptor, tanto por via intramuscular como endovenosa, as células da medula óssea diferenciam-se em células musculares e se alojam na musculatura do animal receptor. Esse estudo, contudo também demonstrou que a frequência de fibras musculares do animal receptor que se tornam distrofina positivas é muito pequena, representando cerca de 1-4% do total de fibras musculares do animal receptor.

Os primeiros estudos em camundongos *mdx* (GUSSONI *et al.*, 1999; BITTNER *et al.*, 1999) confirmaram que a incorporação de células doadoras é de fato muito pequena, o que não confere benefício significativo em termos de recuperação da função muscular.

Um fato interessante a favor do emprego das células derivadas da medula óssea deu-se quando Labarge & Blau (2002) demonstraram que além delas contribuírem para a formação de novas fibras musculares, participam também na constituição de um novo *pool* de células satélites no animal receptor. Verificou-se também que a porcentagem de fibras musculares originárias das células doadoras aumenta significativamente quando a regeneração muscular é do tipo sincronizada (CORTI *et al.*, 2002; CORBEL *et al.*, 2003) e que cardiomiopatia pode ser corrigida pela reposição de distrofina em 50% dos cardiomiócitos (YUE *et al.*, 2004). Esses dados passaram a colocar a terapia por células

indiferenciadas da medula óssea, agora amplamente conhecida como células-tronco, como a alternativa mais promissora para o tratamento da DMD.

Os primeiros estudos em pacientes reproduziram resultados similares àqueles vistos nos camundongos *mdx*, qual seja o de pequena porcentagem de fibras musculares, embora os núcleos das novas fibras musculares persistam por longo tempo (GUSSONI *et al.*, 2002). Apesar dos estudos clínicos estarem em andamento, não há ainda uma avaliação definitiva sobre a terapia com as células-tronco.

1.3.2.3. Terapia farmacológica

Representa a mais antiga e extensivamente empregada (KHURAMA & DAVIES, 2003). A vasta maioria das drogas tem como objetivo principal reduzir ou retardar a evolução do processo inflamatório, pois desde há muito (ARAHATA & ENGEL, 1984, 1988) tem sido demonstrado que a inflamação atua de forma significativa na patogênese da DMD. Segundo BOGDANOVICH *et al.* (2003) o uso de esteróides foi iniciado em 1965 por Barthelmai.

Embora o mecanismo pelo qual isto ocorra não seja conhecido, sabe-se que além dos efeitos na redução do processo inflamatório, os esteróides promovem a supressão dos efeitos citotóxicos, a melhoria da homeostasia do cálcio (essencial para a integridade das fibras musculares), a estimulação dos mioblastos e aumento da força de contração muscular em cerca de 25%. O maior obstáculo ao uso dos esteróides, especialmente por longos períodos, é o desenvolvimento de efeitos colaterais como ganho de peso, hipertensão arterial e diabetes. Os efeitos colaterais decorrem especialmente do emprego do prednisona

e tem sido relatado que sua substituição pelo deflazacorte pode minimizá-los (ANGELINI *et al.*, 1994).

Estudos experimentais tem visado diminuir a resposta inflamatória com o emprego de estabilizadores de membrana de mastócitos, como por exemplo, o cromogligato de sódio (GRANCHELLI *et al.*, 1996). Embora os resultados experimentais sejam positivos, não se têm informações sobre seu uso em pacientes.

Além da diminuição da resposta inflamatória a terapêutica farmacológica pode visar diretamente a prevenção da mionecrose. O mecanismo através do qual isto pode ser feito é o bloqueio dos canais de cálcio, pois como já citamos anteriormente, esses íons parecem participar de forma efetiva na gênese da necrose. Estudos experimentais com nifedipina, entretanto, tem gerado resultados variáveis, nem sempre positivos, embora sua substituição pelo dantrolene tenha produzido resultados mais promissores (ENGEL *et al.*, 1998).

Atualmente o deflazacorte tem sido extensivamente empregado, tanto clínica (ENGEL *et al.*, 1998) como experimentalmente (ANDERSON & VARGAS, 2003) em combinações com outros agentes com bons resultados. Mais recentemente, estudos experimentais com agente antagonista do TNF α (Remicade®) mostrou ser capaz de retardar de maneira eficiente o início do ciclo de necrose que acomete os camundongos *mdx* antes destes completarem 21 dias de vida (GROUNDS & TORRISI, 2004).

A terapia farmacológica que visa estimular especificamente a regeneração muscular é bastante recente. A partir de observações experimentais de que a expressão de IGF-I e IGF-II se encontrava aumentada em músculos em regeneração (LEVINOVITZ *et al.*, 1992) imaginou-se que estes poderiam ter algum papel na ativação das células satélites. Posteriormente notou-se que quando administrados *in vitro*, esses fatores promoviam a

proliferação e a fusão de mioblastos (DOUMIT *et al.*, 1993; COLEMAN *et al.*, 1995). Observou-se também que esses fatores induzem aumento na síntese de proteínas musculares levando a hipertrofia das fibras musculares (CHARGÉ & RUDNICKI, 2004).

Estudos em camundongos distróficos demonstraram claramente que esses agentes são capazes de restaurar a força de contração muscular, o que é acompanhada por significativa melhoria na estrutura e bioquímica muscular (LYNCH *et al.*, 2001), mas não se têm dados acerca de ensaios clínicos com IGF-I e IGF-II.

Outra estratégia farmacológica promissora que tem como objetivo induzir a criação de novas fibras bem como aumentar seu diâmetro, promovendo dessa forma melhoria da fenotípia, foi recentemente publicada por BOGDANOVICH *et al.*, 2002. Neste trabalho os autores bloquearam *in vivo* a expressão da miostatina, um regulador negativo do crescimento muscular em camundongos *mdx*, através da utilização de anticorpos. Assim, foram capazes de produzir hipertrofia em fibras musculares distróficas resultando em animal com força muscular muito acima dos animais normais. Embora promissora, pouco se sabe de ensaios clínicos de inibição da miostatina.

Também recentemente (ANDERSON & VARGAS, 2003) iniciou-se experimentalmente a terapia baseada na administração de fármacos doadores de NO. Foi observado que a regeneração muscular em camundongos *mdx* é significativamente melhorada com a administração de L-arginina, um substrato para a síntese de NOS.

Neste trabalho daremos continuidade à terapia experimental baseada na administração de NO.

1.4. Óxido nítrico

1.4.1. Bioquímica e fisiologia

O óxido nítrico relaciona-se a diversos processos bioquímicos e funcionais cardiovasculares, musculares e patogênicos, caracterizando-se como um mediador químico (BREDT & SNYDER, 1994; KOBZIK *et al.*, 1994).

Estudos realizados no início de década de 80 revelaram o mecanismo do relaxamento vascular mediado por um fator descrito como fator de relaxamento dependente do endotélio (FURCHGOTT *et al.*, 1980). Estudos subsequentes demonstraram que o mecanismo descrito era mediado por um radical livre, denominado de óxido nítrico (NO) (PALMER *et al.*, 1987).

Sabe-se hoje que o NO é um gás produzido através da oxidação da L-arginina pela óxido nítrico sintase (NOS), estimulada por cálcio intracelular, via calmodulina (SCHUMAN & MADISON, 1994). A NOS é a enzima que realiza a síntese do NO. Existem múltiplas isoformas da NOS, denominadas de induzida e constitutivas - neuronal e endotelial (KIECHELE *et al.*, 1993) e encontram-se distribuídas em diversos tecidos, porém todas estão presentes no músculo estriado esquelético (FÖRSTEMANN, *et al.*, 1998). A atuação do NO é medida através da estimulação da guanilil ciclase, enzima catalizadora da conversão da GTP (guanosina trifosfato) em GMPc (guanosina monofosfato cíclico) (CHAO *et al.*, 1998).

O NO atua em diversas funções celulares como mensageiro, provocando relaxamento na musculatura lisa dos vasos sanguíneos (PALMER *et al.*, 1987; HIBBS, *et al.*, 1988; MONCADA *et al.*, 1991). Após a atuação da NOS, o NO permeia o endotélio

atuando junto à musculatura lisa via GMPc, produzindo o relaxamento vascular (CONGER, 1994).

Alguns trabalhos têm relatado a atuação do NO no sistema cardiovascular como vasoprotetor, inibidor da ativação plaquetária, modulador da ativação e adesividade leucocitária (FURCHGOTT *et al.*, 1984) e nos sistemas respiratório (NATHAN, 1995), nervoso (PAAKKARI *et al.*, 1995) e urinário (BACHMANN *et al.*, 1994), como vasodilatador e modulador da homeostase.

Terapeuticamente o óxido nítrico exógeno é resultante da desnitrificação enzimática de vasodilatadores como o nitroprussiato de sódio e o dinitrato de isossorbida, resultando na liberação de NO e na produção de conjugados, num intervalo médio de tempo de 6 minutos (GOODMAN & GILMAN, 2000). Atualmente, diversos trabalhos têm empregado o dinitrato de isossorbida como doador de NO (KHANLARI *et al.*, 2001; STRAPKOVA *et al.*, 2001; GENOVA *et al.*, 2001).

1.4.2. Óxido nítrico no músculo esquelético

No músculo esquelético o NO está relacionado ao processo de contração muscular, o que é feito através da ativação da guanilato ciclase, aumento dos níveis de cGMP, e conseqüente liberação de cálcio (STAMLER & MEISSNER, 2001).

Outra ação importante diz respeito a vasodilatação provocada pelo NO liberado do músculo, durante a contração muscular. É possível que este efeito vasodilatador tenha papel fundamental na proteção das fibras musculares contra uma eventual isquemia resultante de vasoconstrição originária do sistema nervoso simpático em resposta ao estímulo contrátil (RANDO, 2001).

Trabalhos recentes sugerem que o óxido nítrico atuaria também como mediador na ativação das células satélites (ANDERSON, 2000). A distribuição das células satélites junto ao sarcolema das fibras musculares favoreceria sua exposição ao óxido nítrico liberado, induzindo a ativação destas células (SCHULTZ & MACCORMIK, 1994; ANDERSON, 2000).

Estudos realizados *in vivo* demonstraram que de fato o NO produzido pela NOS em fibras musculares estriadas esqueléticas promove a ativação das células satélites. Da mesma forma, empregando-se bromodioxidouridina (BrdU) e inibidores farmacológicos do NO foi possível constatar em culturas *in vitro* o envolvimento do NO no recrutamento e na ativação das células satélites presentes nas fibras analisadas (ANDERSON & PILIPOWICZ, 2002). A inibição da produção do NO resulta na redução da velocidade de ativação das células satélites, no diâmetro das fibras e na massa muscular em cerca de 40% (WANG *et al.*, 2001). Trabalhos recentes demonstraram que inibidores farmacológicos da enzima óxido nítrico sintase atuam diretamente na disponibilização do NO para as células satélites comprometendo a regeneração muscular (ANDERSON, 2000).

Dentro do mesmo princípio, é possível que a atuação de drogas doadoras de NO contribua para o processo de regeneração muscular, sendo que seu mecanismo parece estar associado, além da vasodilatação, a atuação direta do NO.

A similaridade na distribuição da distrofina com a NOS na fibra muscular, compromete a expressão da NOS pela redução da distrofina em pacientes portadores de DMD, evidenciada pela ausência de atividade enzimática e imunoreatividade da NOS no tecido muscular dos pacientes (CHANG *et al.*, 1996; GUO *et al.*, 2001). O complexo distrofina interagindo com a porção N – terminal da NOS, promove uma interdependência

funcional entre as duas moléculas. A ausência da distrofina promove uma perda seletiva de proteínas da NOS relacionadas a sinalização enzimática no sarcolema dos miócitos. Este comprometimento contribui para a rápida degeneração das fibras e deficiência na regeneração muscular (BRENMAN *et al.*, 1995), sugerindo-se que o NO está envolvido no recrutamento das células satélites presentes nas fibras.

Estudos experimentais demonstraram que a inibição da atividade da NOS compromete o processo de ativação das células satélites e a regeneração muscular (WANG *et al.*, 2001; ANDERSON *et al.*, 2002). Diversas atividades enzimáticas e imunoreativas da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) revelaram-se significativamente reduzidas ou ausentes em músculos de paciente portadores de DMD, da mesma forma que em estudos experimentais realizados com camundongos mdx e com o controle C57 (CHANG *et al.*, 1996, GUO *et al.*, 2001).

Assim sendo, a investigação do processo de regeneração muscular e a influência do NO sugere uma possível explicação para a patogênese de algumas distrofinopatias, como a DMD.

Além da atuação na contratilidade e na regulação do suprimento sanguíneo, o NO atua diretamente sobre a diferenciação dos miócitos (STAMLER & MEISSNER, 2001) e na ativação das células satélites (LEE *et al.*, 1994; ANDERSON, 2000; ANDERSON & VARGAS, 2003).

Um desses fatores está diretamente relacionado à ação endotelial do NO, promovendo a atuação do fator de crescimento derivado das plaquetas e endotélio - PDGF (ENGEL, 1998). A liberação deste mediador modula a ativação das células satélites no processo de regeneração muscular. A atuação do PDGF não é o principal agente na

ativação destas células, contudo, atua significativamente no estímulo e proliferação celular (BISCHOFF, 1986; AUSTIN, 1991).

Um dos fatores associados à regeneração muscular refere-se ao papel do óxido nítrico neste processo. O óxido nítrico (NO) é um gás presente no sarcolema, resultante da ação catalítica da óxido nítrico sintase (NOS), uma proteína que encontra-se associada à porção N terminal da α 1-sintrofina e demais proteínas de membrana que ligam-se ao citoesqueleto (MONCADA *et al.*, 1991; BRENMAN *et al.*, 1995; HEMLER, 1999).

Estudos recentes confirmam a participação do NO no recrutamento e ativação do ciclo celular das células satélites em culturas de fibras musculares, sugerindo ainda a participação do HGF (fator de crescimento dos hepatócitos) como mediador secundário nesta mobilização (ANDERSON & PILIPOWCZ, 2002), dentro do mesmo parâmetro de atuação do PDGF.

A correlação entre o diâmetro das fibras e o NO pode ser verificada em observações experimentais com animais distróficos (ANDERSON; VARGAS, 2003) e não distróficos (WANG *et al.*, 2001).

1.5. Objetivos

Este trabalho tem por objetivo verificar se a administração de dinitrato de isossorbida, um doador de NO extensivamente empregado há várias décadas no tratamento clínico de coronariopatias, influencia a regeneração muscular em camundongos distróficos *mdx*.

II - MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais e grupos experimentais

Foram utilizados 32 camundongos adultos (6 a 8 semanas de idade) provenientes do Biotério Central da UNICAMP, divididos em 2 grupos de animais submetidos à tratamentos com drogas diferentes. Os grupos foram constituídos por camundongos distróficos (*mdx*) e camundongos da linhagem C57Bl/10 distribuídos no seguinte esquema:

Grupo *mdx* (n = 16)

- Tratamento com cloridrato de verapamil (verapamil): n = 4
- Tratamento com dinitrato de isossorbida (DNIS): n = 4
- Tratamento com solução salina: n = 4
- Não tratado: n = 4

Grupo controle – C57Bl/10 (n = 16)

- Tratamento com verapamil : n = 4
 - Tratamento com DNIS: n = 4
 - Tratamento com solução salina: n = 4
 - Não tratado: n= 4
-

Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada e ciclo claro-escuro, recebendo ração e água *ad libitum*.

2. Administração das drogas e da solução salina.

2.1. Vasodilatador doador de óxido nítrico (DNIS)

Empregou-se solução de dinitrato de isossorbida (Isordil, Wieth®) como vasodilatador doador de óxido nítrico (KHANLARI *et al.*, 2001; STRAPKOVA *et al.*, 2001; GENOVA *et al.*, 2001). Administrou-se, por via intraperitoneal, 1ml de solução de DNIS diluído em solução fisiológica, na dose de 0,2mg/g de peso do animal, em cada animal do grupo. Esta dosagem foi estabelecida experimentalmente a partir do nível máximo de tolerância do animal à droga.

2.2. Vasodilatador não doador de óxido nítrico (Verapamil)

Com a finalidade de avaliar a influência da vasodilatação no processo de regeneração muscular, empregou-se um vasodilatador não doador de óxido nítrico, o cloridrato de verapamil - Verapamil, Basf Generix® (ABE *et al.*, 2000). Dessa forma pode-se avaliar o papel do óxido nítrico sem a interferência de outros fatores, como a vasodilatação. Administrou-se intraperitonealmente 1ml de solução de cloridrato de verapamil diluído em solução fisiológica, na dose de 0,02mg/g de peso do animal em cada animal do grupo. Esta dosagem foi estabelecida experimentalmente a partir do nível máximo de tolerância do animal à droga.

2.3. Solução salina

Utilizou-se a aplicação intraperitoneal de 1 ml de solução salina 0,9%.

3. Procedimentos experimentais

Iniciou-se o experimento com o tratamento dos animais com verapamil, DNIS e solução salina. Para isto, 4 camundongos *mdx*, e 4 da linhagem C57Bl/10 receberam, de acordo com o protocolo acima descrito, doses diárias de cloridrato de verapamil.

Um segundo grupo de camundongos (*mdx*, n=4 e C57Bl/10, n=4) recebeu, da mesma forma, injeções de DNIS. O terceiro grupo de animais, com a mesma população dos anteriores e com o mesmo protocolo de tratamento, recebeu injeções de solução salina.

Os 3 grupos foram tratados por um período de 12 dias, sendo que no quarto dia de tratamento, sem interromper as injeções de verapamil, DNIS e salina e a fim de que pudessemos avaliar a ação das drogas acima na estimulação da regeneração muscular, foi necessário provocar necrose das fibras musculares. Utilizou-se, para isto, um agente que permite a regeneração “*ad integrum*” e procede-se conforme descrito a seguir.

3.1. Indução de necrose/regeneração das fibras musculares

Os animais dos 3 grupos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de Francotar® (Ketamina) e Virbaxyl® 2% (cloridrato de xylazina- Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda) na proporção de 1:1, na dose de 0,3 ml/100g de peso corporal.

Imediatamente após exibir sinais de anestesia profunda, o animal foi disposto em decúbito ventral, e procedeu-se a depilação da região antero-lateral do membro pélvico direito.

Empregando-se seringa (1ml) e agulha (13x4), o músculo (tibial anterior) foi injetado com cloridrato de lidocaína (Xilocaína® – Astra Química, solução injetável à 2% sem vasoconstritor) na dose de 0,2ml por animal no ventre muscular.

Após este procedimento, os animais foram recolocados em suas gaiolas originais e continuaram recebendo injeções de verapamil, DNIS e salina.

3.2. Sobrevida e sacrifício dos animais

Finalizado o tratamento, os animais foram anestesiados com 0,3 ml de hidrato de cloral a 10%, por via intraperitoneal. Após exibir sinais de anestesia profunda, o plastrão esternal foi aberto aproximadamente na linha mediana, o coração exposto e foi realizada uma abertura no átrio direito. Utilizando-se agulha 25x7, introduzida no ventrículo esquerdo, e montada em seringa de 20 ml, perfundiu-se o animal com aproximadamente 40 ml de formol-cálcio (formaldeído PA a 40%, 10 ml; água destilada, 90ml; acetato de cálcio, 1g) A seguir a região antero-lateral da perna direita foi novamente incisada por aproximadamente 1 cm e o músculo tibial anterior direito (tratado) retirado e fixado na mesma solução de formol-cálcio durante 24 horas.

4. Processamento do músculo

O músculo foi seccionado em 3 segmentos aproximadamente iguais sendo que os terços superior e inferior foram desprezados. O ventre médio foi então processado para inclusão em historesina; sendo inicialmente lavado e imerso em etanol 70% e progressivamente desidratados em etanol 95%, etanol absoluto I e etanol absoluto II

ficando imersos por 30 min. em cada uma dessas soluções. Após a última solução de etanol absoluto, o fragmento foi transferido para uma solução de etanol-resina por 3 horas sendo seqüencialmente transferido para a resina pura, onde permaneceu “*overnight*”. Após isto o fragmento muscular foi acondicionado em formas às quais adicionou-se a mistura de historesina e polimerizador (Historesin®, Leika, Alemanha) na proporção: historesina, 50 ml; ativador, 0,5g em 15 partes de endurecedor. A polimerização foi realizada a vácuo em bomba comum. Uma vez polimerizada a resina, os blocos foram retirados das formas e fixados em suportes de madeira com cola de secagem rápida.

A seguir procede-se a microtomia, com navalha de vidro através da qual foram obtidos cortes de 2 μ m de espessura. Os cortes foram então colhidos em lâminas previamente tratadas com poli-L lisina, sendo que a distensão dos mesmos foi realizada em cubas de água fria. Os cortes foram hidratados e corados em solução de hematoxilina por 15 min. Em seguida foram lavados em água corrente e seqüencialmente corados com eosina por 10 min. Os cortes então foram lavados em água destilada, seguindo-se a desidratação e montagem em verniz.

5. Avaliação da regeneração muscular e tratamento estatístico

Foi realizada através da contagem da população total de fibras musculares e população de fibras regeneradas (centronucleadas) a partir da seleção de um corte de músculo de cada um dos animais dos grupos, empregando-se microscópio de luz Olympus Tokyo dotado de ocular com retículo com linhas paralelas horizontais e verticais que dividiam o campo microscópico em 4 regiões distintas.

A morfometria foi realizada empregando-se o mesmo equipamento. Foram selecionadas aleatoriamente 100 fibras de uma secção do músculo tibial anterior de cada um dos animais dos grupos controle e experimental, as quais foram medidas com auxílio de uma ocular milimetrada em intervalos de 2 μm e objetiva de valor 10.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste estatístico do tipo Student utilizando-se $p < 0.05$ como nível de significância.

III- RESULTADOS

Tabela 1. Média \pm Desvio Padrão das populações de fibras regeneradas em animais C57/BL10 e mdx tratados com solução salina, cloridrato de verapamil e dinitrato de isossorbida e não tratados. ($*p < 0.05$).

Grupos	Não tratado	Salina	Verapamil	DNIS
C57 BL/10	4.734 \pm 90	4.736 \pm 99	4.993 \pm 140	5.438 \pm 146*
mdx	4.502 \pm 139	4.528 \pm 139	5.338 \pm 147*	6.206 \pm 168*

Tabela 2. Média \pm Desvio Padrão do diâmetro em μm das as populações de fibras regeneradas em animais C57/BL10 e mdx tratados com solução salina, cloridrato de verapamil e dinitrato de isossorbida e não tratados. ($*p < 0.05$).

Grupos	Não tratado	Salina	Verapamil	DNIS
C57 BL/10	39,02 \pm 2,8	39,11 \pm 3,2	39,11 \pm 3,2	43,4 \pm 5,3*
mdx	21,81 \pm 6,1	23,36 \pm 6,9	24,67 \pm 5,3	27,98 \pm 9,8*

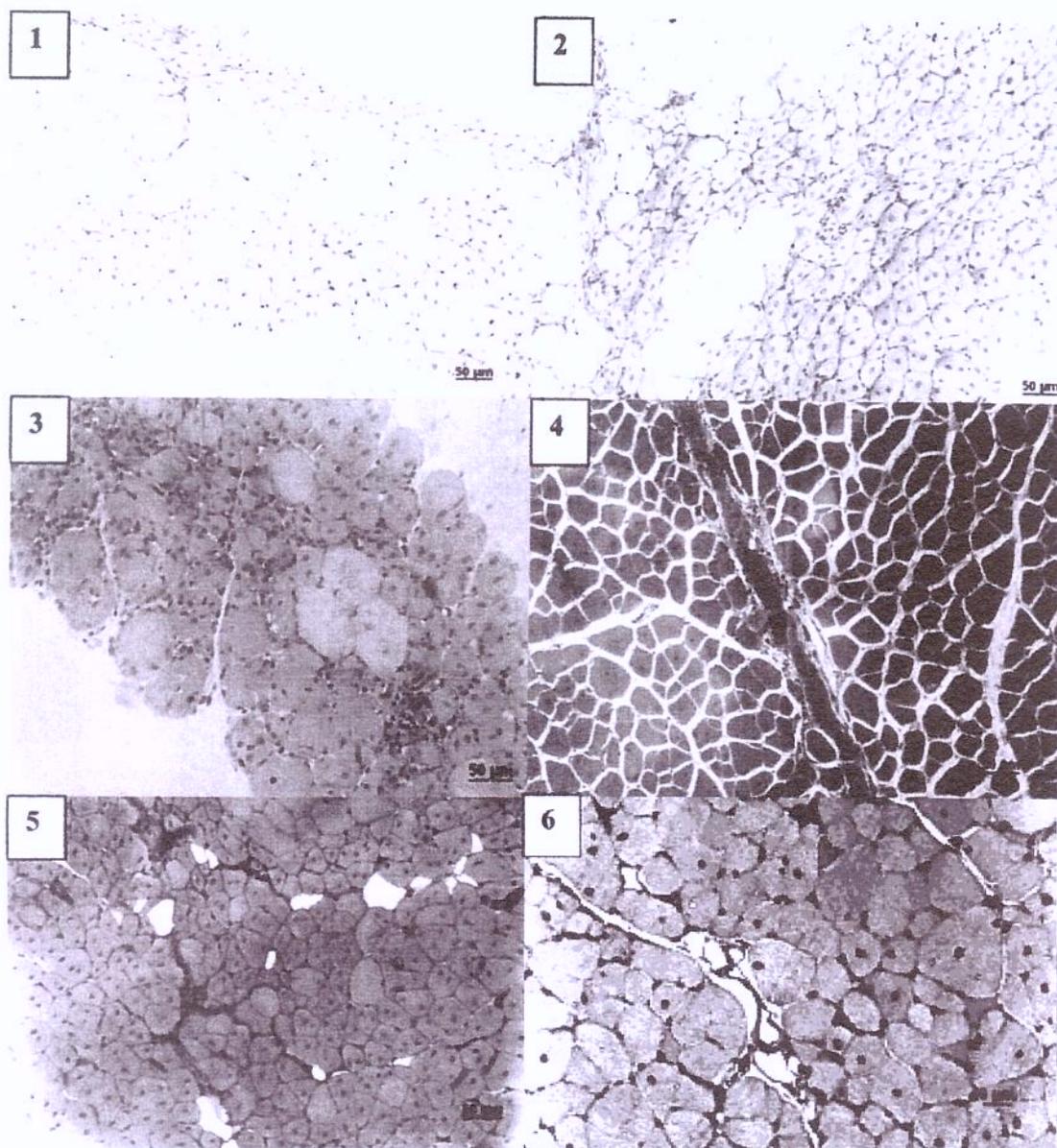


Figura 1 - 3. Corte transversal do músculo tibial anterior de camundongo C57 Bl/10 tratado respectivamente com solução salina, cloridrato de verapamil e DNIS. Figura 4 - 6. Corte transversal do músculo tibial anterior de camundongo mdx tratado respectivamente com solução salina, cloridrato de verapamil e DNIS. H.E.

1. Sobre a metodologia

1.1. O Modelo experimental (camundongo *mdx*)

Os camundongos distróficos surgiram em 1989 a partir de uma mutação espontânea de uma colônia de camundongos da linhagem C57Bl/10 e foram denominados de *mdx* (*x* *chromosome-linked muscular dystrophy*) (SICINSKI *et al.*, 1989).

A partir disto, os camundongos *mdx* têm sido extensivamente utilizados como modelo experimental para investigação de praticamente todos os aspectos inerentes a DMD. Devido à origem dos animais *mdx* os experimentos devem sempre ter como controle os camundongos da linhagem C57Bl/10. Por isto, os mesmos foram por nós empregados qualificando assim os aspectos comparativos do presente trabalho.

Os estudos iniciais visaram, naturalmente, a comparação entre as fibras musculares do camundongo com aquelas dos pacientes com DMD. A seguir passou-se a estudar a fisiopatologia da DMD através das fibras musculares do *mdx*. Assim sendo, as informações hoje conhecidas sobre a fisiopatologia da doença devem-se aos estudos realizados com esses animais (PASTERNAK *et al.*, 1995; LEFAUCHER *et al.*, 1995; PASTORET & SEBILLE, 1995; HAGIWARA *et al.*, 1995; IRINTCHEV *et al.*, 1997; ANDERSON *et al.*, 1998; BOCKHOLD *et al.*, 1998; VILQUIN *et al.*, 1998).

A similaridade entre as fibras musculares dos pacientes e aquelas dos camundongos é a ausência ou redução na expressão da distrofina. O mesmo pode se dizer quanto às moléculas associadas a distrofina, em especial a NOS.

Outro aspecto semelhante entre as duas fibras musculares reside no fato de que, devido à ausência de distrofina elas sofrem necrose. Contudo, a evolução do quadro clínico não é exatamente a mesma. Até o início da senilidade, os camundongos não apresentam fraqueza muscular, não desenvolvem escoliose ou lordose e não vão a óbito. Em camundongos jovens e adultos (cerca de 52 semanas de idade) as fibras musculares necróticas são totalmente substituídas por fibras regeneradas.

Os primeiros sinais de degeneração e regeneração das fibras musculares em animais distróficos iniciam-se por volta de 20 dias de idade. Entre 35 e 90 dias a necrose atinge seu ápice, comprometendo um grande número de fibras. Neste período encontram-se mais de 50% das fibras do músculo em regeneração, com diâmetro variável e centronucleação. Com cerca de 120 dias de idade, praticamente todas as fibras do músculo encontram-se regeneradas (TANABE *et al.*, 1986).

Estudos mais recentes (LEFAUCHER *et al.*, 1995) demonstram que a capacidade regenerativa diminui em animais idosos (65 a 104 semanas), em especial nos músculos esqueléticos de grande volume, como por exemplo, o quadríceps, músculos posturais e o diafragma. Também a capacidade de regeneração muscular decresce com decorrer do tempo, de acordo com o número de ciclos de degeneração – regeneração (LUZ *et al.*, 2002).

Torna-se evidente que estudos que visam testar alguma droga, no sentido de evitar a necrose das fibras, ou retardar a evolução da doença, atuando através dos mecanismos de inflamação devem ser feitos antes do camundongo *mdx* alcançar 21 dias ou após 16 meses de idade de vida. Da mesma forma não há possibilidade de se examinar os efeitos de qualquer droga na estimulação da regeneração muscular, em camundongos cuja faixa etária situe-se entre essas duas idades, pois, a capacidade regenerativa está naturalmente mantida.

Assim sendo, neste trabalho, não utilizamos na avaliação dos prováveis estimuladores da regeneração, músculos distróficos sem indução mionecrose (exceto o controle) por xilocaína, pois os mesmos apresentam naturalmente grande capacidade regenerativa. Considerando essa metodologia, os resultados seriam questionáveis, embora alguns experimentos recentes refiram aumento da regeneração espontânea (não induzida) por algumas moléculas como, por exemplo, aqueles que empregaram doadores de NO (ANDERSON & VARGAS, 2003). Com exceção deste (ANDERSON & VARGAS, 2003) em todos os trabalhos procede-se à indução de regeneração sincronizada.

1.2. Uso da Lidocaína

Basicamente todos os trabalhos que têm como objetivo estudar a regeneração muscular em camundongos *mdx* utilizam-se do esmagamento (“*crush*”) do músculo como instrumento para provocar a necrose (LEFAUCHEUR & SEBILLE 1995; LEFAUCHEUR *et al.*, 1995; IRINTCHEV *et al.*, 1997; ANDERSON, 2000; ANDERSON & VARGAS, 2003).

Como a membrana basal muscular e as células satélites são totalmente preservadas, a regeneração muscular é praticamente total. Com isto, pode-se manipular a regeneração através da administração das drogas ou de demais procedimentos desejados, tais como aplicação de laser, etc.

Neste trabalho, optamos pela lesão química através da injeção de cloridrato de lidocaína. A razão principal dessa escolha foi o fato do mesmo ser feito como rotina em nosso Laboratório de pesquisas. Assim estão bem estabelecidas as doses e volumes, bem como os detalhes de procedimentos necessários para a produção da lesão desejada. Dessa forma a interpretação dos dados pode ser feita com a segurança necessária, permitindo conclusões mais perenes.

Injeções intramusculares de cloridrato de lidocaína ou de outros anestésicos locais como, por exemplo, a bupivacaína, vem sendo empregada como meio para produção de mionecrose em estudos da regeneração, desde a 1970, quando BENOIT & BELT demonstraram que esses agentes produzem necrose dentro de alguns minutos, à qual segue-se rapidamente a remoção dos restos necróticos sendo que a regeneração das fibras completa-se em alguns dias (ORIMO *et al.*, 1991). Sabe-se hoje que as células satélites são resistentes aos anestésicos. Eles preservam também a microcirculação sanguínea e o componente nervoso intramuscular.

Embora a escolha a do anestésico tenha se baseado nas prerrogativas já mencionadas, entendemos que para os objetivos deste trabalho, este represente um modelo mais adequado que do esmagamento do músculo, considerando inclusive que nossos resultados poderiam ser diferentes daqueles ora apresentados, caso optássemos por adotar a técnica de esmagamento.

Para nosso experimento, a adequação do uso das injeções baseia-se em vários pontos, a começar pelo fato que o mecanismo de lesão da fibra muscular assemelha-se em muito àquele aceito para a necrose das fibras distróficas tanto em camundongos *mdx* como em pacientes DMD. Os anestésicos produzem, inicialmente pequenas rupturas do sarcolema através do qual ocorre influxo de cálcio. Com isto, tal como acontece nas fibras distróficas, ocorre hipercontração e necrose. O segundo ponto reside no fato que o esmagamento do músculo produz lesão do componente nervoso intramuscular. A produção de uma lesão com mesma intensidade e extensão não é tão facilmente reproduzida.

O esmagamento inclui alguns parâmetros de difícil controle como, por exemplo, intensidade de força aplicada sobre o músculo. As variações anatômicas também colaboraram para que um mesmo padrão de esmagamento seja difícil de se reproduzir; enquanto em um determinado animal o feixe nervoso localiza-se próximo do local de esmagamento em outro pode localizar-se mais distante.

Diferenças na intensidade da lesão podem comprometer os resultados. Embora a ativação das células satélites e sua diferenciação em mioblasto e posteriormente em miotubos não depende da presença de inervação, seu desenvolvimento posterior depende totalmente da presença da inervação (CHARGÉ & RUDNICKI, 2003).

O esmagamento muscular produz extensas lesões vasculares. O sucesso da regeneração muscular, em especial a velocidade com que a mesma ocorre, depende da integridade dos vasos. A remoção dos restos necróticos depende invariavelmente da presença do infiltrado inflamatório que por sua vez só ocorre em presença de capilares íntegros.

Além de interferir na regeneração muscular, através do retardo na remoção do material necrótico, as lesões vasculares podem influenciar diretamente no processo regenerativo. A ativação das células satélites depende, em parte, de moléculas que atuam como fatores tróficos e que são secretadas por células do infiltrado inflamatório, em especial pelos macrófagos (GROUNDS, 1999).

Devemos nos lembrar que o NO é o eixo deste trabalho e que este está diretamente envolvido na fisiopatologia dos processos inflamatórios em geral (FOSTER *et al.*, 2003) bem como naqueles que envolvem o tecido muscular esquelético (STAMLER & MEISSNER, 2001; CHARGE & RUDNICK, 2003). Lesões da fibra muscular e da matriz extracelular do músculo induzem a produção de NO.

Esses dados nos permitem concluir que o modelo de injeção é mais adequado, pois pode interferir de maneira menos intensa nos processos de liberação de NO no local da lesão, o que poderia influenciar diretamente em nossos resultados.

1.3. Tratamento com vasodilatadores

Cada animal recebeu uma aplicação de 0.1 ml de cloridrato de lidocaína no ventre do músculo tibial anterior direito induzindo-se a lesão das fibras musculares. As aplicações de cloridrato de verapamil e dinitrato de isossorbida foram administradas nos oito dias que se seguiram à aplicação da lidocaína, objetivando a determinar o efeito da vasodilatação *per se* em comparação com a vasodilatação associada à doação de NO.

portanto, cuja expressão de NO estava aumentada a regeneração muscular ocorre mais precocemente, e o que é mais importante, de forma mais extensa.

Dessa forma, entendemos que o presente trabalho aborda um tema bastante atual.

Dentro da grande colaboração originária do trabalho de ANDERSON & VARGAS, a possibilidade de se empregar clinicamente doadores de NO deve ser reexaminada, levando-se em conta ser uma droga comercialmente disponível.

ANDERSON & VARGAS utilizaram um doador indireto de NO, pois a L-arginina é na verdade o substrato para a síntese de NOS. O uso clínico de L-arginina é recente e pouco difundido. Embora pareça ser bem tolerado em humanos, diversos efeitos colaterais como por exemplo, hipercalcemia e reações alérgicas (incluindo-se choque anafilático) têm sido relatados (BOGER & BODE-BOGER, 2001). Imagina-se que em pacientes com DMD algumas dessas alterações possam tornar-se ainda mais importantes pois, algumas delas como a hipercalcemia já se manifestam durante o curso normal da doença e seriam portanto exacerbadas (ENGEL *et al.*, 1998).

Contrariamente ao o que ocorre com a L-arginina, o dinitrato de isossorbida é uma droga utilizada há mais de 50 anos no tratamento de coronariopatias. Esquemas de dosagem, efeitos colaterais e uso prolongado, como requer as terapias da DMD, são por demais conhecidos (PARKER & PARKER, 1998; FUNG, 2004). Eventualmente as limitações ao uso do DNIS ficariam por conta da tolerância ao uso crônico do DNIS. Esse aspecto voltará a ser discutido adiante.

Portanto, neste trabalho não nos limitamos apenas a confirmar os efeitos benéficos de um doador de NO, mas preocupamo-nos em fornecer novos dados empregando como

doador de NO, um fármaco que se encontra disponível para eventuais ensaios clínicos imediatos.

Nossos achados demonstram claramente que a regeneração muscular sincronizada, em músculos distróficos, pode ser significativamente melhorada em sua extensão, pelo uso do DNIS. Esses dados sugerem que pacientes com DMD podem ter algum benefício com essa droga.

Sabe-se que o DNIS é rapidamente metabolizado e que sua vida média é muito curta; cerca de 40 minutos. Como não procedemos nenhuma avaliação da concentração local do NO, uma questão a ser levantada é como explicar o benefício de uma droga tão pouco disponível para a ativação das células satélites.

Devemos nos lembrar que o DNIS é na verdade uma “pré-droga”. Ele é metabolizado no fígado e isto resulta em dois principais metabólitos: o 2-mononitrato de isossorbida e o 5-mononitrato de isossorbida, que são os verdadeiros responsáveis pelas ações biológicas do DNIS. Apesar da rápida metabolização do DNIS, diversos trabalhos tem demonstrado que o 2-mononitrato de isossorbida e o 5-mononitrato de isossorbida, possuem meia vida de 4 e 5 horas respectivamente (PARKER & PARKER, 2001; FUNG, 2004). Além disto, traços de DNIS foram observados em diversos tecidos animais 4 horas após ter sido administrado por via oral e endovenosa. Outro fato relevante é que quando administrado em doses elevadas o DINS é capaz de sustentar os efeitos benéficos por longo período de tempo, o que sugere que o nível plasmático de seus metabólitos mantém-se por tempos maiores (PARKER & PARKER, 2001). É importante mencionar que no presente trabalho utilizamos a dose de DNIS a partir do nível máximo de tolerância do animal à droga.

Isto, mais os fatos descritos acima, pode ser empregado como uma possível explicação para a manutenção do DNIS por tempo suficiente para atuar de forma contínua sobre as células satélites musculares, promovendo assim uma regeneração muscular significativamente melhor que aqueles animais que não foram tratados com DNIS.

Outra questão a ser levantada no presente trabalho é se melhoria da regeneração muscular não pode ser devido aos efeitos vasodilatadores do DNIS. Essa questão fundamenta-se não só em dados da literatura, mas também em nossos próprios resultados, pois observamos que nos animais distróficos tratados com verapamil a regeneração foi significativamente melhor que em animais não tratados e nos tratados com salina, muito embora tenha sido significativamente menos extensa que em animais tratados com DNIS.

Com relação a DMD, nossos resultados referentes ao verapamil não estão de acordo com a literatura. Numerosas observações clínicas demonstraram que o verapamil não produz efeitos benéficos nos pacientes. Os resultados foram bastante negativos, sendo que essa terapia foi abandonada logo após ter sido inicialmente preconizada (ENGEL et al., 1998).

Entretanto a comparação entre a nossa situação experimental e aquelas do tratamento clínico são por demais dissimilares e não permitem conclusão mais efetiva. A começar pelo fato do grupo de pacientes cuja faixa etária e situação clínica diferiam em muito mesmo entre si. Some-se a isto o fato que em nosso trabalho examinamos regeneração muscular do tipo induzida pela injeção da xilocaína.

Contudo o conjunto de dados fornecidos pela literatura não permite que ignoremos o fato de que o verapamil *per se* pode promover algum benefício na regeneração.

A atuação da vasodilatação como fator promotor da regeneração muscular está ligada diretamente ao próprio mecanismo de regeneração muscular. Dentro do processo de regeneração muscular, os fragmentos do sarcoplasma presentes no interior do tubo endomisial necessariamente são removidos através do infiltrado inflamatório caracterizado por polimorfonucleares (CARLSON, 1986; KARPATI & CARPENTER, 1988).

Numa inflamação aguda, como ocorre na lesão induzida em modelos experimentais e na mionecrose e regeneração muscular, o processo de vasodilatação produzida por mediadores químicos como a histamina, a prostaglandina e próprio NO viabilizam alguns eventos celulares.

A estase é produto de diversos fenômenos vasculares e celulares, viabilizados por substâncias denominadas de mediadores químicos. Numa inflamação aguda, como ocorre na lesão induzida em modelos experimentais e na mionecrose muscular, o processo de vasodilatação produzida por mediadores químicos como a histamina, a prostaglandina e o próprio NO viabilizam os eventos celulares. A remoção do material necrótico por leucócitos acelera o processo de regeneração muscular, uma vez que propicia a migração de células satélites para a porção central do tubo endomisial necrótico (MEYER *et al.*, 1984; GROUNDS, 1987).

Os fatores exógenos de ativação de células satélites incluem uma mediação pelo NO envolvendo alguns agentes, como o HGF - fator de crescimento de hepatócitos (TATSUMI *et al.*, 1998; ANDERSON & PILIPOWICZ, 2002). Dessa forma, dentro de 2 dias as células satélites encontram-se ativadas e em atividade mitótica, formando ao final de 4 dias os miotubos multinucleados que dentro de uma semana restabelecem a fibra muscular lesada (SADEH *et al.*, 1985).

Teoricamente, pois, o mesmo princípio da vasodilatação promovida pelo NO otimizando o processo de regeneração muscular, poderia ser observada através da atuação de outros vasodilatadores não doadores de NO, como é o caso do verapamil.

Pode-se considerar, portanto, a atuação do NO no processo de regeneração muscular através de 3 vias: 1) da atuação direta junto às células satélites, promovendo a regeneração muscular; 2) da promoção de vasodilatação, estase, migração leucocitária e remoção do material necrótico, acelerando a ativação de células satélites e otimizando a regeneração; e 3) do estímulo do FGH, que atua diretamente sobre as células satélites.

Portanto é possível que o DNIS, tenha estimulado a regeneração através destes mecanismos. Nossos resultados demonstram que o DNIS promoveu melhoria na regeneração muscular de camundongos *mdx* por uma via adicional àquela da vasodilatação, sendo que os dados quantitativos não deixam dúvidas sobre isto. Imaginamos que essa via adicional seja a ativação das células satélites. O mecanismo pelo qual isto ocorre não está esclarecido, pois a literatura referente à ação do NO na regeneração conta com apenas 2 trabalhos (ANDERSON, 2000; ANDERSON & VARGAS, 2003;) cuja preocupação foi apenas demonstrar que o NO pode melhorar a regeneração muscular.

Nosso trabalho também não permite conclusões acerca do mecanismo de ação do NO sobre as células satélites, mas existe um dado extremamente importante: o DNIS produziu, nos camundongos distróficos um efeito benéfico adicional àquele produzido nos camundongos não distróficos.

Isso permite-nos sugerir, pela primeira vez, que as células satélites ou outras células precursoras da fibra muscular, em animais distróficos, e por extensão na

DMD, podem ser mais susceptíveis à ação do NO ou que o mecanismo de ativação difere em relação às células satélites normais.

Sabe-se que, seguido à injeção de lidocaína e conseqüente necrose das fibras musculares, a reação inflamatória produz de forma desordenada grandes quantidades de NOS induzida (CIRINO *et al.*, 2003). Além disto a matriz extracelular do músculo lesado pela xilocaína, produz a liberação de fator de crescimento de hepatócito (HGF) que é um dos mais importantes ativadores de células satélites (TATSUMI *et al.*, 2002). Em princípio, portanto, o resultado do ganho adicional por parte do DNIS poderia, pois ser explicado pelo mecanismo sinérgico entre esses fatores naturalmente liberados pela inflamação mais o NO exógeno decorrente da administração do DNIS.

Uma segunda explicação, entretanto, baseia-se em um trabalho recente de STUPKA *et al.*, (2004) que demonstraram que a calcineurina, uma fosfatase que regula o mecanismo de transcrição através do cálcio, é determinante para o sucesso da regeneração de fibras musculares distróficas, mas não o é para fibras musculares normais.

Interessante é que a expressão de calcineurina eleva-se após mionecrose por bupivacaína, também um anestésico local (SAKUMA *et al.*, 2003), e que a defosforilação da calcineurina resulta em ativação da nNOS com um óbvio aumento da síntese de NO.

Em função disto, sugerimos que o ganho adicional na população de fibras musculares nos animais distróficos decorre de um sinergismo entre NO derivado da nNOS produzida pela lesão via calcineurina e o NO derivado do DNIS.

Como nossos resultados sugerem, no que diz respeito à capacidade de estimular a regeneração, o DNIS é uma droga potencialmente empregável dentro da NO terapia.

Além da atuação do NO, no que se refere à melhoria da capacidade regenerativa, a análise morfométrica das fibras distróficas revela também atuação no aumento do diâmetro da fibra.

O diâmetro médio das fibras distróficas decresce entre 3 e 5 semanas, sendo verificadas grandes variações nos diâmetros das fibras em relação ao diâmetro médio de 40 μ m das fibras musculares não distróficas (SADEH *et al.*, 1985). Contudo, a média estabelecida para o músculo tibial anterior de camundongos *mdx* situa-se entre 10 e 20 μ m, como taxa predominante (TORRES & DUCHEN, 1984).

A correlação entre o diâmetro das fibras e o NO pode ser verificada em observações experimentais com animais distróficos (ANDERSON; VARGAS, 2003) e não distróficos (WANG *et al.*, 2001)

A inibição crônica da NOS acarreta diversas alterações morfológicas, como redução da massa muscular e do diâmetro da fibra (WANG *et al.*, 2001). Sabendo-se que nos animais distróficos a atividade da NOS está reduzida e, portanto, corroborando para uma redução do diâmetro da fibra, a administração de NO exógeno parece ser o fator mais provável para explicar o aumento do diâmetro em relação aos tratamentos com cloridrato de verapamil e solução fisiológica.

Assim sendo, o grupo distrófico respondeu positivamente ao tratamento com o doador de NO, admitindo o NO exógeno, da mesma forma que este foi utilizado para a otimização do processo regenerativo.

A pergunta final que se coloca é da viabilidade do emprego da droga em humanos, pois é demais sabido que quando usado cronicamente desenvolve-se tolerância ao mesmo. Embora o mecanismo exato de tolerância ao DNIS não esteja ainda esclarecido, existem

basicamente 4 mecanismos para explicá-lo (PARKER & PARKER, 1998; FUNG, 2004), sendo que apenas um deles se refere à via bioquímica do NO. Ele postula que a tolerância ocorre em função da depleção de grupos sulfídricos os quais são necessários a biotransformação do nitrato (que é o elemento do DNIS) em NO. Os demais mecanismos estão relacionados a interações moleculares do tecido vascular como o endotélio e as células musculares lisas dos vasos. Assim sendo, a menos que a tolerância deva-se a depleção dos grupos sulfídricos, a atuação do DNIS sobre a ativação das células satélites pode perdurar por períodos infinitos dando factibilidade ao uso clínico do DNIS no tratamento da DMD.

V - CONCLUSÃO

A administração do DNIS melhora a regeneração muscular sincronizada em camundongos da linhagem *mdx*.

O DNIS tem potencial para uso clínico dentro da terapia baseada em NO, que tem sido proposta para a DMD.

VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, S.; Meguno, T.; Endoh, N.; Terashima, M.; Mitsuoka, M.; Akatsu, M.; Kikuchi, Y.; Tahizawa, K. Response of the radial artery to three vasodilatory agents. *Catheter Card.*, v. 49, n. 3, p. 253-6. 2000.

Anderson, J.E.; Garret, K.; Moor, A.; McIntosh, L.; Penner, K. Dystrophy and myogenesis in mdx diaphragm muscle. *Muscle Nerve*, v. 21, p.1153-1165, 1998.

Anderson JE. A role for nitric oxide in muscle repair: nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells. *Mol Biol Cell.*, v. 11, p.1859-1874, 2000.

Anderson, J.; Pilipowicz, O. Activation of muscle satellite cells in single fibers cultures. *Nitric Oxide*, v.7, n. 1, p. 36-41, 2002.

Anderson J.E.; Vargas, C. Correlated NOS-I μ and myf5 expression by satellite cells in mdx mouse muscle regeneration during NOS manipulation and deflazacort treatment. *Neurom. Disorders*, v.13, n.3003, p.338-386, 2003.

Anderson, J.E.; Wozniak, A.C. Satellite cell activation on fibers: modeling events in vivo - an invited review. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 82, n.5, p. 300-310, 2004.

Angelini, C.; Pegoraro, E.; Turella, E.; Intino, M.T.; Pini, A.; Costa, C. Deflazacort in Duchenne Dystrophy: study of long-term effect. *Muscle Nerve*, v. 17, p. 386-391, 1994.

Arahata, K. Engel, A.G. Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. I. Quantitation of subsets according to diagnosis and accumulation and demonstration and counts of muscle fibers invaded by T cells. *Ann. Neurol.*, v. 16, p. 193-208, 1984.

Arahata, K. Engel, A.G. Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. IV. Cell-mediated cytotoxicity and muscle fibers necrosis. *Ann. Neurol.*, v. 23, p. 168-173, 1988.

Austin, L.; Bower, J.; Kurek.; Vakakis, N. Effects of leukaemia inhibitory factor and cytokines on mirine and human myoblast proliferation. *J.Neurol. Sci.*, v. 112, p. 185-191, 1992.

Bachmann, S.; Mundel, P. Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization and function. *Am. J. Kidn. Dis.*, v. 24, p. 112-129, 1994.

Barton-Davis, E.R.; Cordier, L.; Shoturma, D.I. Leland, S.E., Sweeney, H.L. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal of mdx mice. *J.Clin. Invest.*, v. 104, p. 375-381, 1999.

Benoit, P.W.; Belt, W.D. Destruction and regeneration of skeletal muscle after treatment with a local anaesthetic, bupivacaine (Marcaine). *J. Anat.*, v. 107, n. 3, p.547-556, 1970.

Bertorini, T.E.; Bhattacharya, S.K.; Palmieri, G.M.M.A.; Chesney, C.M.; Pifer, D.; Baker, B. Muscle calcium and magnesium content in Duchene muscular dystrophy. *Neurol.*, v. 32, p.1088-1092, 1982.

Biggar, W.D.; Klamut, H.J.; Demacio, P.C., Stevens, D.J.; Ray, P.N. et al., 2002. Duchenne muscular dystrophy: current knowledge, treatment, and future prospects. *Clin Orthop.*, v. 401, p. 88-106, 2002.

Bischoff, R. The satellite cell and muscle regeneration. In: Engel, A.G.; Franzini-Armstrong, C. **Myology (vol.1)**. USA: McGraw-Hill, p. 97-118, 1998.

Bittner, R.E.; Schofer, C.; Weipoltshammer, K.; Ivanova, S.; Streubel, B.; Hauser, E.; Freiling, M. Hoger, H.; Elbe-Burger, A.; Wachtler, F. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat. Embryol.*, v. 199, p. 391-396, 1999.

Bockhold, K. J.; Rosenblatt, J.D.; Partridge, T. A. Aging normal and dystrophic mouse muscle: analysis of myogenicity in cultures of living single fibers. *Muscle Nerve*, v. 21, p.173-183, 1998.

Bogdanovich, S.; Perkins, K.J.; Krag, T.O.B.; Khurama, T.S. Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions. *Journal of Molecular Medicine*, 2004, v. 82, n.2, p. 102-115. Epub. 12. Review, 2003.

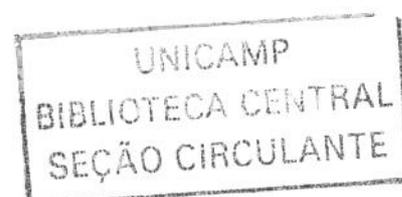
Bogdanovich, S.; K.J.; Krag, T.O.B.; Barton, E.R.; Morris, L.D.; Wittemore, L.A.; Ahima, R.S.; Khurama, T.S. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature*, v. 420, p.418-421, 2002.

Boger, R.H.; Bode-Boger, S.M. The clinical pharmacology of L-arginine. *Ann. Rev. Pharmacol, Toxicol.*, v. 41, p.79-99, 2001.

Bonilla E, Samitt CE, Miranda AF, Hays AP, Salviati G, Di Mauro S, Kunkel EM, Hoffman EP, Rowland LP. Duchene muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell*, v. 54, p. 447-452, 1988.

Bredt, D.S.; Snyder, S.H. Nitric Oxide: A physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 63, p 175-195, 1994.

Brennan, J.E.; Chao, D.S.; Xia, H.; Aldape, K.; Bredt, D.S. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell*, v. 82, p. 743-752, 1995.



Bulfield G, Siler WG, Wight PA, Moore KJ. x chromosome linked dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 81, p. 1189-1192, 1984.

Carlson, B.M. Regeneration of entire skeletal muscle. *Fed. Proc. Bethesda*, v.45, n.5, p. 1456-1469, 1986.

Chang, W.J.; Iannaccone, S.T.; Lau, K.S.; Masters, B.S.; McCabe, T.J., Mc Millan, K. Padre, R.C.; Spencer, M.J.; Tidball, J.G. Stull, J.T. Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 93, n.17, p. 9142-7, 1996.

Chao, D.S.; Silvagno, F.; Bendt, D.S. Muscular dystrophy in mdx despite lack of neuronal nitric oxide synthase. *J.Neurochem.*, v.71, p. 784-789, 1998.

Chargè, S.B.P.; Rudnicki, M.A. cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.*, v. 84, p. 209-238, 2004.

Chaubort, E.; Fossier, P.; Baux, G.; Leprince, C.; Israel, M.; De La Porte, S. Nitric oxide and L-arginine cause an accumulation of utrophin at the sarcolemma: a possible compensation for dystrophin loss in Duchenne muscular dystrophy. *Neurobiol. Dis.*, v. 6, p. 499-507, 1999.

Cirino, G.; Fiorucci, S.; Sessa, W.C. Endothelial nitric oxide syntase: the Cinderella of Inflammation? *Trend. Pharmacol. Sci.*, v. 24, p. 91-95, 2003.

Coleman, M.E.; Demayo, F., Yin, K.C.; Lee, H.M., Geske, R.; Montgomery, C. Scwartz, R.J. Myogenic vector expression of insuline like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myfiber hypertrophy in transgenic mice. *J. Biol. Chem.*, v. 270, p.12109-12116, 1995.

Conger, F.D. Endothelial regulation of vascular tone. *Hosp. Pract.*, v. 15, p. 117-126, 1994.

Corbel, S.Y.; Lee, A.; Yi, L.; Duenas, J.; Brazelton, T.R.; Blau, H. M.; Roosi, F.M.V. Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle. *Nature Medicine*, v. 12, p. 1528-1532, 2003.

Corti, S. et al. A subpopulation of murine bone marrow cells fully differentmates along the myogenic pathway and participates in muscle repair the mdx dystrophic mouse. *Exp. Cell. Res.*, v. 277, p.74-85, 2002.

Crosbie, R.H.; Straub, V.; Yun, H.Y.; Lee, J.C.; Rafael, J.A.; Chamberlain, J.S.; Dawson, T.M.; Campbell, K.P. Mdx muscle pathology is independent of nNOS perturbation. *Hum.Mol. Genet.*, v.7, n.5, p. 823-829, 1998.

Doumit, M.E.; Cook, D.R.; Merkel, R.A. Fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insuline-like growth factors and platelet-derived growth factor-BB stimulate proliferation of clonally derived porcine myogenic satellite cells. *J. Cell. Physiol.*, v. 157, p. 326-332, 1993.

Ebihara, S.; Guibinga, G.H.; Gilbert, R.; Nalbantoglu, J.; Massie, B.; Karpati, G.; Petrof, B.J. Differentaila effects of dystrophin and utrophin gene transfer in immunocompetent muscular dystrophy (mdx) mice. *Physiol. Genomics*, v. 3, p.133-144, 2000.

Engel AG, Yamamoto M, Fishback KH. Dystrophinopaties. In: Engel AG. Franzini-Armstrong C. **Myology (vol.2)**. USA: MacGraw-Hill, p. 1130-1187, 1998.

Ferrari, G.; Cussela – De Angelis, G.; Coletta, M.; Paolucci, E. Stornaiuolo, A.; Cossu, G.; Mavilio, F. Muscle regeneration by bone-marrow-derived myogenic progenitors. *Science*, v. 279, p. 1528-1530, 1998.

Förstermann, U.; Closs, E.I.; Pollock, J.S.; nakane, M.; Schawars, P.; Gath, I.; Kleinert, H.; Nitric oxide synthase isozymes: characterization, purification, molecular cloning and functions. *Hipertension*, v. 23, p. 1121-1131, 1994.

Foster, M.W.; McMahon, J.T.; Stamler, J.S. S-nitrosylation in health and disease. *Trends. Mol. Med.*, v. 9, n. 4, p. 160-8, 2003.

Francke, U.; Ochs, H.D.; de Martinville, B. Minos Xp21 chromosome deletion in a male associated with expression of Duchenne muscular dystrophy, Chronic granulomatous disease, retinitis pigmentosa, and mcLeod syndrome. *Am. J. Genet.*, v. 37, p.250-267, 1985.

Fung, H.L. Biochemical mechanism of nitroglycerin action and tolerance: is this old mystery solved? *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 44, p.47-85, 2004.

Furchgott, R.F.; Zawadzki, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, v. 288, p. 373-376, 1980.

Furchgott, R.F.; Cherri, P.D.; Zawadzki, J.V.; Jothianandan, D. Endothelial cells as mediators of vasodilatation of arteries. *J. Cardiovasc. Pharm.*, v. 53, p. 557-573, 1984.

Genova, M.; Kristek, F. Efficiency of NO donors in substituting impaired endogenous NO production: a functional and morphological study. *Physiol. Res.*, v. 50, n. 2, p.165-73, 2001.

Goodman, L.S.; Gilman, A. As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro: MacGraw-Hill, p.559-632, 2000.

Granchelli, J.A.; Avosso, D.L. Hudecki, M.S.; Pollina, C. Cromolyn increases strength in exercised mdx mice. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, v. 91, p. 287-296, 1996.

Gregorevic, P.; Lankinship, M.J.; Allen, J.M.; Crawford, R.W.; Meuse, L.; Miller, D.G.; Russel, D.W.; Chamberlain, J.S. Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors. *Nature Medicine*, v. 10, n.8, p. 828-834, 2004.

Grounds, M.D. Phagocytosis of necrotic muscle in muscle isografts is influenced by strain, age, end sex of host mice. *J Pathol*, v. 153, p.71, 1987.

Grounds, M.D.; Torrisi, J. Anti-TNF α (Remicade®) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. *FASEB J.*, v. 18, p. 676-682, 2004.

Grounds, M. D.; Muscle regeneration: molecular aspects and therapeutic implications. *Curr. Opin. Neurol.*, v. 12, p. 535-543, 1999.

Guo, Y. Petrof, B.J.; Hussain, S.N. Expression and localization of protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase in DMD. *Muscle Nerve*, v. 24, n. 11, p.1468-75, 2001.

Gussoni, E.; Pavlath, G.K.; Lanctot, A. M.; Sharma, K.R.; Miller, R.G.; Steinman, L. Blau, H.M. Normal Distrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. *Nature*, v. 356, p. 435-438, 1992.

Gussoni, E.; Soneoka, Y.; Strickland, C.D.; Buzney, E.A.; Khan, M.K.; Flint, A.F. Kunkel, L.M.; Mulligan, R.C. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*, v. 401, p. 390-394, 1999.

Gussoni, E.; Bennett, R.R.; Muskiewicz, K.R.; Meyerrose, T.; Nolte, J.A.; Gilgoff, I.; Stein, J.; Chan, Y.M.; Lidov, H.G.; Bonnemann, C.G.; Von Moers, A.; Morris, G.E.; Dundun, J.T.; Camberlain, J.S.; Kunkel, L.M.; Wienberg, K. Long-term persistence, of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. *J. Clin. Invest.*, v. 105, p. 1669-1674, 2002.

Hagiwara, Y.; Mizuno, Y.; Takemitsu, M.; Matsuzaki, T.; Nonaka, I.; Ozawa, E. Dystrophin-positive muscle fibers following transplantation into mdx nude mice. *Acta neuropathol.*, v. 90, p. 592-600, 1995.

Hemler, M.E. Dystroglycan versatility. *Cell*, v. 97, p. 5543-546, 1999.

Hibbs, J.B.Jr.; Taintor, R.R.; Vavrin, Z.; Rachlin, E.M. Nitric oxide a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 157, p. 87-94, 1988.

Hoffmann EP, Brown RH, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchene muscular dystrophy locus. *Cell*, v. 51, p. 919-928, 1987.

Irintchev A, Zweyer M, Wernig A. Impaired functional and structural recovery after muscle injury in dystrophic mdx mice. *Neuro Dis*, v. 7, p. 117-125, 1997.

Karpati, G.; Carpenter, S.; Prescott, S. Small-caliber skeletal muscle fibers do not suffer necrosis in mdx mouse dystrophy. *Muscle Nerve*, v. 11, p. 795-803, 1988.

Khanlari, B.; Linder, L.; Haefeli, W.E. Local effect of transdermal isossordide dinitrate on hand vein diameter. *Eur. J.Clin. Pharmacol.*, v. 57, n. 10, p. 101-4, 2001.

Khurama, T.S.; Davies, K.E. Pharmacological strategies for muscular dystrophy. *Nat. rev. Drug. Discov.*, v. 2, p. 379-390, 2003.

Kiechele, F.L.; Malinski, T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology and detection. *Am.J.Clin.Pathol.*, v. 100, p.567-575, 1993.

Kobzik, L.; Reid, M.B.; Bredt, D.S.; Stamler, J.S. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature*, v. 372, p. 546-548, 1994.

Labarge, M.A.; Blau, H.M. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell*, p. 111, p. 589-601, 2002.

Lee, K.H.; Baek, M.Y.; Monn, K.Y.; Song, W.K.; Chung, C.H.; Ha, D.B.; Kang, M.S. Nitric oxide as a messenger molecule for myoblast fusion. *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 14371-14374, 1994.

Lefaucher JP, Pastorette C, Sebille A. Phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. *Anat Rec.*, v. 242, p. 70-76, 1995.

Lefaucher, J.P.; Sebille, A. Basic growth factor promotes in vivo muscle regeneration in murine muscular dystrophy. *Neuroscience Letters*, v. 202, p. 121-124, 1995.

Levinovitz, A.; Jennische, E.; Oldfors, A.; Edwall, D.; Norstedt, G. Activation of insulin-like growth factor II expression during skeletal muscle regeneration in the rat: correlation with myotube formation. *Mol. Endocrinol.*, v. 6, p. 1227-1234, 1992.

Lynch, G.S.; Cuffe, S.A.; Plant, D.R.; Gregorevic, P. IGF-I treatment improves the functional properties of fast-and-slow-twitch skeletal muscles from dystrophic mice. *Neuromuscul. Disord.*, v. 11, p.260-268, 2001.

Luz, M.A.M.; Marques, M.J.; Santo Neto, H. Impaired regeneration of dystrophin-deficient muscle fibers is caused by exhaustion of myogenic cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 35, p.691-695, 2002.

Mauro, A. Muscle Regeneration. *Raven Press-New York*, 560p., 1978.

Meyer, S.; Kenan, S.; Yarom, R. Enhancement of muscle regeneration by bone marrow cells in the monkey. *Experientia*, v. 40, p. 490, 1984.

Miller, R.G.; Sharma, K.R.; Pavlath, G.K.; Gussoni, E.; Mynhier, M.; Lanctot, A.M.; Greco, C.M.; Steinman, L. Blau, H.M. Myoblast implantation in Duchenne muscular dystrophy: the san Francisco Study. *Muscle Nerve*, v. 20, p. 469-478, 1997.

Moncada, S.; Palmer, R.M.J.; Higgs, E.A. Nitric oxide, physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Ver.*, v. 43, p. 09-142, 1991.

Narita, S.; Yorifuji, H. Centrally nucleated fibers (CNFs) compensate the fragility of myofibers in mdx mouse. *Neuroreport.*, v. 10, p.3233-3235, 1999.

Nathan, C. Natural resistance and nitric oxide. *Cell*, v. 82, p. 873-876, 1995.

Neumeyer, A.M.; Cros, D.; McKenna-Yasek, D.; Zawadzka, A.; Hoffman, E.P. Pegoraro, E.; Hunter, R.G.; Munsat, T.L.; Brown, R.H. Jr.; Pilot study of myoblast transfer in the treatment of Becker muscular dystrophy. *Neurology*, v. 51, p. 589-592, 1998.

Novak, K.J.; Davies, K.E. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment – Third in Molecular Medicine Review Series. *Embo Reports*, v. 5, n. 9, p. 872-876, 2004.

Ohtsuka, T.; Udaka, K.; Yamashiro, Y.; Yagita, H.; Okumura, K. Dystrophin acts as a transplantation rejection antigen in dystrophin-deficient mice: implication for gene therapy. *J.Immunol.*, v. 160, p. 4635-4640, 1998.

Orimo, S.; Hiyamuta, E.; Arahata, K.; Sugita, H. Analysis of inflammatory cells and complement C3 in bupivacaine-induced myonecrosis. *Muscle Nerve*, v. 14, p. 515, 1991.

Paakkari, I.; Lindsberg, P. Nitric oxide in the central nervous system. *Ann. Medic.*, v. 27, p. 369-377, 1995.

Pagel, C.N.; Morgan, J.E. Myoblast transfer and gene therapy in muscular dystrophies. *Microsc. Res. Tech.*, v. 30, n. 6, p.469-479, 1995.

Palmer, R.M. Ferrige, A.G.; Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, v. 327, p.524-526, 1987.

Parker, J.D.; Parker, J.O. Nitrate therapy for stable angina pectoris. *New Engl. J.Med.*, p. 520-531, 1998.

Partidrg, T.A.; Morgan, J.E.; Coulton, G.R.; Hoffman, E.P.; Kunkel, L.M. Conversion of mdx miofibras from dystrophin-negative to dystrophin-positive by injection of normal myoblasts. *Nature*, v. 337, p. 176-179, 1989.

Pasternak, C.; Wong, S.; Elson, E.L. Mechanical function of dystrophin in muscle cells. *The Journal of Cell Biology*, v. 128, n. 3, p. 355-361, 1995.

Pastoret, C.; Sebillé, A. Mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *J. Neurol. Sci.*, v. 129, p. 97-105, 1995.

Pearson, C.M. The striated muscle. The Williams & Wilkins Company - Baltimore, 518p., 1973.

Rando, T.A. Role of nitric oxide in the pathogenesis of molecular dystrophies: a "two hit" hypothesis of the cause of muscle necrosis. *Microscopy Res. Tech.*, v. 55, n.4, p. 223-235, 2001.

Sadeh, M.; Czyewski, K.; Stern, L. Chronic myopathy induced by repeated bupivacaine injections. *Journal of the Neurological Sci.*, v.67, p.229-238, 1985.

Sakuma, K.; Nishikawa, J.; Nakao, R.; Watanabe, K.; Totsuka, T.; Nakano, H. Sano, M. Calcineurin is a potente regulator for skeletal muscle regeneration by association with NFATc1 and GATA-2. *Acta Neuropatol.*, v. 105, p.271-280, 2003.

Schmalbruch, H.; Hellhamer, U. The number of satellite cells in normal human muscle. *Anat. Rec.* v. 185, p. 279-288, 1976.

Schultz, E.; McCormick, K.M. Skeletal muscle satellite cells. *Ver. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, v. 123, p. 213-257, 1994.

Schuman, E.M.; Madison, D.V. Nitric Oxide and synaptic function. *Annu. Ver. Neurosci.* v. 17, p.153-83, 1994.

Sicinski, P.; Geng Y.; Ryder-Cook, A. S.; Barnard, E.A.; Darlinson M.G.; Barnard, P.J. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science*, v. 244, p.1578-1580, 1989.

Stamler, J.S.; Meissner, G. Physiology of nitric oxide in muscle. *Physiol. Rev.*, v. 81, n.1, p. 209-237, 2001.

Strapkova, A.; Nosalova, G. Nitric oxide and airway reactivity. *Bratisl. Lek. Lisly.*, v. 102, n. 8, p. 345-50, 2001.

Tanabe, Y.; Esaki, K.; Nomura, T. Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. *Acta Neuropathol.*, v. 69, p. 91-95, 1986.

Tatsumi, R.; Anderson, J.E.; nevoret, C.J.; Halevy, O.; Allen, R.E. HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev. Biol.*, v. 194, p.114-128, 1998.

Tatsumi, R.; Hattori, A.; Ikeuchi, Y.; Anderson, J.E.; Allen, R.E. Release of hepatocyte growth factor from mechanically stretched skeletal muscle satellite cells and role of pH and nitric oxide. *Mol. Biol. Cell.*, v. 13, p. 1909-2918, 2002.

Torres, L.F.; Duchen, L.W. The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological study of nerves, muscles and endplates. *Brain*, v. 110, p. 269-299, 1987.

Tremblay, J.P.; Malouin, F.; Roy, R.; Huard, J.; Bouchard, J.P.; Satoh, A.; Richards, C.L. Results of a triple blind clinical study of myoblast transplantations without immunosuppressive treatment young boys with Duchenne muscular dystrophy. *Cell Transplant.*, v. 2, p. 99-112, 1993.

Verellen-Dumoulin, C.; Freund, M.; DeMeyer, R. Expression of na x-linked muscular dystrophy in a female due to translocation involving Xp21 and non-random inactivation of the normal x-chromosome. *Hum. Genet.*, v. 67, p. 115-119, 1984.

Vilquin, J.T.; Brussee, V.; Asselin, I.; Kinoshita, I.; Gingras, M.; Tremblay, J.P. Evidence of mdx mouse skeletal muscle fragility in vivo by eccentric running exercise. *Muscle Nerve*, v. 21, p. 567-576, 1998.

Wang, B.; Li, J.; Xiao, X. Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 97, p. 13714-13719, 2000.

Wang, M.X.; Murrel, D.F.; Szabo, C.; Warren, R.F.; Sarris, M.; Murrell, G.A. Nitric oxide in skeletal muscle: inhibition of nitric oxide synthase inhibits walking speed in rats. *Nitric Oxide*, v. 5, n. 3, p.219-32, 2001.

Wells, D.; Wells, K. Gene transfer studies in animals: What do they really tell us about the prospects for gene therapy in DMD? *Neuromuscular Disord.*, v. 12 , (Suppl) S11, 2002.

Xu, Z.P.; Yue, Y.P.; Lai, Y.; Te, C.Y. Qiu, J.M. Pintel, D.J.; Duan, D.S. Trans-splicing adeno-associated viral vector-mediated gene therapy is limited by the accumulation of spliced mRNA but not by dual vector coinfection efficiency. *Human Gene Therapy*, v. 15, p. 896-905, 2004.

Yue, Y.P.; Skimming, J.W.; Liu, M.J.; Fang, Y.J.; Strawn, T.; Duan, D.S. Expressing full-length dystrophin in 50% cardiomyocytes corrects cardiomyopathy in the mdx mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *Molecular therapy*, v. 9, p. S95-S95, 2004.

Zacharias, J.M.; Anderson, J. E. Muscle regeneration after imposed injury is better in younger than older mdx dystrophic mice. *Journal of Neurological Science.*, v. 10, p.190-196, 1991.