

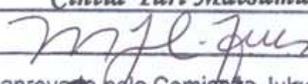


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CINTIA YURI MATSUMURA

**“MECANISMOS DE PROTEÇÃO DA DISTROFIA  
MUSCULAR: ESTUDO PROTEÔMICO E TERAPIA  
FARMACOLÓGICA”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
*Cintia Yuri Matsumura*  
  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia  
para obtenção do Título de Doutora em  
Biologia Celular e Estrutural, na área de  
Anatomia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Julia Marques

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

M429m Matsumura, Cintia Yuri, 1981-  
Mecanismos de proteção da distrofia muscular:  
estudo proteômico e terapia farmacológica / Cintia Yuri  
Matsumura. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Maria Julia Marques.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Camundongo *mdx*. 2. Distrofia muscular de  
Duchenne. 3. Estreptomicina. 4. Músculos  
extraoculares. 5. Proteoma. I. Marques, Maria Julia,  
1961-. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Protective mechanisms of muscular dystrophy: proteomic study and pharmacological therapy

**Palavras-chave em Inglês:**

*Mdx* mice

Duchenne muscular dystrophy

Streptomycin

Extraocular muscle

Proteome

**Área de concentração:** Anatomia

**Titulação:** Doutor em Biologia Celular e Estrutural

**Banca examinadora:**

Maria Julia Marques [Orientador]

Anselmo Sigari Moriscot

Cristina Guatimosin Fonseca

Marcondes Cavalcante Franca Junior

Rosely Oliveira Godinho

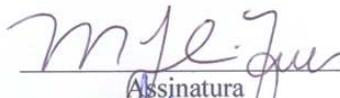
**Data da defesa:** 30-07-2012

**Programa de Pós Graduação:** Biologia Celular e Estrutural

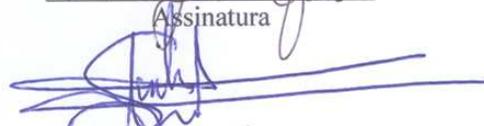
Campinas, 30 de Julho de 2012

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Maria Julia Marques (Orientadora)

  
Assinatura

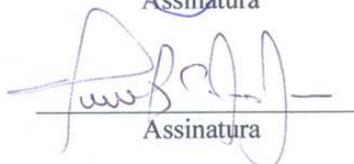
Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot

  
Assinatura

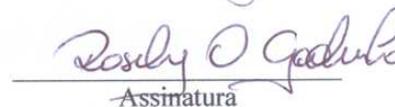
Profa. Dra. Cristina Guatimosim Fonseca

  
Assinatura

Prof. Dr. Marcondes Cavalcante Franca Junior

  
Assinatura

Profa. Dra. Rosely Oliveira Godinho

  
Assinatura

Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profa. Dra. Rosana Macher Teodori

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

\_\_\_\_\_  
Assinatura

*“A alegria não chega apenas no encontro do achado,  
mas faz parte do processo da busca.  
E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura,  
Fora da boniteza e da alegria”*

Paulo Freire

## AGRADECIMENTOS/ACKNOWLEDGEMENTS

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós.  
Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”

Antoine de Saint-Exupéry

### **Agradeço...**

Á Deus pela presença em minha vida, dando-me força e consolo, guiando os meus passos nas incertezas, mostrando que sempre há um caminho a ser percorrido e colocando em meu caminho pessoas amigas e preciosas.

Aos meus pais, Masaharu e Rieko, e irmãos, Márcia e Alexandre pelo amor incondicional, incentivo e apoio em todos os momentos, que foram indispensáveis para realização de mais esta importante fase em minha vida.

À Profa. Dra. Maria Júlia Marques pela confiança e condução dos meus passos acadêmicos desde a iniciação científica. Muito obrigada por todos os conhecimentos compartilhados, confiança, oportunidades, incentivo, amizade e paciência que foram primordiais para meu desenvolvimento pessoal e profissional ao longo destes anos.

To Prof. Madeleine Durbeej-Hjalt for the welcome, trust, support and knowledge shared during my doctoral training in Sweden. Thank you very much for giving me the opportunity to be part of your team and to perform the proteome experiments that were essential for this work.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela contribuição ao meu desenvolvimento pessoal e profissional e pela oportunidade de realizar meu doutorado com estágio no exterior.

Ao Prof. Dr. Bruno Menezes de Oliveira pela amizade, apoio, conhecimentos compartilhados, sugestões, colaboração, receptividade e respeito. Muito obrigada pela

disponibilidade em ensinar a técnica de proteoma e possibilitar a execução destes experimentos no laboratório da Profa. Dra. Madeleine Durbeej-Hjalt que foram imprescindíveis para a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Humberto Santo Neto pela amizade, incentivo, conhecimentos compartilhados e pelas valiosas considerações para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Elaine Minatel que acompanhou meu início na pesquisa, pelo incentivo a continuar sempre, amizade, respeito e considerações.

À Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete pela amizade, respeito, apoio, conhecimentos transmitidos e pela disponibilidade em participar da minha banca de doutorado.

A Profa. Dra. Laurecir Gomes, Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro e Prof. Dr. Edison Duarte pela disponibilidade em participar e pelas pertinentes considerações dadas no Exame de Qualificação.

Ao Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot, Profa. Dra. Cristina Guatimosim Fonseca e Profa. Dra. Rosely Oliveira Godinho pela disponibilidade em participar da pré-banca e banca.

Ao Prof. Dr. Marcondes Cavalcante Franca Junior, Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho e Profa. Dra. Rosana Macher Teodori pela disponibilidade em participar da banca.

Aos docentes do Departamento de Anatomia pela contribuição dada para a minha formação e pelo conhecimento compartilhado ao longos destes anos.

À Profa. Dra. Lea Rodrigues Simioni, Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva e Prof. Edson Rosa Pimentel pela atenção, disponibilidade e pela oportunidade ímpar de aprender e realizar a técnica miográfica para verificar a força de contração do diafragma *in vitro*, a técnica de PCR-RT *real time* e a de zimografia.

À Deirdre Donovan Giraldo pela paciência, atenção, amizade e incentivo. Muito obrigada pelos ensinamentos da língua Inglesa que possibilitaram meu estágio no exterior e meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Gildo Bernardo Leite pela imensa atenção, receptividade e disponibilidade em realizar a preparação do músculo diafragma para a técnica de miografia.

À Fernanda Losi Alves de Almeida, Andrea Aparecida de Aro e Flávia Da Ré Guerra pela amizade e disponibilidade em ensinar as técnicas de PCR-RT real time e de zimografia.

Ao Marco Aurélio Ribeiro de Paula e Norivaldo Celestino pela amizade, apoio e colaboração nos procedimentos experimentais deste trabalho.

A Marlene Lima e Ana Floriana Rodrigues pela amizade e auxílio durante a realização deste trabalho.

À Liliam Alves Senne Panagio pela amizade, atenção e auxílio durante toda a pós-graduação.

À Érika S. Campos, Paulo A. Bernardes, Paulo F. Santos, Stella M. F. Ferraz, Toni D. Santos, Walter Ferreira e Carlos Gonçalves (*in memoriam*) pelo apoio e convívio ao longo desses anos.

À Adriana Pertille, Ana Paula T. Taniguti e Letícia M. Apolinário, amigas e companheiras de todas as horas, pelos bons momentos compartilhados desde a iniciação científica. Muito obrigada por todo o apoio, dedicação, paciência e considerações que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho e para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório Adriana F. Maurício, Aline Macedo, Drielen O. Moreira, Érica B. Silva, Érika Tonon, Isabel C. C. Barbin, Juliano A. Pereira, Luis H. Rapucci, Matheus B. Rovere, Natália C. Pinheiro, Paula S. Perez, Rafael V.

Machado, Renato Ferretti, Samara C. Carvalho, Tereza C. P. Albuquerque pela amizade, apoio e aprendizagem diária ao longo desses anos.

Aos meus amigos de pós-graduação Amanda Cia Hetzl, André Luis Bombeiro, Cristiano Viera, Eduardo M. Cândido, Fábio Montico, Gustavo F. Simões, Larissa A. Kido, Leslie C. Pinto, Mariane Barroso, Raísa Mistieri, Renata Zanon, Sheila C. Victorio, Wagner J. Fávaro e Wilson R. Nakagaki pelo grande carinho e amizade construída.

To my friends and colleagues from The Biomedical Centre of Lund University, Sweden: Ake Oldberg, Anki Knutsson, Anna H. Nilsson, Annelie Shami, Gunnel Roos, Hooi Min Tan Grahn, Igor Arregi, Kinga I. Gawlik, Linda Elowsson, Martina Schneider, Renata Mezsaros, Sol da R. Baez, Uwe Rauch, Virginie Carmignac, Xiaojie Xian and Zandra Körner for the warm welcome, friendship, knowledge shared and for making my doctoral training in Sweden so much easier and more pleasant.

To my friends and colleagues who I first met in Lund, but who come from different parts of the world: Beti Angelevska, Vivien Henck, Dora Tinku, Marion Dosnon, Saskia Frerichs, Tomohiro Tasaki e família, Adriana Mattoso, Béla Köves, Christina Parknäs e família, Madla A. Passos, Sigurborg Ragnarsdóttir, Cibely C. F. de Oliveira and Daniel Michalik for your friendship, companionship, support, affection, and for showing me the world through our conversations and for making my stay in Sweden so pleasant, cheerful and now nostalgic.

À todas as pessoas que não pude mencionar e que torcem não só pela minha formação acadêmica, mas também pelo sucesso na trajetória da minha vida. Recebam minha sincera gratidão.

À **FAPESP** (08/54775-5; 08/58491-1), **CNPq** (143373/2008-0) e **CAPES** (2014-10-6) pela concessão de bolsas e auxílios financeiros, que tornaram possíveis a execução e a finalização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>OBJETIVOS</b> .....	10
1. Estudo Proteômico .....	10
2. Terapia Farmacológica .....	10
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	11
1. Animais .....	11
2. Grupos Experimentais .....	12
2.1 Estudo Proteômico .....	12
2.2 Terapia Farmacológica .....	12
3. Estudo Proteômico .....	13
3.1 Preparação das Amostras de Músculo .....	14
3.2 Marcação com TMT ( <i>Tandem Mass Tag</i> ) .....	14
3.3 Espectrometria de Massa das Amostras Marcadas com TMT .....	17
3.4 Análise Estatística .....	17
4. Terapia Farmacológica .....	18
4.1 Tratamento com Estreptomicina .....	18
4.2 Treinamento – Exercício de Corrida em Esteira .....	18
4.3 Análise Funcional .....	19
4.4 Determinação de Creatina Quinase (CK) .....	20
4.5 Análise Histopatológica .....	20
4.6 Determinação de Cálcio Total nos Músculos .....	24
4.7 Quantificação de Proteínas por Western Blot .....	25
4.8 Análise Estatística .....	27
<b>RESULTADOS</b> .....	28
1. Estudo Proteômico .....	28
1.1 Identificação de Proteínas .....	29
1.2 Comparação entre os Grupos .....	30
1.3 Diferenças Constitutivas entre os Músculos Diafragma e Extraocular .....	34

1.4 Proteínas Relacionadas a Degeneração/Regeneração Muscular e/ou Proteção a Mionecrose.....	35
2. Terapia Farmacológica .....	36
2.1 Massa corpórea, Creatina Quinase (CK) e Força de Tração .....	36
2.2 Índice de Degeneração e Regeneração .....	37
2.3 Determinação de Cálcio Total nos Músculos .....	39
2.4 Imunofluorescência de Distrofina e TRPC1 .....	41
2.5 Quantificação de Proteínas por Western Blot .....	43
<b>DISCUSSÃO</b> .....	47
1. Estudo Proteômico .....	47
1.1 Proteínas Relacionadas a Proteção a Mionecrose .....	47
1.2 Proteínas Relacionadas a Degeneração/Regeneração Muscular .....	49
1.3 Possíveis Marcadores Moleculares da Distrofia Muscular .....	51
2. Terapia Farmacológica .....	55
2.1 Quantificação de Proteínas por Western Blot .....	56
<b>CONCLUSÕES</b> .....	63
1. Estudo Proteômico .....	63
2. Terapia Farmacológica .....	63
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	64
<b>ANEXOS</b> .....	77
1 - Tabelas completas das proteínas com maior ou menor quantidade quando comparados os diferentes músculos e grupos.....	77
2 - Certificado e Declaração da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	85

**LISTA DE ABREVIATURAS**

2D	-	Duas dimensões
a-syn	-	Alfa-sintrofina
AE	-	Corante azul de Evans
b-DG	-	Beta-distroglicana
b-SG	-	Beta-sarcoglicana
BB	-	Músculo bíceps braquial
Ca <sup>2+</sup>	-	Íons cálcio
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	-	Concentração de Ca <sup>2+</sup> intracelular citoplasmática
CaM	-	Calmodulina
CDG	-	Complexo distrofina-glicoproteínas
CK	-	Creatina quinase
CSQ	-	Calsequestrina
ct	-	Controle
DABCO	-	1,4-diazabicyclo octano
DIA	-	Músculo diafragma
DMD	-	Distrofia muscular de Duchenne
EO	-	Músculo extraocular
ERO	-	Espécies reativas de oxigênio
estrepto	-	Estreptomicina
exerc	-	Exercitado
FDR	-	<i>False discovery rate</i>
Gal-1	-	Galectina-1
GAPDH	-	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
Grb2	-	proteína 2 ligada ao receptor de fator de crescimento ( <i>growth-factor receptor-bound protein-2</i> )
HE	-	Hematoxilina-eosina
ICP-EOS	-	Espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente ( <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i> )

<i>Mdx</i>	- Distrofia muscular ligada ao cromossomo X ( <i>X chromosome-linked muscular dystrophy</i> )
MT	- Mitocôndria
MudPIT	- Tecnologia de identificação multidimensional de proteína ( <i>multidimensional protein identification technology</i> )
Na-Ca X	- Trocadores de sódio-cálcio
NC	- Fibras com núcleo central
nNOS	- Sintase de óxido nítrico neuronal ( <i>neuronal nitric oxide sintase</i> )
NP	- Fibras com núcleo periférico
<i>PANTHER</i>	- <i>Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships</i>
PBS	- Tampão fosfato salina ( <i>phosphate buffered saline</i> )
RS	- Retículo sarcoplasmático
RyR	- Receptores rianodina
SAC	- Canais ativados por estiramento ( <i>Stretch-activated channels</i> )
sal	- Salina
SCX	- <i>Strong Cation-Exchange</i>
sed	- Sedentário
SERCA	- Bomba $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático
STN	- Músculo esternomastoideo
TA	- Músculo tibial anterior
TCEP	Tris 2-carboxietil-fosfina
TMT	- Marcadores isobáricos de peptídeos ( <i>tadem mass tagging</i> )
TNF- $\alpha$	- Fator de necrose tumoral- $\alpha$ ( <i>tumor necrosis factor-alpha</i> )
TRPC1	- Canais potencial receptor transiente, subfamília C, membro 1 ( <i>transient receptor potential cation, subfamily C, member 1</i> )
TRPV2	- Canais potencial receptor transiente, subfamília V, membro 2 ( <i>transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 2</i> )
TT	- Túbulo T

## RESUMO

Na Distrofia Muscular de Duchene (DMD) e em seu modelo experimental, camundongos *mdx*, a ausência ou disfunção da proteína distrofina leva a degeneração muscular. Acredita-se que a patogênese da DMD esteja relacionada à fragilidade do sarcolema, ao estresse mecânico e ao maior influxo de íons cálcio na fibra muscular resultante do funcionamento anormal de canais iônicos, como os canais de cálcio ativados por estiramento. O conhecimento das proteínas envolvidas na degeneração/regeneração muscular e na proteção a mionecrose da fibra muscular distrófica é essencial para a caracterização das distrofias musculares, bem como para o estabelecimento de métodos diagnósticos e de tratamentos preventivos ou terapêuticos. No presente trabalho estudamos os mecanismos de proteção a degeneração muscular, sendo dois os objetivos. No primeiro, identificamos proteínas envolvidas na proteção a mionecrose e nos processos de degeneração/regeneração muscular através do estudo proteômico dos músculos afetados ou não pela distrofia muscular em camundongos *mdx* e em animais controle. No segundo, verificamos a participação dos canais de cálcio ativados por estiramento na degeneração da fibra muscular através do seu bloqueio pela estreptomicina nos diferentes músculos distróficos de *mdx*. Adicionalmente, verificamos os potenciais efeitos secundários da estreptomicina na estabilidade do sarcolema e no tamponamento e sinalização de cálcio. Quanto ao estudo proteômico, nossos resultados sugerem que a diferença constitutiva dentre músculos afetados e não afetados pela degeneração são fundamentais para proteção a mionecrose, permitindo a manutenção da homeostase de cálcio e melhor resposta ao estresse mecânico e oxidativo. As proteínas galectina-1, anexina A1 e proteína 1 de interação com Reticulon-4 são possíveis biomarcadores para a distrofia muscular, uma vez que participam de diferentes processos celulares. Quanto a terapia farmacológica verificamos que os músculos distróficos mais afetados, como o diafragma, possuem maior quantidade de canais de cálcio ativados por estiramento e a estreptomicina atenuou a degeneração dos músculos distróficos. Diferente do efeito secundário de outros bloqueadores de canais de cálcio, a estreptomicina não alterou as proteínas do complexo distrofina-glicoproteína (beta-distroglicana e alfa-sintrofina), bem como as relacionadas ao cálcio (calsequestrina e calmodulina). Nossos resultados abrem novas perspectivas para o desenvolvimento de terapias farmacológicas relacionadas a proteínas envolvidas na degeneração muscular e na proteção a mionecrose, assim como para o desenvolvimento de métodos diagnóstico e de acompanhamento das distrofinopatias pelos marcadores moleculares.

## ABSTRACT

In Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) and in the mdx mice model of DMD, the lack of dystrophin leads to muscle degeneration. The pathogenesis of DMD is related to sarcolemmal fragility, mechanical stress and increased influx of calcium in muscle fibers, due to dysfunction of ion channels, such as the stretch-activated calcium channels. The knowledge of the proteins related to muscle degeneration/regeneration and to the protection against myonecrosis is essential to better characterize the muscular dystrophy and to establish new diagnostic tools, in addition to new preventive or therapeutic treatments. In the present study, we addressed new mechanisms of muscle protection by focusing on two main objectives. First, to identify proteins related to the protection against myonecrosis and to muscle degeneration/regeneration by performing a comparative proteomic study of spared and affected muscles of mdx and control mice. Second, to verify the involvement of stretch-activated calcium channels in dystrophic muscle degeneration by performing a drug therapy with a stretch-activated calcium channels blocker, streptomycin, in muscles that are differently affected by the lack of dystrophin, in the exercised-mdx mice. Furthermore, we were interested to see whether the stretch-activated calcium channels blocker would have additional effects on sarcolemmal stability and on calcium buffering and signaling, as previously reported for other calcium channels blockers. The proteomic study suggests that constitutive differences among spared and affected dystrophic muscles are essential for muscle protection against myonecrosis, allowing a better calcium homeostasis and response to oxidative and mechanical stress. Galectin-1, annexin A1 and the protein interacting with Reticulon-4 are potential biomarkers for muscular dystrophy, due to their involvement in different cellular processes. The drug therapy study shows that stretch-activated calcium channels participates in dystrophic muscle degeneration, showing higher levels in the mostly affected muscle, the diaphragm. Streptomycin protects the dystrophic muscles against myonecrosis, but has no further effects on other mechanisms of dystrophic muscle protection, i.e., did not improve the dystrophin-glycoprotein complex (assayed by beta-dystroglycan and alpha-syntrophin levels), nor calcium binding protein (assayed by calsequestrin and calmodulin levels). Overall, the present study opens new perspectives for the development of drug therapies to dystrophinopathies by suggesting potential new molecular markers of dystrophy (proteomic study) and by suggesting new mechanistic views to explain the differences in the response of dystrophic muscles to the lack of dystrophin (drug therapy).

## **INTRODUÇÃO**

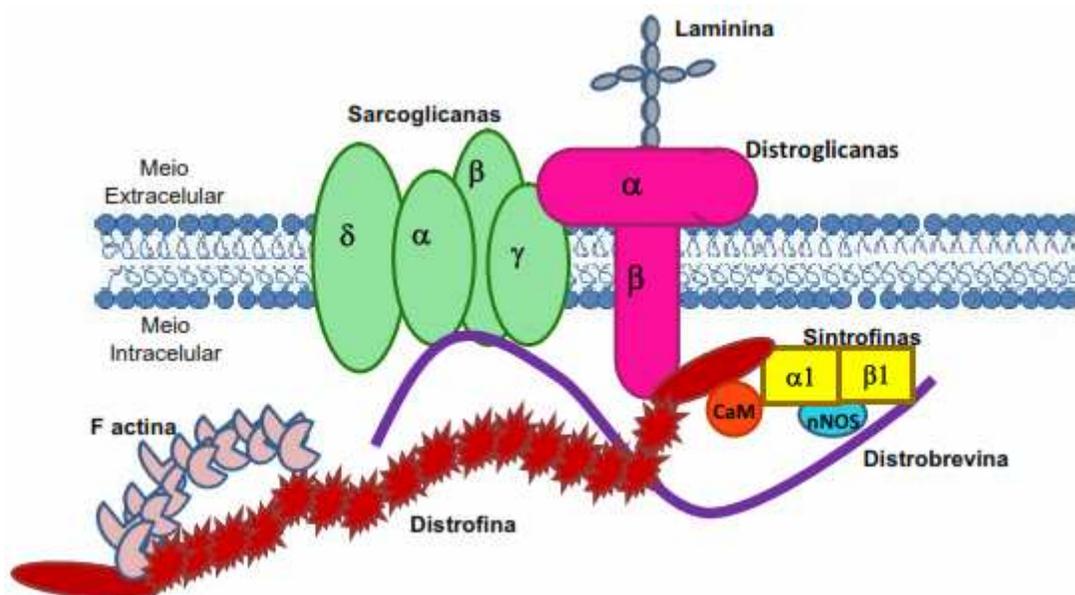
---

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD; OMIM 310200), descrita em 1861, é considerada a mais comum e devastadora das distrofias musculares humanas, afetando uma em cada 3500 crianças do sexo masculino nascidas vivas. É caracterizada por fraqueza muscular progressiva seguida por perda de função e óbito por comprometimento cardiorrespiratório em torno da segunda ou terceira década de vida (Engel et al, 1994; Petrof, 1998; Biggar et al, 2006).

A DMD é uma doença recessiva ligada ao cromossomo X, basicamente encontrada em pessoas do sexo masculino. A anormalidade genética está na sequência de nucleotídeos responsável pela expressão da proteína distrofina. Aproximadamente 30% dos casos originam-se de mutação espontânea, sendo o restante dos casos herdados do genótipo materno. Devido ao tamanho e complexidade do gene, a frequência de mutação, deleções ou duplicações é elevada (Tinsley et al, 1994). Isso resulta na leitura errada e/ou parada prematura da transcrição gênica e codificação anormal da proteína, tornando-a instável e facilmente degradada por proteases endógenas (Seixas et al, 1997).

A distrofina está associada a glicoproteínas, formando o complexo distrofina-glicoproteínas (CDG), que atravessa o sarcolema e estabelece conexão do citoesqueleto intracelular com a matriz extracelular da fibra muscular (Brown, 1997; Petrof, 2002; Spencer e Mellgren, 2002). A ausência da distrofina prejudica esta conexão, promovendo desorganização dos componentes do CDG e instabilidade do sarcolema durante os ciclos de contração e relaxamento, levando a lesão do sarcolema, degeneração da miofibrila, inflamação e fibrose (Grounds et al, 2005).

No modelo do CDG representado na figura 1, a  $\alpha$ -dístroglicana está ligada ao sarcolema por interações com o complexo transmembrana constituído de beta-dístroglicana (b-DG) e complexo de proteínas sarcoglicanas (Ibraghimov-Beskrovnya et al., 1992). A cauda citoplasmática da b-DG liga-se a distrofina na região rica em cisteína pelo domínio WW e a  $\alpha$ -dístroglicana liga-se aos componentes da matriz extracelular, em especial a agrina e laminina, para promover a ligação entre o citoesqueleto interno e a matriz extracelular (Ervasti e Campbell, 1993). As regiões N-terminal da distrofina associam-se ao citoesqueleto de actina, embora a região central também possua propriedades de ligação a actina. Por fim, o domínio C-terminal interage com as distrobrevinas e as sintrofinas.



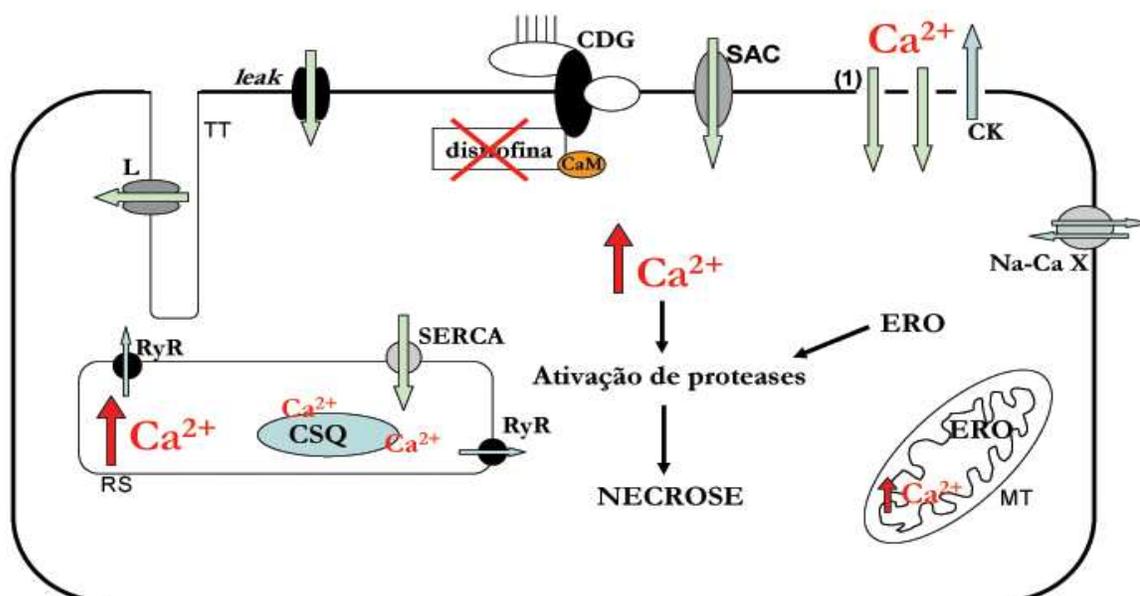
**Figura 1:** Organização molecular do complexo distrofina-glicoproteínas no sarcolema, incluindo os componentes integrais do complexo (dístrofina, complexo dístroglicano, complexo sarcoglicano,  $\alpha$ -dístrobrevina e sintrofinas), a ligação com a matriz extracelular (laminina), parte da ligação intracelular (F-actina) e moléculas de sinalização ligadas ao complexo (sintase de óxido nítrico neuronal – nNOS e calmodulina - CaM). Figura elaborada pelos alunos do Laboratório de Biologia Estrutural do Sistema Neuromuscular, Instituto de Biologia - UNICAMP.

Sugere-se que o CDG confere estabilidade ao sarcolema durante a contração e relaxamento da fibra muscular (Engel et al., 1994), além de servir como sinalizador de processos intracelulares que levam a mecanismos de defesa, a regulação de processos vitais ou a morte da fibra muscular. As moléculas de sinalização associadas ao CDG incluem calmodulina (CaM), proteína 2 ligada ao receptor de fator de crescimento (*growth-factor receptor-bound protein-2*, Grb2) e óxido nítrico sintase neuronal (para revisão vide Rando, 2001; Gailly, 2002; Marques, 2004).

Mutações nos componentes deste complexo podem causar diferentes formas de distrofia muscular de herança autossômica. Em pacientes com DMD, há um desbalanço dos componentes do CDG no sarcolema (Ervasti et al., 1990), sugerindo que a distrofina é essencial para a correta formação do CDG.

O mecanismo pelo qual defeitos do CDG causam degeneração muscular permanece desconhecido. Acredita-se que a patogênese da DMD esteja relacionada à fragilidade do sarcolema, ao estresse mecânico e ao maior influxo de íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) na fibra muscular resultante de disfunção de canais iônicos (Franco-Obregon Jr e Lansman, 1990; Matsumura et al., 2011) ou pela presença de microrupturas do sarcolema resultantes da força contrátil dos sarcômeros (Grounds et al., 2005; Marques et al., 2008). De maneira geral, as células mantêm baixas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular livre no citosol ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), havendo alta concentração extracelular deste íon. Em fibras musculares distróficas é observada alteração na concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  (Turner et al., 1991), que se encontra elevada no sarcoplasma, no retículo sarcoplasmático e na mitocôndria (Mallouk et al., 2000).

A mobilização do  $\text{Ca}^{2+}$  (influxo, efluxo e estocagem intracelular) é realizada por canais voltagem-dependentes e receptor-operados, como os receptores rianodina e dihidropiridina, canais de cátions não seletivos como tipo *leak* e canais operados por estoque ou ativados por estiramento (*Stretch-activated channels*, SAC). Alterações no funcionamento destes canais contribuem para o manejo anormal do  $\text{Ca}^{2+}$  em miócitos distróficos (para revisão vide Vandebrouck et al., 2006; Krüger et al., 2008; Figura 2).



**Figura 2:** Regulação de íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) em uma fibra muscular esquelética distrófica. As setas indicam a movimentação de  $\text{Ca}^{2+}$ . O influxo de cálcio ocorre através de canais de tipo-*leak*, de canais ativados por estiramento (SAC), de trocadores de sódio-cálcio (Na-Ca X), localizados no sarcolema, e de canais tipo-L (L), localizados nos túbulos T (TT). No retículo sarcoplasmático (RS), o influxo e efluxo de cálcio é regulado por receptores rianodina (RyR) e bombas  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do RS (SERCA). O cálcio bombeado para o retículo sarcoplasmático liga-se a calsequestrina (CSQ), que contribui para o tamponamento de cálcio no RS. A calmodulina (CaM) liga-se ao complexo distrofina-glicoproteínas (CDG) pela distrofina e participa da regulação de  $\text{Ca}^{2+}$  por vias de sinalização. Durante os ciclos de contração e relaxamento há um aumento das microrupturas transitórias da membrana plasmática (1), permitindo o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e a saída de proteínas citoplasmáticas como a creatina quinase (CK). O aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  na mitocôndria (MT) aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que assim como o aumento da concentração de cálcio sarcoplasmático ativa proteases e diferentes vias degenerativas, que levam à mionecrose.

Adicionalmente, a regulação da concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se dá por trocadores de sódio-cálcio (Na-Ca X, Figura 2) e proteínas ligantes ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Dentre estas, destacam-se a calsequestrina (CSQ) e a CaM. A CSQ seqüestra o  $\text{Ca}^{2+}$  no retículo sarcoplasmático durante o relaxamento muscular, tamponando o  $\text{Ca}^{2+}$  liberado durante a contração (Yano et al., 1994). A CaM é uma proteína quinase  $\text{Ca}^{2+}$  dependente, que regula a interação de vários componentes do CDG e participa da sinalização celular e da ativação de canais do sarcolema (Jarrett e Foster, 1995).

Avanços no conhecimento dos fenômenos biológicos envolvidos na DMD ocorrem graças à existência de modelos experimentais para a distrofia muscular. Homólogos da DMD tem sido identificados em vários animais incluindo: cães, gatos, camundongo, peixes e invertebrados. Nos cães, assim como na DMD, a mionecrose não é compensada pela regeneração muscular resultando em perda muscular acompanhada de fibrose e infiltrado inflamatório. Várias raças de cães são descritas como modelo para DMD, sendo a distrofia muscular do Golden Retriever (Cooper et al., 1988) a mais estudada e melhor caracterizada. Embora seja o modelo mais próximo ao humano, o custo de manutenção é alto e as espécies não são geneticamente manipuláveis (Collins et al., 2003).

A deficiência de distrofina em gatos resulta em distrofia muscular felina hipertrófica (Carpenter et al., 1989), que é caracterizada por repetidos ciclos de degeneração e regeneração, hipertrofia muscular e ausência de fibrose (Kohn et al., 1993). Os gatos apresentam desvantagens quanto ao tamanho e à limitada similaridade da patologia com os pacientes. O *zebrafish* e o nemátodo *Caenorhabditis elegans* apresentam musculatura e patologia diferente dos humanos, mas podem ser mantidos em grande número e são de fácil

manipulamento genético (Chambers et al., 2001; Baumeister & Ge, 2002; Collins & Morgan, 2003; Rubinstein 2003).

O camundongo *mdx* (*X chromosome-linked muscular dystrophy*; Bulfield et al., 1984) é geneticamente e bioquimicamente homólogo ao paciente com DMD, embora apresente um fenótipo mais brando. Diferente da miopatia humana, os músculos do *mdx* regeneram sucessivamente após um período de necrose (Torres e Duchon, 1987). Os primeiros sinais de degeneração e regeneração das fibras musculares no *mdx* iniciam-se por volta dos 20 dias de vida. Acredita-se que o início repentino da mionecrose observada nessa idade seja devido ao aumento da atividade muscular que ocorre neste período, que aumentaria a susceptibilidade das fibras musculares à lesão (Tanabe et al., 1986; Cullen e Jarros, 1988; Disatnik et al, 1998). Entre 35 e 90 dias de vida, a necrose atinge seu ápice e após 120 dias de vida, a incidência de fibras necróticas é reduzida (Tanabe et al, 1986; Disatnik et al, 1998). Embora apresente certas limitações, o camundongo *mdx* é o modelo mais utilizado para o estudo da DMD devido a sua rastreabilidade genética, a larga disponibilidade e o baixo custo de produção e manutenção quando comparados a outros modelos mamíferos.

O tratamento para a DMD é feito atualmente com glicocorticoides, como o deflazacorte e a prednisona. Os glicocorticoides são uma classe de hormônio esteróide utilizados como imunossupressores e anti-inflamatórios. No músculo esquelético, eles retardam a perda de força e aumentam a massa muscular, prolongando a ambulação e a manutenção da função pulmonar, possivelmente devido ao seu efeito anti-inflamatório (Engel et al., 1994; Manzue et al., 2008; Escolar et al., 2011). Entretanto, o uso contínuo de glicocorticoides promove efeitos colaterais, tais como ganho de peso, atrofia muscular, alteração de densidade da matriz óssea e fraturas, alterações no comportamento, deficiência adrenal, atrofia do baço,

baixa estatura e síndrome de Cushing (Chrousos et al., 1993; Talim et al., 2002, Manzur et al., 2008; DeBosscher, 2010). Várias terapias farmacológicas estão sendo testadas para minimizar a evolução da doença, prolongando e melhorando a qualidade de vida dos pacientes com DMD. Dentre elas podemos destacar o uso de anti-inflamatórios, bloqueadores de canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , antifibróticos e inibidores de proteases (para revisão Whitehead, 2004). Bloqueadores de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  são drogas que inibem o aumento sarcoplasmático de  $\text{Ca}^{2+}$ . A estreptomicina, antibiótico aminoglicosídico, atua como bloqueador de SAC no tecido muscular (Whitehead et al., 2006). Sugere-se que os SAC são fonte primária de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  nos músculos distróficos, pois em camundongos *mdx* jovens, antes do início da degeneração muscular, a atividade destes canais está aumentada (Franco-Obregon Jr e Lansman, 1994).

Os canais SAC pertencem a família dos canais TRPC (*transient receptor potential cation*) (Maroto et al., 2005). Os canais TRPs, principalmente TRPV2 (Zanou et al., 2009) e TRPC1, são fundamentais para a regulação da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  nos músculos esqueléticos (Sauborin et al., 2009), principalmente durante repetidas contrações (Zanou 2010). Sugere-se que o TRPC1 compõe um complexo macromolecular que inclui a distrofina (Sauborin et al., 2009). Em fibras musculares distróficas, o TRPC1 regula a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Franco-Obregon Jr e Lansman, 1994; Gervásio et al., 2008), pode ser ativado por estiramento da membrana (Maroto et al., 2005) e pode causar alteração na homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  (Vanderbrouck et al., 2002; 2007; Williams e Alen, 2007). A expressão de TRPC1 está aumentada nos músculos esquelético (Vandebrouck et al., 2002) e cardíaco do *mdx* (Williams e Allen, 2007). A entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  no músculo esquelético pelos canais TRPC1

parece ser regulada por sua associação com a  $\alpha$ -sintrofina que ancora os canais SAC ao CDG (Vandebrouk et al., 2007).

Previamente, mostramos que bloqueadores de canais de cálcio tipo-L, além de reduzirem a mionecrose, também apresentam efeitos secundários de proteção aumentando a quantidade das proteínas b-DG e CSQ (Matsumura et al., 2009). O aumento da b-DG, proteína do CDG, está relacionado a maior estabilidade do sarcolema (Dowling et al., 2003), enquanto o aumento da CSQ promoveria tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  no interior do retículo sarcoplasmático e, em consequência, contribuiria para a homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Rossi e Dirksen, 2006; Ferretti et al., 2009; Pertille et al., 2010). Sendo assim, o estudo de bloqueadores de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e de seus efeitos secundários em proteínas que possam levar a proteção a mionecrose podem fornecer importantes informações sobre a patogênese das distrofias musculares. O tratamento com estreptomicina diminuiu fibras musculares com alteração de permeabilidade e em degeneração e protegeu fibras musculares isoladas (*in vitro*) da perda de força, no músculo extensor longos dos dedos de camundongos *mdx* (Whitehead et al., 2006; Jorgensen et al., 2011).

Os músculos distróficos da pata, do dorso, do pescoço e o diafragma apresentam diferenças na evolução e na intensidade das lesões musculares, sendo que o diafragma apresenta patologia severa com degeneração progressiva (Pastoret e Seville, 1995; Marques et al., 2008; Matsumura et al., 2009). Diferente da maioria dos músculos distróficos que não apresentam distrofina e sofrem degeneração muscular, os músculos extraoculares (EO) e intrínsecos da laringe dos camundongos *mdx* também não expressam distrofina, mas não apresentam degeneração muscular (Khurana et al., 1995; Andrade et al., 2000, Marques et al., 2007). Este fato ressalta a importância do estudo dos músculos EO para o entendimento

da distrofia muscular, visto que o comportamento destes músculos sugere que a falta da distrofina parece não ser essencial para que ocorra a mionecrose. Os mecanismos pelos quais os músculos EO são protegidos ainda não são totalmente conhecidos. Acredita-se que esta proteção das fibras musculares esteja relacionada à propriedades especiais de fibras de contração rápida de pequeno diâmetro (Karpati et al., 1988; Andrade et al., 2000), ao aumento da quantidade de utrofina (Porter et al., 1998), à manutenção da proteína b-DG do CDG (Dowling et al., 2003), à habilidade intrínseca desses músculos em manter a homeostase do  $Ca^{2+}$  (Khurana et al., 1995, Pertille 2010) e a uma população ativa de células satélites (Kallestad et al., 2011).

O entendimento dos mecanismos envolvidos na degeneração/regeneração e proteção da fibra muscular distrófica é essencial para a caracterização das distrofias musculares, bem como para o estabelecimento de novas terapias. No presente trabalho estudamos o envolvimento do  $Ca^{2+}$  nestes mecanismos, através das seguintes abordagens: na primeira, realizamos o estudo proteômico comparativo dos músculos extraoculares e diafragma dos animais distróficos (*mdx*) e normais para a identificação das proteínas e possíveis vias envolvidas na proteção a mionecrose. Na segunda, verificamos os efeitos de um bloqueador de SAC na patogênese de músculos distróficos com características funcionais e moleculares distintas (tibial anterior, bíceps braquial, esternomastoideo e diafragma), através da análise histopatológica e quantificação por western blot das proteínas reguladoras de  $Ca^{2+}$  (CSQ e CaM), da proteína do SAC (TRPC1) e das proteínas do CDG ( $\beta$ -sarcoglicana,  $\alpha$ -sintrofina e  $\beta$ -dystroglicana).

## **OBJETIVOS**

---

### **1. Estudo proteômico**

Identificar proteínas envolvidas na proteção à mionecrose e nos processos de degeneração/regeneração muscular através do estudo proteômico dos músculos extraoculares e diafragma de camundongos *mdx* e seu controle.

### **2. Terapia farmacológica**

Verificar o efeito da estreptomicina nos diferentes músculos de camundongos *mdx* submetidos ao treinamento em esteira.

Verificar efeitos secundários da estreptomicina em proteínas relacionadas à constituição dos canais ativados por estiramento, à estabilidade do sarcolema e ao tamponamento e sinalização de cálcio.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### **1. Animais**

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas das linhagens C57BL/10ScCr/PasUnib e C57BL/10-Dmd<sup>mdx</sup>/PasUnib, obtidos a partir do acasalamento de animais machos hemizotos e fêmeas homozigotas e mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia, UNICAMP. As matrizes foram oriundas do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica, UNICAMP. Para o estudo farmacológico apenas machos foram utilizados, uma vez que machos e fêmeas apresentam diferenças no metabolismo de energia, na distribuição dos tipos de fibra muscular e na intensidade de lesão mecânica após o exercício (Glenmark et al., 2004; Grounds et al., 2008). Para o estudo proteômico foram utilizados animais de ambos os sexos devido ao grande número necessário de animais por grupo, dado o pequeno tamanho dos músculos EO. Para minimizar as diferenças entre os gêneros nos diferentes grupos do estudo proteômico foram utilizados o mesmo número de machos (n=3) e fêmeas (n=3) em todos os grupos e repetições biológicas.

Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em mini-isoladores de rack ventilada, em condições ambientais controladas (12 horas de ciclo claro/escuro) com ração e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados em acordo com as diretrizes para experimentação animal de nossa Instituição, sob o protocolo da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA-IB-UNICAMP) nº 1576-1 (em anexo) e sob permissão do comitê para pesquisa animal de Malmö/Lund – Suécia, M6209.

## 2. Grupos Experimentais

### 2.1 Estudo Proteômico

**Grupo proteoma (n=36):** Este grupo teve por objetivo identificar as proteínas relacionadas aos mecanismos de proteção muscular, através da análise proteômica comparativa entre os músculos EO e diafragma (DIA) dos animais distróficos e normais.

- **controle (n=18):** animais da linhagem C57BL/10ScCr/PasUnib foram comparados ao grupo *mdx*, por possuírem distrofina e não apresentarem ciclos de degeneração/regeneração da fibra muscular.

- ***mdx* (n=18):** animais da linhagem *mdx*. Este grupo possui músculos sem distrofina que são afetados (DIA) ou não (EO) pela degeneração muscular.

### 2.2 Terapia Farmacológica

**Grupo C57BL/10 (n=10):** animais da linhagem C57BL/10ScCr/PasUnib. Este grupo teve por objetivo servir de comparativo aos demais grupos, por não apresentar ciclos de degeneração/regeneração da fibra muscular.

**Grupo sedentário/salina (sed/sal, n=15):** animais da linhagem *mdx*, com objetivo de observar a degeneração da fibra muscular distrófica em camundongos não tratados e não exercitados.

**Grupo exercitado/salina (exerc/sal, n=15):** animais da linhagem *mdx* submetidos ao treinamento em esteira.

**Grupo sedentário/estreptomicina (sed/estrep, n=15):** animais da linhagem *mdx* tratados e não exercitados.

**Grupo exercitado/estreptomicina** (exerc/estrep, n=15): animais da linhagem *mdx* submetidos ao tratamento e treinamento.

### 3. Estudo Proteômico

Realizamos o estudo proteômico dos músculos EO e DIA de camundongos *mdx* para identificar proteínas envolvidas na degeneração/regeneração muscular e proteção a mionecrose, assim como possíveis biomarcadores para detecção e avaliação da DMD.

A eletroforese bidimensional (2 dimensões, 2D) em gel é uma técnica de separação bem estabelecida e muito utilizada na análise proteômica. Essa técnica é utilizada para o pré-fracionamento das amostras de lisado protéico proporcionando a separação das proteínas pelo seu ponto isoelétrico e peso molecular e aumentando a possibilidade de detecção de proteínas. Entretanto, a eletroforese 2D apresenta algumas limitações de sensibilidade, problemas de detecção de proteínas pouco abundantes, baixa solubilidade de proteínas hidrofóbicas e de membrana e, principalmente, baixa reprodutibilidade dos resultados (Griffin e Aebersold, 2001).

Para minimizar estes problemas realizamos a análise proteômica pela tecnologia de identificação multidimensional de proteína (*multidimensional protein identification technology*, MudPIT) com marcadores isobáricos de peptídeos (TMT – *tandem mass tagging*) durante nosso estágio de doutorado sanduíche no laboratório da Profa. Dra. Madeleine Durbeej-Hjalt, Universidade de Lund – Suécia e em colaboração com o pós-doutorando Prof. Dr. Bruno Menezes de Oliveira. Esta técnica associa a separação de proteínas por cromatografia líquida, marcação dos peptídeos com TMT e a identificação de proteínas por espectrometria de massas. Por este processo é possível identificar proteínas

presentes em diferentes compartimentos celulares, com valores muito ácidos ou básicos de ponto isoelétrico, peso molecular elevado e em pequenas quantidades na amostra (Washburn et al., 2001).

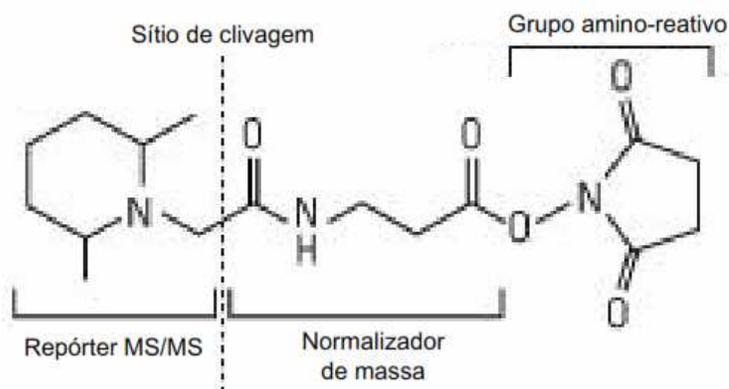
### **3.1 Preparação das Amostras de Músculos**

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Os músculos EO e DIA foram retirados e congelados em nitrogênio líquido à -196 °C. Os músculos congelados foram esmagados de maneira a formarem um pó fino, 0,1 g a 0,3 g de tecido foram homogeneizados em tampão de solubilização (10 mM NaHCO<sub>3</sub>; 4% SDS; inibidor de protease e inibidor de fosfatase; Roche - Indianapolis, IN, USA). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 17572 g por 10 min e o sobrenadante coletado. A quantificação de proteínas totais das amostras dos músculos foi realizada pelo método de Bradford (1976). Para a normalização das diferentes replicatas biológicas foi feito um pool com todas as amostras, sendo 25 µg de proteína total de cada amostra divididos em 3 alíquotas.

### **3.2 Marcação com TMT (*Tandem Mass Tag*)**

As amostras foram processadas segundo as instruções do *TMTsixplex<sup>TM</sup> Isobaric Mass Tagging Kit* (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Este kit apresenta 6 marcadores isobáricos, que permitem a análise de 6 amostras diferentes em uma única corrida no espectrometro de massas. Cada marcador é composto de um grupo éster-NHS amino-reactivo que se liga a proteína, um espaçador (normalizador de massa) e um repórter MS/MS (Figura 3). Cada amostra é marcada com um repórter de massa única resultando em um

espectro MS/MS de 126 a 131 Da. Os íons repórteres estão em uma região de baixo peso molecular do espectro MS/MS e são utilizados para quantificação da expressão relativa de proteínas durante a fragmentação dos peptídeos. As diferentes massas do íon repórter se equilibram com a massa das regiões espaçadoras resultando em marcadores com a mesma massa molecular total.



**Figura 3:** Fórmula estrutural dos marcadores TMT (*Tandem Mass Tag*) composto por diferentes regiões: grupo éster-NHS amino-reactivo que se liga a proteína, um espaçador (normalizador de massa) e um repórter MS/MS.

A cada 100  $\mu\text{g}$  de proteína total foram adicionados 45  $\mu\text{l}$  de 200 mM TEAB (bicarbonato de amônio trietilico) e o volume final foi ajustado para 100  $\mu\text{l}$  com água ultra pura. As amostras foram incubadas com 5  $\mu\text{l}$  de 200 mM TCEP (tris 2-carboxietil-fosfina) a 55  $^{\circ}\text{C}$  por 1 h e em seguida com 5  $\mu\text{l}$  de 375 mM iodoacetamida diluído em TEAB a temperatura ambiente por 30 min protegido da luz. Para precipitação das proteínas, 1 ml de acetona foi adicionado a cada amostra e incubado a -20  $^{\circ}\text{C}$ , *overnight*.

As amostras foram centrifugadas a 8000 g por 10 min a 4  $^{\circ}\text{C}$ . Os tubos foram cuidadosamente invertidos para retirar a acetona sem remover o precipitado e mantidos

abertos por 10 min para a evaporação da acetona. O precipitado foi ressuspensão em 100 µl de 200 mM TEAB e digerido com 2,5 µl de tripsina a 37 °C *overnight*. Para marcação dos peptídeos, foram adicionados às amostras 41 µl de reagente *TMT Label* e incubados por 1 h à temperatura ambiente. Para parar a reação foram adicionados 8 µl de 5% hidroxilamina e incubados por 15 min. As amostras foram combinadas conforme indicado na tabela 1 e armazenadas a -80 °C.

**Tabela 1:** Desenho experimental para dois músculos (extraocular e diafragma) em duas condições (controle e *mdx*) e com 3 repetições biológicas.

<b>Repetição Biológica 1</b>	<b>Músculo</b>	<b>Condição</b>	<b>Marcador TMT</b>
1. 100 µg	EO	Ct	127
2. 100 µg	DIA	<i>mdx</i>	128
3. 100 µg	EO	Ct	131
4. 100 µg	DIA	<i>mdx</i>	130
Pool amostras 1-12. 100 µg			126
<b>Repetição Biológica 2</b>	<b>Músculo</b>	<b>Condição</b>	<b>Marcador TMT</b>
5. 100 µg	EO	Ct	130
6. 100 µg	DIA	<i>mdx</i>	131
7. 100 µg	EO	Ct	128
8. 100 µg	DIA	<i>mdx</i>	127
Pool amostras 1-12. 100 µg			126
<b>Repetição Biológica 3</b>	<b>Músculo</b>	<b>Condição</b>	<b>Marcador TMT</b>
9. 100 µg	EO	Ct	131
10. 100 µg	DIA	<i>mdx</i>	130
11. 100 µg	EO	Ct	127
12. 100 µg	DIA	<i>mdx</i>	128
Pool amostras 1-12. 100 µg			126

O volume das amostras foi reduzido em *speed vac* para menos de 100 µl. A cada amostra foram adicionados 500 µl de tampão 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25% acetonitrila, pH 2,9. O pH das amostras foi ajustado para < 2,9 com 85% ácido ortofosfórico. Para o

fracionamento das amostras foi utilizada coluna SCX (*Strong Cation-Exchange*) de cromatografia líquida de alta performance. Os peptídeos foram eluídos em diferentes concentrações de KCl (30, 60, 90, 120, 240, 300, 420 e 500 mM) em tampão 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25% acetonitrila, pH 2,9. As frações foram coletadas, liofilizadas em *speed vac* e ressuspensas em 50-150  $\mu\text{l}$  de 5% ácido fórmico. Em seguida, as frações foram dessalinizadas em colunas Ultra Microspin C18 (The Nest Group, Southboro, MA, USA) e eluídas com 50  $\mu\text{l}$  de 50% acetonitrila e 5% ácido fórmico, liofilizadas em *speed vac* e ressuspensas em 30  $\mu\text{l}$  de 0,1% ácido fórmico.

### **3.3 Espectrometria de Massa das Amostras Marcadas com TMT**

Seis microlitros de cada fração foram injetados no espectrometro de massa Orbitrap-XL. A análise de dados e a quantificação dos resultados foram realizadas no programa MASCOT. As proteínas obtidas foram analisadas pelo programa *PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships)* e classificadas de acordo com o processo biológico em que participam

### **3.4 Análise Estatística**

Para a análise estatística foi realizado o teste-t de Student, sendo os valores de  $p \leq 0,05$ , com quantidades menores que -1,25 ou maiores que 1,25 e com coeficiente de variação menor que 20% considerados significativamente diferentes. Para a correção dos valores falso-positivos foi utilizado o FDR (*false discovery rate*) com valores de q estimados.

## **4. Terapia Farmacológica**

### **4.1 Tratamento com Estreptomicina**

Os camundongos dos grupos sed/estrep e exerc/estrep receberam injeção intraperitoneal diária de estreptomicina diluída em solução fisiológica (182 mg/kg, Whitehead et al., 2006) do 18º ao 36º dia de vida pós-natal. O início do tratamento antecedeu os ciclos de degeneração-regeneração. Os animais dos grupos *mdx* e exercício foram injetados com solução salina no mesmo período e frequência. A dose de 182 mg/kg via intraperitoneal em camundongos *mdx* diminuiu a permeabilidade do sarcolema do músculo extensor longo dos dedos, indicando proteção a mionecrose (Whitehead et al., 2006).

### **4.2 Treinamento - Exercício de Corrida em Esteira**

O exercício em esteira foi utilizado para aumentar a ativação de canais ativados por estiramento e a degeneração muscular nos camundongos *mdx* (para revisão ver Whitehead et al., 2006; Grounds et al., 2008). Um protocolo de corrida de 30 min em esteira horizontal na velocidade de 12 m/min, 2 vezes por semana por pelo menos 4 semanas, começando com 4 semanas de idade causa diminuição na força de tração nos camundongos *mdx* (Granchelli et al., 2000; De Luca et al., 2002), aumento dos níveis séricos de creatina quinase e aumento da mionecrose nos músculos tríceps, gastrocnêmio e quadríceps (De Luca et al., 2005; Pierno et al., 2007).

Diferente do protocolo descrito por Granchelli (2000) e De Luca (2002) em que o treinamento foi realizado logo após o primeiro pico de degeneração, iniciamos o exercício antes do começo da degeneração, aumentamos a frequência e diminuímos o período de

treinamento para avaliar a ação da estreptomicina durante o primeiro pico de degeneração. Os camundongos dos grupos exerc/sal e exerc/estrep foram submetidos ao exercício de corrida em esteira do 18º ao 36º dia de vida pós-natal, três vezes por semana, por 30 min na velocidade de 12,42 m/min (Granchelli et al., 2000; De Luca et al., 2002 - modificado).

Antes do início do treinamento os animais passaram por um período de adaptação, sendo colocados na esteira desligada no 14º dia de vida pós-natal e na esteira ligada por 10 min no 16º dia de vida pós-natal. Todos os camundongos completaram o treinamento, não sendo necessário a exclusão de nenhum animal durante a realização do experimento.

### 4.3 Análise Funcional

Ao início e final do tratamento foi realizada a medida da força de tração dos membros torácicos dos camundongos. Os animais foram posicionados sobre o medidor horizontal de força (New Primer, São Paulo, BR), de forma que as patas dianteiras segurassem um anel metálico ligado a um transdutor de força (Figura 4).



**Figura 4:** Medidor horizontal de força (*Grip strength meter*) utilizado para medir a força de tração exercida pelos membros torácicos do camundongo.

As 5 medidas de força de tração máxima foram registradas e posteriormente normalizadas pela massa do animal, sendo a força de tração expressa em g/g de massa corporal (Payne et al., 2006; Taniguti et al., 2011).

#### **4.4 Determinação de Creatina Quinase (CK)**

A quantificação de CK no plasma sanguíneo é um dos parâmetros bioquímicos utilizado para detecção e quantificação da degeneração muscular. Durante a lesão muscular ocorre ruptura do sarcolema e liberação da enzima citoplasmática CK para a corrente sanguínea. Para observar a ação do treinamento e do tratamento sobre a degeneração muscular, realizamos a quantificação de CK nos grupos sed/sal (n=5), exerc/sal (n=5), sed/estrep (n=5) e exerc/estrep (n=5). No 36º dia de vida pós-natal, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (130 mg/kg) e cloridrato de xilazina (6,8 mg/kg) e o sangue coletado por punção cardíaca. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 936 g e 4 °C por 10 minutos. O plasma foi separado e utilizado para quantificação de CK (CK-NAC Cinético Crystal, Bioclin, Belo Horizonte, Minas Gerais, BR). As absorbâncias das amostras foram lidas a 25 °C utilizando-se espectrofotômetro UV (Genesys 20, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) com comprimento de onda de 340 nm e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

#### **4.5 Análise Histopatológica**

##### **Marcação com o Corante Azul de Evans**

O corante azul de Evans (AE; *tetrasodium diazo salt Evans blue dye*) é uma molécula com alta afinidade a albumina sérica e impermeável à membrana citoplasmática,

não penetrando em células com a membrana plasmática íntegra. A marcação *in vivo* com este corante evidencia a alteração de permeabilidade do sarcolema e fibras em degeneração (Matsuda *et al.*, 1995). Uma solução de 1% de AE em tampão fosfato (14 g de fosfato de sódio monofásico, 4,3 g de fosfato de potássio bibásico anidro, 72 g de cloreto de sódio em 1 L de água destilada, pH 7,5) foi injetada intraperitonealmente na concentração de 0,1 g/kg de peso do animal (Matsuda *et al.*, 1995; Marques *et al.*, 2007). Após 12 horas da injeção os animais foram sacrificados.

### **Retirada e Processamento dos Músculos**

Músculos dos membros torácico (bíceps braquial - BB) e pélvico (tibial anterior – TA) utilizados para locomoção e músculos axiais utilizados na manutenção da postura (esternomastoideo - STN) e na respiração (DIA) de camundongos controle e *mdx* foram estudados. Esses músculos apresentam composição mista com predominância de fibras de contração rápida (Burkholder *et al.*, 1994; Fuentes *et al.*, 1998; Guido *et al.*, 2010). Em geral, as fibras de contração rápida são mais susceptíveis a degeneração muscular nas distrofinopatias (Lynch *et al.*, 2001) e quando submetidos ao exercício em esteira (Grounds *et al.*, 2008).

Os músculos dos animais sed/sal (n=5), exerc/sal (n=5), sed/estrep (n=5) e exerc/estrep (n=5) foram processados segundo metodologia descrita por Straub *et al.* (1997) para verificação de alterações de permeabilidade no sarcolema. No 36º dia de vida pós-natal, os animais foram sacrificados com anestesia intraperitoneal de cloridrato de cetamina (130 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (6,8 mg/Kg). Os músculos foram retirados e mantidos em solução fisiológica durante todo o procedimento. Cada músculo STN foi envolvido em

um hemi-diafragma, para permitir seu posicionamento vertical no suporte de congelamento. Para o congelamento os músculos foram fixados em suportes de madeira com tragacanth gum, imersos em isopentano (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) à -100 °C por 45 s e imediatamente colocados em nitrogênio líquido à -159 °C. Os músculos foram seccionados transversalmente na espessura de 7 µm, à -25 °C, em criostato. Foram colocados quatro cortes por lâmina. Uma lâmina foi utilizada para coloração com hematoxilina-eosina (HE) e uma lâmina para análise do AE.

As lâminas para análise da integridade do sarcolema, por meio do AE, foram montadas em meio para fluorescência DABCO (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Para a contagem total dos núcleos centrais foi realizada coloração de HE. As lâminas foram imersas em solução de hematoxilina de Harris por 30 s, lavadas em água corrente por 10 min, imersas em solução de eosina por 15 s, sendo retirado o excesso de eosina em água corrente. As lâminas foram desidratadas em sequência de álcoois e xilol e montadas com entellan (Merck, Darmstadt, DE).

### **Quantificação da Degeneração e Regeneração**

A degeneração muscular foi analisada através da quantificação de fibras marcadas com AE e a regeneração através da quantificação de fibras com núcleo central, ambos expressos em porcentagem do número total de fibras. Para as lâminas coradas com HE e AE, dois cortes aleatórios de cada lâmina foram escolhidos para a quantificação do número total de fibras musculares, do número e da porcentagem de fibras com núcleo central e de fibras marcadas com AE.

### **Observação dos Músculos**

As lâminas com coloração de HE foram observadas ao microscópio de luz binocular (Carl Zeiss), acoplado a uma objetiva com retículo quadriculado. A observação das lâminas coradas com AE foi feita em microscópio de fluorescência (Nikon Express Series).

### **Imunofluorescência**

Para análise da distribuição do TRPC1 na fibra muscular foi utilizada a técnica de imunofluorescência. Os animais foram sacrificados e os músculos retirados e congelados como descrito previamente. Os músculos foram seccionados transversalmente na espessura de 7  $\mu\text{m}$ , à  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em criostato. As secções foram processadas para imunomarcção de TRPC1 segundo metodologia descrita por Ferretti e colaboradores (2009). Após lavagem com tampão fosfato (PBS: 0,15 M NaCl, 10 mM tampão fosfato, ph 7.4) por 10 minutos, as secções foram incubadas com Triton 0,3%, durante 10 min e incubadas com anticorpo anti-TRPC1 (1:300; policlonal anti-rabbit, Abcam, Cambridge, MA, USA) *overnight*. As secções foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário goat anti-rabbit conjugado a Cy3 (1:250; Jackson ImmunoResearch Laboratories) por 1 hora. Após lavagens, as lâminas foram montadas com lamínula em meio de montagem para fluorescência DABCO (1,4-diazabicyclo octano; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) e observadas em microscópio óptico de fluorescência Nikon acoplado a video câmera Hamamatsu. Sabendo-se que antibióticos aminoglicosídicos podem levar a expressão de distrofina (Barton-Davies et al., 1999), realizamos adicionalmente a imunomarcção da distrofina (1:50; NCL-DYS1; Novocastra).

#### 4.6 Determinação de Cálcio Total nos Músculos

Para observar os efeitos da estreptomicina na quantidade de cálcio total das fibras musculares realizamos a dosagem deste íon através de espectrometria de plasma. Foram utilizados cinco animais de cada grupo: sed/sal, exerc/estrep, sed/estrep e exerc/estrep.

Os músculos STN, BB, TA e DIA foram retirados como descrito previamente e pesados em balança analítica. Para o preparo das amostras, utilizamos a técnica descrita por Yoshida e colaboradores (2006). Os músculos foram colocados em balão volumétrico de 10 a 25 ml, dependendo da massa do músculo, contendo 2% de seu volume de ácido nítrico p.a. a 100 °C até a digestão total dos músculos. O balão volumétrico foi completado com água ultrapura e a amostra filtrada com algodão em um funil. A análise da amostra foi realizada no espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (*inductively coupled plasma optical emission spectrometry*, ICP\_OES; Optimum 3000 Duo View. Pekin-Elmer, Boston, MA, USA) localizado no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas. Esta técnica utiliza argônio de elevada pureza para geração do plasma à alta temperatura (aproximadamente 6727 °C) para produzir átomos excitados que emitem radiação eletromagnética em comprimentos de onda entre 125 a 950 nm, característicos de cada elemento químico. Após separação por sistemas ópticos das radiações emitidas, detectores medem a intensidade da emissão. Para correlacionar a intensidade da emissão à concentração do elemento na amostra utilizamos uma curva de calibração de cálcio. Utilizamos como padrão uma solução de fosfato de cálcio nas concentrações de 0,495 a 8,250 ppm.

#### 4.7 Quantificação de Proteínas por Western Blot

A técnica de western blot foi realizada para verificar se o tratamento com estreptomicina altera proteínas presentes no SAC (TRPC1), proteínas do CDG (b-DG,  $\beta$ -sarcoglicana (b-SG) e  $\alpha$ -sintrofina (a-syn)) e proteínas reguladoras de cálcio (CSQ e CaM).

**Anticorpos primários:** TRPC1 (OSR00085W) e calsequestrina esquelética (VIID 12) - Affinity BioReagents; beta-distroglicana (NCL-b-DG) e beta-sarcoglicana (NCL-L-b-SARC) - Novocastra Laboratories; Calmodulina e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GADPH) – Santa Cruz Biotechnology.

**Anticorpos secundários:** Goat anti-mouse-IgG e Goat anti-rabbit-IgG; Peroxidase - Kirkegaard e Perry Laboratories.

#### Preparação de Extrato Total

Os músculos foram retirados como descrito previamente. Em seguida, foram cortados em pequenos pedaços e homogeneizados em tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,4 contendo Triton X-100 1%, pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e 0,1 mg/ml de aprotinina, a 4 °C com homogeneizador do tipo Polytron PTA 20S (PT 10/35; Brinkmann Instruments) operado em velocidade máxima por 30 s. Os extratos foram centrifugados a 12581 g, a 4°C por 20 min e o sobrenadante utilizado. A determinação de proteína foi realizada pelo método de Bradford (1976).

### **Análise das Proteínas por Western Blot**

As amostras do extrato protéico foram tratadas com tampão fosfato de sódio 1 M pH 7,0 contendo azul de bromofenol 0,1%, glicerol 50%, SDS 10% e ditioneitol 100 mM (Laemmli, 1970), aquecidas a 100 °C por 5 min em banho seco. Trinta microgramas de proteína foram aplicados em gel SDS-poliacrilamida em aparelho para eletroforese mini-Protean (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA). A eletrotransferência do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em 90 min a 120 V em aparelho de transferência. As membranas foram incubadas com solução basal (Tris 10 mM, contendo cloreto de sódio 150 mM e Tween-20 0,02%) e 5% de leite desnatado por 1 h, para reduzir as ligações inespecíficas de proteínas e foram incubadas com anticorpo primário (1:1000) diluído em solução basal contendo 3% de leite desnatado, em temperatura ambiente, *overnight*, em agitador mecânico. As membranas foram lavadas por 30 min com solução basal, incubadas com anticorpo secundário (1:2500) diluído em solução basal contendo 3% de leite desnatado por 90 min, em temperatura ambiente e novamente lavadas por 30 min com solução basal.

Para detectar as bandas imunorreativas, as membranas foram expostas à solução de quimiluminescência (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA) por 5 min e a captura de fluorescência foi realizada utilizando-se o aparelho G-Box Chemi e o software de aquisição de imagem GeneSnap (Syngene, Cambridge, UK). As densidades das bandas foram quantificadas pelo software de análise GeneTools (Syngene, Cambridge, UK). Após obtenção de bandas da proteína de interesse, as membranas foram lavadas com solução basal e incubadas com 10 ml de *Stripping Buffer* (10 mM Tris-HCl pH 7,5;  $\beta$ -Mercaptoethanol 0,1 M; Uréia 8 M) durante 1 h, à 60 °C. Para neutralizar o *stripping buffer*

foi realizada incubação em Tris-HCl 1 M pH 7,5 por 30 min. As membranas foram lavadas com solução basal e processadas conforme descrito previamente para marcação da proteína gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Esta é uma proteína de controle interno, pois a quantidade desta proteína não se altera em diferentes condições fisiológicas. As bandas marcadas com GAPDH foram utilizadas para normalização das bandas das demais proteínas.

#### **4.8 Análise Estatística**

A análise estatística dos dados iniciais e finais de massa e força de tração foi realizada utilizando-se test-t de *Student* com significância  $p \leq 0,05$ . A comparação entre grupos para massa, creatina quinase, força de tração, dados histológicos, concentração de cálcio total e western blot foi realizada por análise de variância (ANOVA;  $p \leq 0,05$ ).

## **RESULTADOS**

---

### **1. Estudo Proteômico**

Os resultados do estudo proteômico dos músculos protegidos e afetados pela degeneração muscular dos camundongos *mdx* e controle (C57BL/10) estão apresentados a partir das comparações entre os seguintes grupos:

- **EO *mdx* x EO ct** (EO *mdx* x ct) para identificação das proteínas com quantidades alteradas devido a falta da distrofina, possivelmente envolvidas na proteção a mionecrose do músculo EO;
- **DIA *mdx* x DIA ct** (DIA *mdx* x ct) para identificação de proteínas envolvidas na degeneração/regeneração muscular do músculo DIA;
- **DIA ct x EO ct** (ct DIA x EO) para identificação de proteínas relacionadas a diferenças constitutivas dos músculos DIA e EO;
- **DIA *mdx* x EO *mdx*** (*mdx* DIA x EO) para identificação das proteínas relacionadas às diferenças constitutivas, a degeneração/regeneração muscular e a proteção a mionecrose;

As proteínas encontradas em comum nas comparações **ct DIA x EO** e ***mdx* DIA x EO** indicam diferenças constitutivas entre os músculos DIA e EO, independente da ausência ou presença de distrofina. Entre as comparações **DIA *mdx* x ct** e ***mdx* DIA x EO**, as proteínas em comum estão diretamente envolvidas na degeneração/regeneração muscular do músculo DIA da linhagem *mdx*. Enquanto as proteínas observadas na comparação **DIA x EO *mdx***, que não são encontradas nas comparações **DIA *mdx* x ct** (envolvidas na mionecrose/regeneração) e **DIA x EO ct** (relacionadas a diferenças constitutivas),

participam de mecanismos fisiológicos que podem explicar a não degeneração dos músculos EO nos animais *mdx*.

### 1.1 Identificação das Proteínas

Foram identificadas 857 proteínas, das quais 415 foram detectadas em ambos os músculos (extraocular e diafragma), condições (controle e *mdx*) e nas 3 repetições biológicas. Das 415 proteínas identificadas, 10 a 15% apresentaram maior ou menor quantidade quando comparados os diferentes músculos nas diferentes condições (Tabela 2).

**Tabela 2:** Número de proteínas encontradas em maior ou menor quantidade quando comparados os músculos extraoculares (EO) e diafragma (DIA), nos diferentes grupos (*mdx* e controle (ct)).

<b>Grupos comparados</b>	<b>Número de proteínas com quantidades diferentes</b>
EO <i>mdx</i> X EO ct	0
DIA <i>mdx</i> X DIA ct	42
DIA ct X EO ct	54
Dia <i>mdx</i> X EO <i>mdx</i>	62

A maioria das proteínas com quantidade diferente entre as grupos está presente no sarcoplasma e no citoesqueleto. A mitocôndria é a organela que apresenta maior porcentagem de proteínas com diferente expressão, seguida do núcleo e do retículo sarcoplasmático. A localização das proteínas encontradas nas diferentes comparações está apresentada na Tabela 3.

**Tabela 3:** Distribuição das proteínas com maior ou menor quantidade quando comparados os músculos DIA *mdx/ct*, *ct DIA/EO* e *mdx DIA/EO* de acordo com sua localização celular,. Dados em porcentagem (%).

	<b>DIA <i>mdx/ct</i></b>	<b>ct DIA/EO</b>	<b><i>mdx</i> DIA/EO</b>
<b>Sarcoplasma</b>	20,9 %	19,4 %	30,0 %
<b>Citoesqueleto</b>	30,2 %	21,0 %	14,3 %
<b>Matriz extracelular</b>	7,0 %	3,2 %	10,0 %
<b>Mitocôndria</b>	18,6 %	29,0 %	17,1 %
<b>Núcleo</b>	14,0 %	9,7 %	4,3 %
<b>Sarcolema</b>	2,3 %	8,1 %	15,7 %
<b>Retículo sarcoplasmático</b>	4,7 %	6,5 %	8,6 %
<b>Peroxisomo</b>	2,3 %	3,2 %	0,0 %

## 1.2 Comparação entre os Grupos

### - EO *mdx* e EO controle

Não observamos proteínas com maior ou menor quantificação na comparação dos músculos EO controle e *mdx*. Estudos proteômicos anteriores sugerem que somente um número limitado de sistemas celulares são alterados nos músculos extraoculares de *mdx* (Lewis e Ohlendieck, 2010).

### - DIA *mdx* e DIA controle

Nesta comparação, 43 proteínas apresentaram quantidade reduzida ou aumentada, sendo 20 proteínas presentes em maior quantidade no diafragma controle e 23 proteínas em maior quantidade no *mdx* (Tabela 4 e Anexo 1a). As proteínas foram analisadas pelo programa *PANTHER* (*Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships*) e classificadas de acordo com o processo biológico em que participam (Tabela 4). A lista completa das proteínas está apresentada no anexo 1a.

**Tabela 4:** Proteínas em menor (valores negativos em vermelho) e maior quantidade (valores positivos em azul) no músculo diafragma *mdx* quando comparado ao diafragma controle. As proteínas foram separadas de acordo com o processo biológico que participam.

	<b>Código de acesso</b>	<b>Nome</b>	<b>Quantidade relativa</b>
<b>Sistema Imune</b>	P19157	Glutathiona S-transferase P 1	-1,33
	Q9CQN1	Heat shock protein 75 kDa	1,26
	P17742	Peptidil-prolil cis-trans isomerase A	1,71
	P16045	Galectina-1	2,02
	Q61171	Peroxiredoxina-2	2,03
<b>Sinalização de Cálcio</b>	Q5SX39	Miosina-4	-1,49
	P68134	Alfa-Actina, alfa	-1,30
	P09542	Miosina de cadeia leve 3	-1,30
	O09165	Calsequestrina-1	-1,29
	P20801	Troponina C	-1,27
	Q8VDD5	Miosin-9	1,33
	Q8CI43	Miosina de cadeia leve 6B	1,75
<b>Disfunção Mitochondrial</b>	Q8BW75	Amina oxidase B	-1,42
<b>Resposta a toxina e estresse</b>	P19157	Glutathiona S-transferase P 1	-1,33
	P10649	Glutathiona S-transferase Mu 1	-1,32
	Q9CQN1	Heat shock protein 75 kDa	1,26
	P20029	Proteína regulada por glucose 78 kDa	1,28
	Q61171	Peroxiredoxina-2	2,03
<b>Apoptose</b>	Q8BW75	Amina oxidase B	-1,42
	P19157	Glutathiona S-transferase P 1	-1,33
	Q924D0	Proteína de interação com reticulon-4	-1,30
	P20029	Proteína regulada por glucose 78 kDa	1,28
	P16045	Galectina-1	2,02
<b>Homeostase de Cálcio</b>	P48036	Anexina A5	1,65
	P10107	Anexina A1	2,19

#### - DIA controle e EO controle

Dezenove proteínas (35%) apresentaram-se em maior quantidade no EO ct e 35 (65%) em maior quantidade no DIA ct. As proteínas foram classificadas de acordo com os processos biológicos que participam (Tabela 5 e Anexo 1b). A lista completa das proteínas e dos processos biológicos está apresentada no anexo 1b.

**Tabela 5:** Proteínas em menor (valores negativos em vermelho) e maior quantidade (valores positivos em azul) no músculo diafragma controle quando comparado ao extraocular controle. As proteínas foram separadas de acordo com o processo biológico que participam.

	<b>Código de acesso</b>	<b>Nome</b>	<b>Quantidade relativa</b>
<b>Sistema Imune</b>	P10649	Glutathiona S-transferase Mu 1	1,32
	Q99LX0	Proteína DJ-1	1,35
	P15626	Glutathiona S-transferase Mu 2	1,35
	P19157	Glutathiona S-transferase P 1	1,78
	Q810W6	Receptor de quimiocina C-X-C tipo 1	3,78
<b>Sinalização de Integrina</b>	P08121	Colágeno cadeia alfa-1(III)	-4,12
	Q01149	Colágeno cadeia alfa-2 (I)	-2,28
<b>Sinalização de Cálcio</b>	Q5SX39	Miosin-4	-1,87
	Q8R429	SERCA 1	-1,76
	O09165	Calsequestrina-1	-1,33
	O88346	Troponina T, fibra lenta	1,25
	Q5SX40	Miosina-1	2,15
	P51667	Miosina regulatória de cadeia leve 2 isoforma cardíaca	2,67
	O55143	SERCA 2	2,73
	P09542	Miosina de cadeia leve 3	3,28
<b>Disfunção Mitocondrial</b>	Q8BW75	Amina oxidase B	1,66
	Q924X2	Carnitina O-palmitoyltransferase 1	1,40
<b>Resposta a toxina e estresse</b>	P10649	Glutathiona S-transferase Mu 1	1,32
	Q99LX0	Proteína DJ-1	1,35
	P15626	Glutathiona S-transferase Mu 2	1,35
	P19157	Glutathiona S-transferase P 1	1,78
<b>Apoptose</b>	Q60932	Proteína 1 de canal voltagem dependente seletivo a ânion	1,37
	Q8BW75	Amina oxidase B	1,66
	P19157	Glutathione S-transferase P 1	1,78
<b>Homeostase de Cálcio</b>	Q8R429	SERCA 1	-1,76
	Q6PIE5	ATPase transportador de Sódio/potássio - subunidade alfa-2	-1,63
	P05202	Aspartato aminotransferase	-1,51
	P10107	Anexina A1	-1,39
	O55143	SERCA 2	2,73

#### - DIA *mdx* e EO *mdx*

Nesta comparação, 32 proteínas (52%) apresentaram-se em maior quantidade no EO *mdx* e 30 (48%) em maior quantidade no DIA *mdx*. As proteínas foram classificadas de

acordo com os processos biológicos que participam (Tabela 6 e Anexo 1b). A lista completa das proteínas e dos processos biológicos está apresentada no anexo 1c.

**Tabela 6:** Proteínas em menor (valores negativos em vermelho) e maior quantidade (valores positivos em azul) no músculo diafragma *mdx* quando comparado ao extraocular *mdx*. As proteínas foram separadas de acordo com o processo biológico que participam.

	<b>Código de acesso</b>	<b>Nome</b>	<b>Quantidade relativa</b>
<b>Sistema Imune</b>	P16045	Galectina-1	1,63
	Q810W6	Receptor de quimiocina C-X-C tipo 1	3,27
<b>Sinalização de Integrina</b>	P08121	Colágeno cadeia alfa-1(III)	-3,64
	Q01149	Colágeno alfa-2(I)	-2,00
	P11087	Colágeno cadeia alfa-1(I)	-1,88
	Q62009	Periostina	1,33
<b>Sinalização de cálcio</b>	Q5SX39	Miosina-4	-3,46
	Q8R429	SERCA 1	-2,03
	O09165	Calsequestrina-1	-1,78
	Q8CI43	Miosina de cadeia leve 6B	-1,37
	Q8VDD5	Miosina-9	1,36
	O09161	Calsequestrina-2	1,45
	Q5SX40	Miosina-1	1,46
	P51667	Miosina regulatória de cadeia leve 2, isoforma cardíaca	2,07
	P09542	Miosina de cadeia leve 3	2,25
	O55143	SERCA 2	3,90
<b>Resposta a toxina e ao estresse</b>	Q5EBG6	<i>Heat shock protein beta-6</i>	-1,46
	P46412	Glutaciona peroxidase 3	-1,44
	P11499	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	1,25
	P14602	<i>Heat shock protein beta-1</i>	1,35
	Q9D8N0	Fator de alongação 1-gama	1,56
<b>Apoptose</b>	Q9CRB8	Proteína de fissão mitocondrial 1	-1,29
	Q924D0	Proteína de interação com reticulon-4	-1,25
	Q60932	Proteína 1 de canal voltagem dependente seletivo a ânion	1,29
	P16045	Galectina-1	1,63
<b>Homeostase de Cálcio</b>	Q8R429	SERCA 1	-2,03
	P10107	Anexina A1	1,51
	O55143	SERCA 2	3,90

### 1.3 Diferenças Constitutivas entre os Músculos Diafragma e Extraocular

Foram observadas 21 proteínas comuns entre as comparações ct DIA x EO e *mdx* DIA x EO, que possivelmente estão relacionadas a diferenças embriológicas, morfológicas e funcionais dos diferentes músculos. Apenas a anexina A1 apresentou quantificação diferente quando comparamos os dois músculos: no DIA controle a anexina A1 está 38,9% diminuída e no DIA *mdx* está 51% aumentada. Dentre as 20 proteínas comuns entre as comparações, 11 proteínas estão diminuídas no músculo DIA em comparação ao EO: colágeno alfa-1 e alfa-2; miosina 3, 4 e 11; SERCA 1; calsequestrina 1; sarcalumenina; aspartato aminotransferase; tropomiosina alfa-3; e proteína carregadora de 2-oxoglutarato/malato mitocondrial. Enquanto 10 proteínas estão aumentadas no DIA em relação ao EO: proteína 1 de canal voltagem dependente seletivo a ânion; miosinas 1, reguladora de cadeia leve 2 e de cadeia leve 3; proteína não caracterizada homóloga a C1orf93; Isocitrato desidrogenase (NADP) mitocôndrial; L-lactato desidrogenase B; receptor de quimiocina C-X-C tipo1; e SERCA 2.

### 1.4 Proteínas Relacionadas a Degeneração/Regeneração Muscular e/ou a Proteção a Mionecrose

Excluindo-se as 21 proteínas comuns, 41 proteínas com quantidades menores (21 proteínas) ou maiores (20 proteínas) são encontradas exclusivamente na comparação *mdx* DIA x EO. Estas proteínas podem estar relacionadas aos processos de degeneração/regeneração muscular e/ou proteção a mionecrose. Ao realizarmos a análise dos processos biológicos, observamos que a maioria das proteínas (37,2%) está relacionada aos processos metabólicos de proteínas, carboidratos e lipídios. Os processos do sistema

imune apresentam um aumento na porcentagem de 6,3 para 9,3%, sendo 3 proteínas (HSP beta-6, glutationa peroxidase 3 e ceruloplasmina) encontradas em menor e 5 (HSP 90-beta, HSP beta-1, peptidil-prolil cis-trans isomerase, fator de alongação 1-gama e galectina-1) em maior quantidade no DIA *mdx*.

Para selecionarmos proteínas envolvidas diretamente na degeneração do músculo distrófico comparamos os resultados da análise DIA *mdx* x ct à análise *mdx* DIA x EO. Dezenove proteínas foram comuns às duas análises, sendo 6 (miosina 4; calsequestrina 1; sintase de ATP-citrato; glicerol-3-fosfato desidrogenase; frutose bifosfato aldolase A; *reticulon-4-interactong protein 1*) em maior quantidade nos músculos DIA ct e EO *mdx*, que não apresentam degeneração muscular, e 11 (*protein disulfide isomerase*; proteína ribossomal 40S S19; peptidil-prolil cis-trans isomerase; proteína ribossomal 60S L7, L29 e L34; proteína ribossomal ácida 60S P1; anexina A1; serpina H1; galectina-1; e ADP/ATP translocase 2) em maior quantidade no músculo DIA *mdx*, que apresenta degeneração/regeneração muscular. Duas miosinas de cadeia leve apresentam diferença entre as duas análises. A miosina de cadeia leve 6B está diminuída no DIA *mdx* quando comparado ao EO *mdx* e aumentada quando comparado ao DIA ct. Enquanto a miosina de cadeia leve 3 está aumentada no DIA *mdx* em comparação ao EO *mdx* e diminuída em comparação ao DIA ct.

## 2. Terapia farmacológica

### 2.1 Massa Corpórea, Creatina Quinase (CK) e Força de Tração

O exercício em esteira e o tratamento com estreptomicina não alteraram a massa final dos animais (Tabela 7). Quando comparados os períodos inicial e final do tratamento, todos os grupos apresentaram aumento de massa corpórea (2,4 a 2,7 vezes).

**Tabela 7:** Média  $\pm$  desvio padrão da massa corpórea (g) no início e no final do tratamento (n=15). O exercício em esteira e o tratamento com estreptomicina não alteraram a massa final dos animais ( $p > 0,005$ , Teste t de *student*). Houve aumento significativo das massas inicial e final em todos os grupos ( $p \leq 0,05$ , Teste t de *student*).

	Inicial	final
<i>mdx sed/sal</i>	7,2 $\pm$ 0,8	18,1* $\pm$ 1,7
<i>mdx exer/sal</i>	7,3 $\pm$ 0,2	20,0* $\pm$ 1,3
<i>mdx sed/strep</i>	7,4 $\pm$ 1,3	17,4* $\pm$ 3,4
<i>mdx exer/strep</i>	7,5 $\pm$ 1,2	17,9* $\pm$ 1,7

Os valores de CK do grupo exer-sal foi 5% maior quando comparado ao grupo *mdx sed/sal* ( $p = 0,01^*$ ; ANOVA). Houve diminuição significativa nos valores de CK de 17,3% no grupos *mdx sed/strep* e de 38,7% no grupo exer-strep quando comparados aos grupos *sed/sal* ( $p = 0,001^*$ ; ANOVA) e *exer/sal* ( $p = 0,02^*$ ; ANOVA), respectivamente (Tabela 8). O grupo *mdx sed/sal*, quando comparado ao C57BL/10, apresentou um aumento de 20,6 vezes nos valores de CK.

**Tabela 8:** Quantificação de CK (U/L) em camundongos *mdx* de 36 dias (n=5), com injeção i.p. de solução fisiológica (*sed/sal* e *exerc/sal*) e de estreptomicina (*sed/strep* e *exerc/strep*), submetidos ou não ao exercício. Média  $\pm$  desvio padrão. Diferença significativa ( $p \leq 0,05$ , ANOVA) entre os grupos C57BL/10 e *mdx sed/sal*(a), entre os grupos *mdx sed/sal* e *mdx exerc/sal* (b), entre os grupos *mdx sed/sal* e *mdx sed/strep* (c), e entre os grupos *mdx exerc/sal* e *mdx exerc/strep* (d).

CK (U/L)	média $\pm$ desvio padrão
C57BL/10	85,3 $\pm$ 65,4
<i>mdx sed/sal</i>	1753,9 <sup>a</sup> $\pm$ 63,4
<i>mdx exer/sal</i>	1855,9 <sup>b</sup> $\pm$ 90,9
<i>mdx sed/strep</i>	1450,6 <sup>c</sup> $\pm$ 96,6
<i>mdx exer/strep</i>	1138,2 <sup>d</sup> $\pm$ 476,3

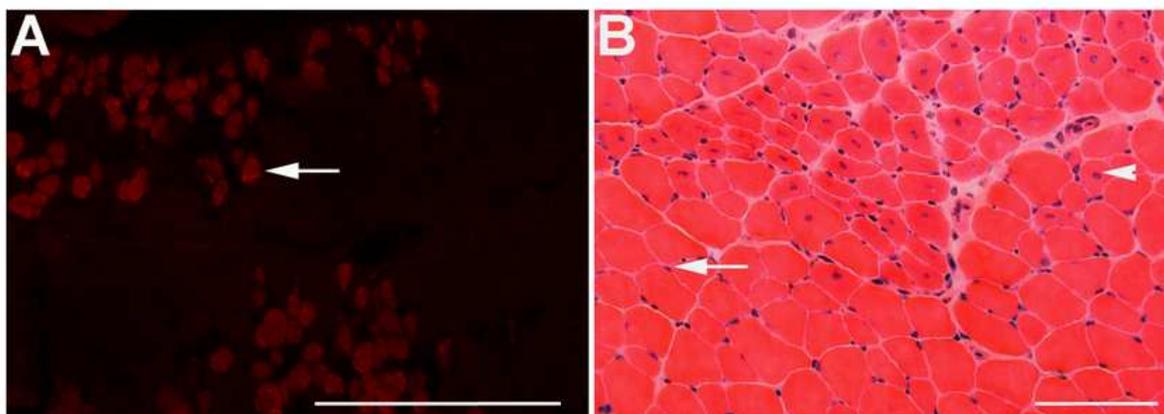
Todos os grupos apresentaram diminuição de 24% a 18% da força de tração (g/g de massa corpórea) das patas dianteiras quando comparadas as fases iniciais e finais do experimento. (Tabela 9). Não houve diferença na força de tração inicial e final, quando comparados os diferentes grupos.

**Tabela 9:** Média  $\pm$  desvio padrão da força de tração (g/g de massa corpórea) no início e no final do tratamento. Todos os grupos apresentaram diminuição significativa da força de tração quando comparados os períodos inicial e final do tratamento ( $p \leq 0,05$ ; Teste t de *student*,  $n=12$ ).

Força (g/g)	inicial	final
<i>mdx sed/sal</i>	2,46 $\pm$ 0,21	2,09* $\pm$ 0,21
<i>mdx exer/sal</i>	2,43 $\pm$ 0,35	1,96* $\pm$ 0,31
<i>mdx sed/strep</i>	2,35 $\pm$ 0,21	1,99* $\pm$ 0,41
<i>mdx exer/strep</i>	2,35 $\pm$ 0,31	1,95* $\pm$ 0,42

## 2.2 Índice de Degeneração e Regeneração

### Análise qualitativa



**Figura 5:** Secções transversais dos músculos diafragma (A) e bíceps braquial (B) de camundongos *mdx*. Em A, fibras com alteração na permeabilidade do sarcolema, positivas ao AE (seta) em microscopia de fluorescência. Em B, fibras musculares com núcleo periférico de formato poligonal (seta) e fibras musculares regeneradas com contorno arredondado e núcleo centralizado (cabeça de seta), coloração de hematoxilina-eosina. Escala: 100  $\mu$ m.

As fibras com alteração de permeabilidade ou em degeneração foram evidenciadas pela presença de azul de Evans no seu interior (Figura 5A). As fibras com núcleo periférico apresentaram formato poligonal em justaposição com outras fibras de mesma característica (Figura 5B, seta). Fibras regeneradas foram caracterizadas pelo núcleo centralizado, cromatina condensada, citoplasma eosinófilo e diâmetro próximo ao de uma fibra muscular esquelética com núcleo periférico (Figura 5B, cabeça de seta).

### **Análise Quantitativa**

Para análise quantitativa dos músculos esqueléticos foram utilizados os seguintes dados: porcentagem de fibras com núcleo central (%NC), porcentagem de fibras com núcleo periférico (%NP) e porcentagem de fibras positivas ao AE (%AE). Os resultados podem ser observados na Tabela 10.

Os animais tratados com estreptomicina apresentaram diminuição da mionecrose em todos os músculos estudados, exceto no TA *mdx sed/strep* comparado ao *mdx sed/sal*. No músculo diafragma houve redução de 47 e 35 da %NC e de 88 e 73 da %AE nos grupos *sed/estrep* e *exerc/estrep*, respectivamente, quando comparados ao grupo *sed/sal*.

O exercício em esteira aumentou a porcentagem das fibras com alteração na permeabilidade do sarcolema nos músculos STN e BB. Nestes músculos, a estreptomicina reduziu em 93 e 58% as fibras marcadas com AE, respectivamente ( $p \leq 0,05$ , ANOVA).

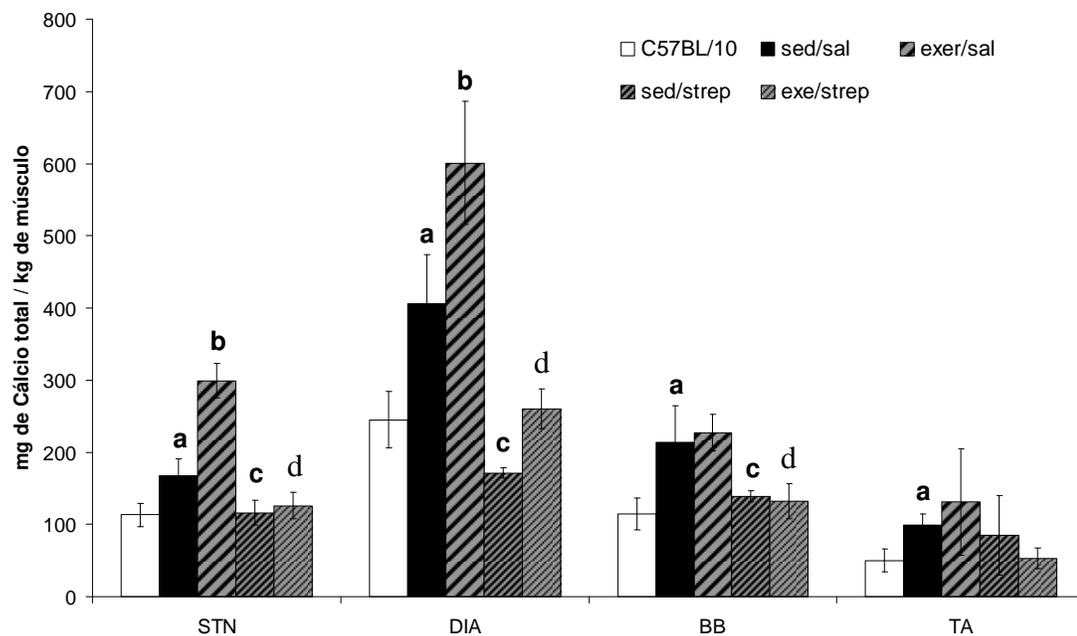
**Tabela 10:** Média  $\pm$  desvio padrão das porcentagens de fibras com núcleo central (%NC), núcleo periférico (%NP) e fibras marcadas pelo azul de Evans (%AE) dos músculos distróficos esternomastoideo (STN), diafragma (DIA), bíceps braquial (BB) e tibial anterior (TA) dos grupos sed/sal, exerc/sal, sed/estrep, exerc/estrep. Diferença significativa entre os grupos sed/sal e exerc/sal (a); sed/sal e sed/estrep (b); exerc/sal e exerc/estrep (c);  $p \leq 0,05$ , ANOVA,  $n=05$  animais/grupo, número total de fibras= 682 a 1637.

		%NC	%NP	%AE
STN	<i>mdx sed/sal</i>	50,7 $\pm$ 11,9	48,3 $\pm$ 11,2	1,0 $\pm$ 2,5
	<i>mdx exer/sal</i>	55,1 $\pm$ 6,4	37,3 <sup>a</sup> $\pm$ 7,4	7,6 <sup>a</sup> $\pm$ 4,5
	<i>mdx sed/strep</i>	41,2 <sup>b</sup> $\pm$ 6,8	55,0 <sup>b</sup> $\pm$ 9,3	1,6 $\pm$ 1,9
	<i>mdx exer/strep</i>	51,6 $\pm$ 8,6	47,5 <sup>c</sup> $\pm$ 8,0	0,5 <sup>c</sup> $\pm$ 0,8
DIA	<i>mdx sed/sal</i>	19,8 $\pm$ 6,7	75,3 $\pm$ 4,88	4,9 $\pm$ 1,1
	<i>mdx exer/sal</i>	18,7 $\pm$ 5,2	80,1 <sup>a</sup> $\pm$ 5,3	1,1 <sup>a</sup> $\pm$ 1,21
	<i>mdx sed/strep</i>	11,9 <sup>b</sup> $\pm$ 3,9	87,6 <sup>b</sup> $\pm$ 3,7	0,5 <sup>b</sup> $\pm$ 0,5
	<i>mdx exer/strep</i>	12,9 <sup>c</sup> $\pm$ 3,2	85,0 <sup>c</sup> $\pm$ 3,7	1,3 $\pm$ 1,3
BB	<i>mdx sed/sal</i>	24,6 $\pm$ 8,1	72,6 $\pm$ 9,3	2,8 $\pm$ 2,8
	<i>mdx exer/sal</i>	21,4 $\pm$ 3,7	73,7 $\pm$ 3,6	4,9 <sup>a</sup> $\pm$ 2,2
	<i>mdx sed/strep</i>	17,9 <sup>b</sup> $\pm$ 7,8	81,0 <sup>b</sup> $\pm$ 7,8	1,8 $\pm$ 1,5
	<i>mdx exer/strep</i>	23,3 $\pm$ 3,3	74,6 $\pm$ 3,7	2,1 <sup>c</sup> $\pm$ 1,1
TA	<i>mdx sed/sal</i>	43,7 $\pm$ 6,3	55,3 $\pm$ 6,9	1,0 $\pm$ 1,9
	<i>mdx exer/sal</i>	53,5 <sup>a</sup> $\pm$ 7,0	45,3 <sup>a</sup> $\pm$ 6,9	1,2 $\pm$ 0,9
	<i>mdx sed/strep</i>	42,9 $\pm$ 6,0	54,9 $\pm$ 7,1	1,0 $\pm$ 2,1
	<i>mdx exer/strep</i>	47,3 $\pm$ 8,0	51,9 <sup>c</sup> $\pm$ 8,0	0,8 $\pm$ 1,2

### 2.3 Determinação de cálcio total nos músculos

Na figura 6, pode-se observar os resultados da dosagem de cálcio total. Houve aumento de 49% a 98% de cálcio total no grupo sed/sal quando comparado ao C57BL/10 ( $p \leq 0,05$ , ANOVA) em todos os músculos (STN, DIA, TA e BB), confirmando os dados da literatura (Yoshida et al., 2006). O exercício em esteira aumentou em 78% e 48% a concentração de cálcio total nos músculos STN e DIA ( $p \leq 0,05$ , ANOVA), respectivamente. Nos músculos BB e TA não houve aumento significativo deste íon causado pelo exercício físico. Diminuição de 32% a 58% da concentração de cálcio total foi observado nos músculos STN, DIA e BB dos grupos sed/estrep quando comparados ao sed/sal. Nos

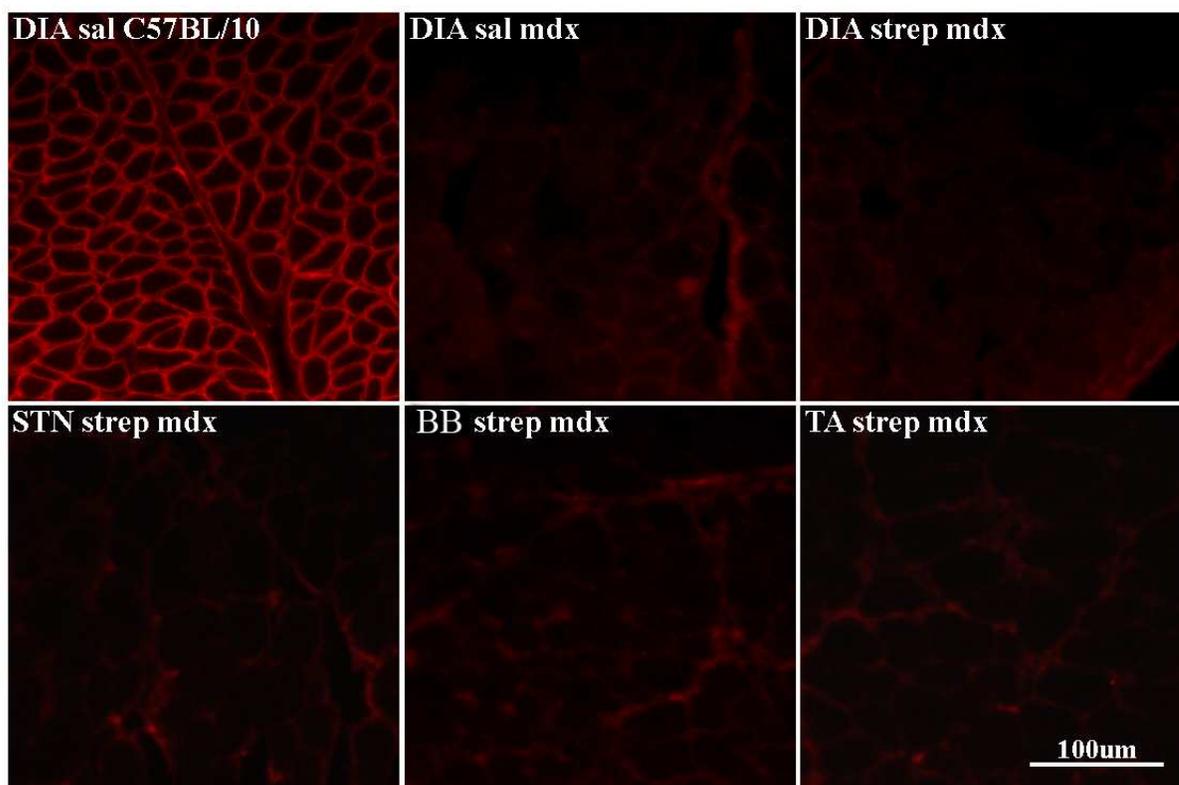
grupos exercitados, o tratamento com estreptomicina reduziu de 42% a 58% a concentração de cálcio nos músculos STN, TA e BB, quando comparados ao grupo exercitado e não-tratado (exerc/sal).



**Figura 6:** Média da quantificação de íons cálcio total nos músculos esternomastoideo (STN), diafragma (DIA), bíceps braquial (BB) e tibial anterior (TA) em animais dos grupos C57BL/10, *mdx* sed/sal, *mdx* exerc/sal, *mdx* sed/strep e *mdx* exerc/strep. Média  $\pm$  desvio padrão. Diferença significativa ( $p \leq 0,05$ , ANOVA) entre os grupos C57BL/10 e sed/sal (a), entre sed/sal e exer/sal (b), entre sed/sal e sed/estrepto (c) e entre exerc/sal e exerc/estrepto (d).

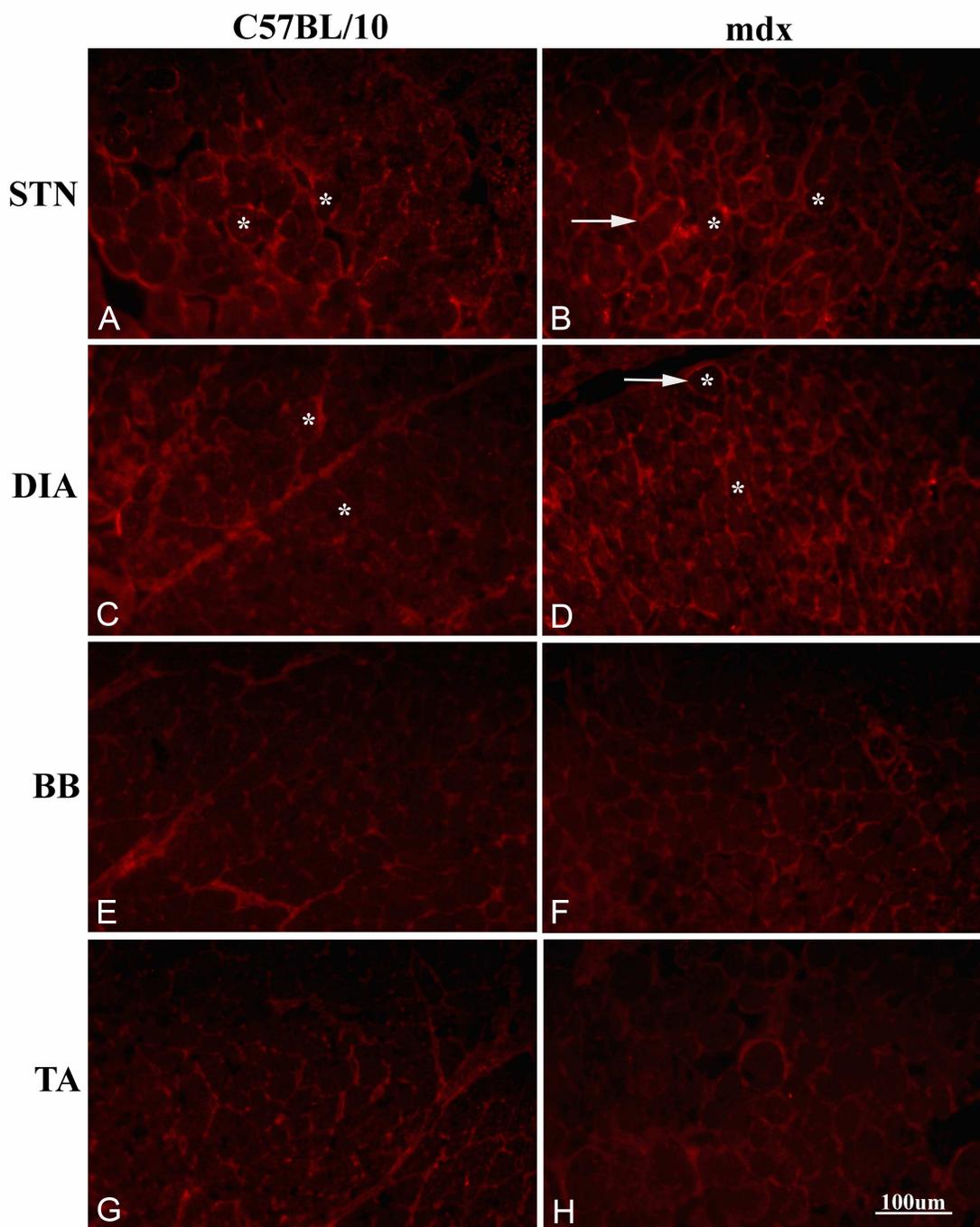
## 2.4 Imunofluorescência de Distrofina e TRPC1

Como demonstrado anteriormente (Yeung et al., 2005), não foi observada marcação da proteína distrofina em *mdx* tratados com estreptomicina. Este resultado confirma que não há recuperação da distrofina relacionada ao tratamento com estreptomicina (Figura 7).



**Figura 7:** Imunofluorescência de distrofina em seções dos músculos diafragma (DIA), esternomastoideo (STN), bíceps braquial (BB) e tibial anterior (TA) de animais C57BL/10 e *mdx* tratados com salina (*sal*) e estreptomicina (*strep*).

Para observarmos a localização do TRPC1 na fibra muscular realizamos a marcação de imunofluorescência para esta proteína nos grupos C57BL/10 e *mdx sed/sal*. O TRPC1 foi localizado no sarcolema formando um envoltório em cada fibra muscular. Um aparente aumento da fluorescência foi observado nos músculos STN e DIA do *mdx sed/sal* (Figura 8B e D) comparado com músculos distróficos da pata (Figura 8F e H).

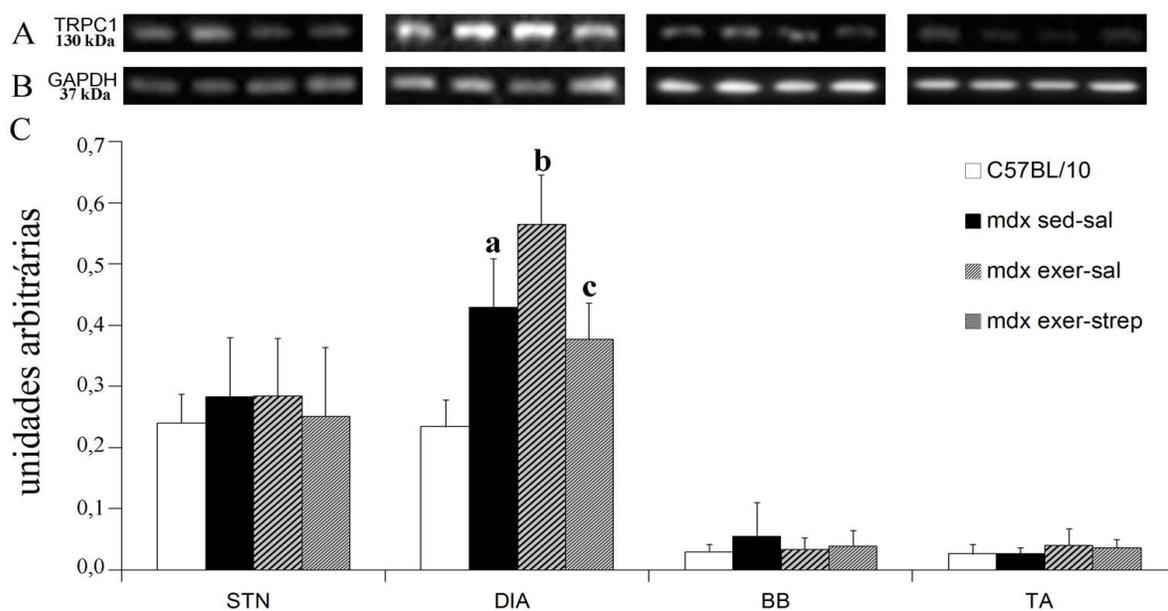


**Figura 8:** Imunofluorescência de TRPC1 em seções dos músculos esternomastoideo (STN), diafragma (DIA), bíceps braquial (BB) e tibial anterior (TA) de animais C57BL/10 (n=5) e *mdx* (n=5). O TRPC1 contorna todo o sarcolema (setas) das fibras musculares (asteriscos).

## 2.5 Quantificação de Proteínas por Western Blot

### Quantificação de TRPC1

Realizamos a quantificação de TRPC1 para avaliar se a regulação da expressão desta proteína do canal SAC está relacionada a quantidade de  $[Ca^{2+}]_i$  e para verificar se o exercício e o tratamento com estreptomicina alteram os níveis dessa proteína.



**Figura 9:** Quantificação por western blot de TRPC1 nos músculos STN, DIA, BB e TA dos grupos C57BL/10 e *mdx* tratado com salina (sal) ou estreptomicina (strep), exercitado (exer) ou sedentário (sed). A: bandas representativas da proteína TRPC1. B: bandas representativas do controle interno GAPDH. C: gráfico dos níveis de TRPC1 normalizados pelo GAPDH, expressos em unidade arbitrária. Desvio padrão representado em barras. (a) Diferença significativa quando comparado ao C57BL/10 ( $p \leq 0,05$ ). (b) Diferença significativa quando comparado ao *mdx* sed/sal ( $p \leq 0,05$ ). (c) Diferença significativa quando comparado ao *mdx* exer/sal ( $p \leq 0,05$ ). Valores de DIA e STN foram diferentes de BB e TA em todos os grupos (ANOVA).

A quantidade protéica de TRPC1 foi maior nos músculos axiais (STN e DIA) de C57BL/10 e *mdx* quando comparados com os músculos da pata (BB e TA; Figura 9). Não houve diferença na quantidade de TRPC1 nos músculos STN, BB e TA quando comparados os grupos *mdx* sed/sal e C57BL/10. Nos músculos STN, BB e TA, o exercício

e o tratamento com estreptomicina não alteraram a quantidade de TRPC1. Entretanto, no DIA a quantidade protéica de TRPC1 foi maior nos grupos *mdx* sed/sal e exer/sal quando comparados ao C57BL/10 e o tratamento com estreptomicina causou diminuição desta proteína no grupo *mdx* exer/strep quando comparado ao *mdx* exer/sal (Figura 9).

### **Proteínas do CDG e Relacionadas ao Cálcio**

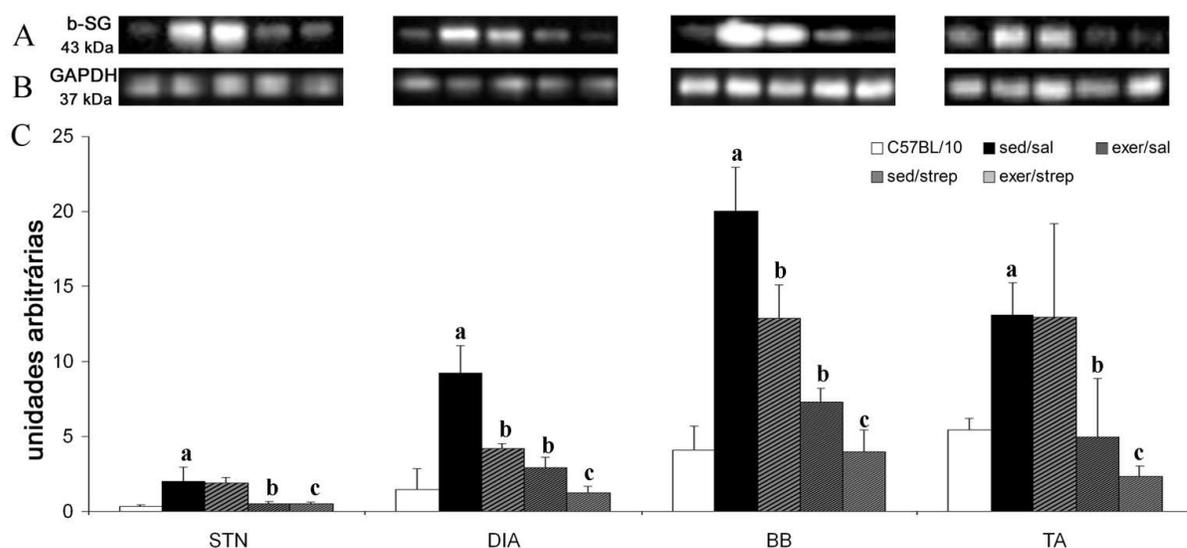
Para verificar se a estreptomicina apresenta efeitos de proteção secundários na fibra muscular realizamos a quantificação de proteínas do CDG (b-SG (Figura 10), b-DG e a-syn) e proteínas relacionadas ao cálcio (CSQ e CaM).

Maior concentração de  $\beta$ -SG foi observada em músculos nos camundongos *mdx* quando comparada ao C57BL/10 em todos os músculos estudados. O tratamento com estreptomicina no *mdx* reduziu a quantidade dessa proteína para níveis próximos aos dos animais controle não-distróficos (C57BL/10).

A concentração da b-DG apresentou-se 34% a 43% menor nos músculos STN (sed/sal  $0,50 \pm 0,32$  x C57BL/10  $1,47 \pm 0,47$ ), DIA (sed/sal  $1,00 \pm 0,11$  x C57BL/10  $2,96 \pm 0,99$ ), BB (sed/sal  $0,22 \pm 0,05$  x C57BL/10  $0,50 \pm 0,13$ ) e TA (sed/sal  $0,43 \pm 0,23$  x C57BL/10  $1,02 \pm 0,37$ ) dos animais *mdx* quando comparados ao C57BL/10. A concentração de a-syn dos grupos *mdx* e C57BL/10 foram similares. O tratamento com estreptomicina e o exercício em esteira não alteraram a quantidade destas proteínas nos músculos estudados.

Não houve diferença na concentração de CSQ entre os músculos C57BL/10 e *mdx*. O tratamento com estreptomicina aumentou a CSQ apenas no BB (sed/sal  $0,72 \pm 0,013$  x

sed/strep  $1,13 \pm 0,40$ ). Os músculos STN (sed/sal  $0,55 \pm 0,05$  x C57BL/10  $0,88 \pm 0,17$ ), DIA (sed/sal  $1,19 \pm 0,04$  x C57BL/10  $2,41 \pm 0,29$ ) e TA (sed/sal  $0,22 \pm 0,04$  x C57BL/10  $0,38 \pm 0,07$ ) apresentaram quantidade reduzida de CaM no *mdx* quando comparado ao C57BL/10. O tratamento com estreptomicina reduziu a concentração desta proteína apenas no músculo BB (sed/strep  $0,88 \pm 0,08$ ).



**Figura 10:** Quantificação por western blot de beta-sarcoglicana (b-SG) nos músculos esternomastoideo (STN), diafragma (DIA), bíceps braquial (BB) e tibial anterior (TA) dos grupos C57BL/10 e *mdx* tratado com salina (sal) ou estreptomicina (strep), exercitado (exer) ou sedentário (sed). A: bandas representativas da proteína b-SG. B: bandas representativas do controle interno GAPDH. C: gráfico dos níveis de TRPC1 normalizados pelo GAPDH, expressos em unidade arbitrária. Desvio padrão representado em barras. (a) Diferença significativa quando comparado ao C57BL/10 ( $p \leq 0,05$ ). (b) Diferença significativa quando comparado ao *mdx* sed/sal ( $p \leq 0,05$ ). (c) Diferença significativa quando comparado ao *mdx* exer/sal ( $p \leq 0,05$ ). Valores de DIA e STN foram diferentes de BB e TA em todos os grupos (ANOVA).

Parte dos resultados desta tese foi publicado no artigo: The stretch-activated calcium channel protein TRPC1 is correlated with the different degrees of the dystrophic phenotype in *mdx* mice. Matsumura, C.Y.; Taniguti, A.P.T.; Pertille, A. ; Santo Neto, H. ; Marques, M. J. American Journal of Physiology - Cell Physiology, 301:C1344-1350, 2011. Dois artigos estão em preparação, o primeiro referente a diferentes mecanismos de proteção pelo tratamento com estreptomicina: *Streptomycin treatment in mdx mice: potencial effects on different pathways of the dystrophic pathology*. O segundo referente a metodologia de shotgun com MudPIT com marcadores isobáricos para o estudo proteômico de músculos distróficos: *Isobaric tagging-based quantification for proteomic analysis of dystrophic muscle from mdx mice*.

## **DISCUSSÃO**

---

### **1. Estudo Proteômico**

Para aumentar o conhecimento das proteínas envolvidas nos fenômenos de degeneração/regeneração muscular e de proteção a mionecrose nos músculos distróficos realizamos o estudo proteômico por MudPIT dos músculos DIA e EO de camundongos controle C57BL/10 e *mdx*. A ausência da distrofina no camundongo *mdx* resulta em degeneração muscular na maioria dos músculos esqueléticos, entretanto, os músculos EO e intrínsecos da laringe também não expressam distrofina, mas não apresentam mionecrose (Khurana et al., 1995; Andrade et al., 2000; Marques et al., 2007).

O conhecimento do perfil proteômico da distrofia muscular de paciente com DMD e de camundongo *mdx* é fundamental para o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais eficazes, além de permitir a identificação de novos alvos terapêuticos e a avaliação de tratamentos para as distrofinopatias (Doran et al., 2007; Lewis et al., 2009; 2010).

#### **1.1 Proteínas Relacionadas a Proteção a Mionecrose**

Os EO são músculos crânio-faciais não afetados pela mionecrose em pacientes com DMD (Karpati e Carpenter, 1986; Kaminski et al., 1992). Embora possuam os mesmos constituintes do CDG (Andrade et al., 2000), apresentam características histológicas, bioquímicas e fisiológicas diferentes dos músculos esqueléticos afetados pela degeneração muscular (Fischer et al., 2005; Kjellgreen et al., 2003; Stirn et al., 2009). Além de não apresentarem sarcopenia e alterações fibróticas relacionadas a idade (McLoon e Wirtschafter, 2003; McMullen et al., 2009). Os EO também são não afetados pela

mionecrose em outras formas de distrofia muscular, incluindo distrofia muscular de Becker (Kaminiski et al., 1992), distrofia muscular congênita tipo 1A (deficiente de laminina  $\alpha 2$ /merosina; Porter e Karathanasis, 1998; Mendell et al., 1995) e distrofia muscular por deficiência de sarcoglicana (Porter et al., 2001). Entretanto, estes músculos são afetados em outras patologias, tais como: miastenia grave, síndromes miastênicas (Cleary et al., 2008), botulismo (Stahl et al., 1998) e miotonia congênita (Wakeman et al., 2008).

As diferenças constitutivas entre os EO e os músculos esqueléticos não craniais podem ser responsáveis pela proteção a mionecrose nos EO de camundongos *mdx* (Porter et al., 2003a). Nossos resultados corroboram esta hipótese, pois não observamos alteração nas quantidades de proteínas ao compararmos os músculos EO das linhagens *mdx* e ct (C57BL/10).

Além de proteínas do citoesqueleto (miosinas e tropomiosina) e da matriz extracelular (colágenos), proteínas relacionadas a homeostase de cálcio, ao sistema imune e a canais iônicos estão relacionadas a diferenças constitutivas que podem levar a proteção dos músculos extraoculares. A maior quantidade do canal iônico SERCA1 ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático - isoforma de contração rápida) e a menor quantidade de SERCA2 ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático - isoforma de contração lenta) no EO quando comparado ao DIA estão relacionadas ao tipo de fibra muscular e podem estar envolvidas na proteção a mionecrose. O aumento de SERCA1 nos músculos intrínsecos da laringe de camundongos *mdx* em comparação ao controle pode permitir melhor homeostase de cálcio e proteção a mionecrose (Ferretti et al., 2009). As proteínas ligantes a  $\text{Ca}^{2+}$ , sarcalumenina e CSQ 1, encontram-se aumentadas no EO em comparação com o DIA e também participam do melhor tamponamento de cálcio intracelular. A sarcalumenina está 70% diminuída em fibras

músculares de *mdx* quando comparadas a músculos esqueléticos de animais controle (Dowling et al., 2003). A diminuição de CSQ é observada no DIA de *mdx* quando comparado ao controle (Matsumura et al., 2009; Pertille et al., 2010) sugerindo manejo anormal de cálcio, com conseqüente degeneração muscular. Assim como a SERCA, a sarcalumenina e a CSQ estão localizadas no retículo sarcoplasmático confirmando estudos anteriores de que o tamponamento de  $Ca^{2+}$  por esta organela é fundamental para a proteção a mionecrose (Khurana et al., 1995; Pertille et al., 2010; Ferretti et al., 2009).

## **1.2 Proteínas Relacionadas a Degeneração/Regeneração Muscular**

Durante os ciclos de degeneração/regeneração muscular há aumento da síntese protéica (Lowe et al., 1995). Nossos resultados confirmam este fato, pois observamos maior número de proteínas com quantificação aumentada relacionadas ao metabolismo protéico no DIA *mdx*, como proteínas ribossomais e fator de alongação 1-gama. Entretanto, a produção de energia em camundongos *mdx* está reduzida em fibras musculares esqueléticas (Hoffman et al., 1987; Brooks et al., 1998). De acordo com estes estudos, observamos menor quantidade de proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos (glicólise, ciclo do ácido tricarboxílico, metabolismo de glicogênio) e alteração em proteínas envolvidas no metabolismo de produção de energia como diminuição de creatina quinase mitocôndrial e de sintase de ATP-citrato e aumento de L-lactato desidrogenase B e isocitrato desidrogenase no DIA *mdx* quando comparado ao DIA ct e ao EO *mdx*.

Proteínas que são produzidas em resposta ao estresse oxidativo (HSPs, peroxiredoxina-2, glutatona S-transferase) também estão alteradas no DIA *mdx* em comparação ao DIA ct e ao EO *mdx*. Peroxiredoxinas são enzimas antioxidantes que

controlam os níveis de peróxido induzido por citocinas, mediando transdução de sinal nas células (Rhee et al., 2005). A peroxiredoxina-2 está 2,2 vezes maior no DIA *mdx* quando comparado ao DIA ct. Além do aumento de enzimas antioxidantes, o elevação na quantidade de HSP90, HSP beta-1 e Serpina H1 (HSP47) também confirmam o aumento do estresse oxidativo associado a degeneração dos músculos distróficos. As HSPs tem função de chaperona nos músculos esqueléticos. A HSP47 também está relacionada à maior produção de colágeno e ao aumento da fibrose (Razzaquel e Taguti, 1999), a fibrose no músculo de pacientes com DMD e em alguns músculos do *mdx* ocorre em uma fase posterior a degeneração muscular.

Em contraposição a estudos anteriores que observaram maior quantificação (Ge et al., 2004) e expressão de mRNA (Porter et al., 2002) de proteínas relacionadas a inibição da atividade de endopeptidases de serina nos músculos de *mdx*, observamos diminuição na quantidade destas proteínas no DIA *mdx* em comparação ao EO *mdx* e DIA ct. Alfa-1-antitripsina 1-2, alfa-1-antitripsina 1-5, inibidor de protease de serina A3K e murinoglobulina-1 estão em menor quantidade no DIA *mdx*. A diminuição dessas proteínas sugerem aumento da atividade proteolítica no diafragma distrófico, pois elas regulam a atividade de proteases de serina em diversos processos fisiológicos, incluindo: inibição de atividade proteolítica (Businaro et al., 2001), regulador de crescimento celular, reorganização do citoesqueleto (Planus et al., 1997) e diferenciação miogênica (Moorhead et al., 1998).

A hipótese mais aceita atualmente para explicar a degeneração muscular nas fibras musculares distróficas é que o aumento da quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular livre no sarcoplasma, através de sua entrada por canais de  $\text{Ca}^{2+}$  ou microrupturas da membrana, leva

a degeneração muscular (Cullen e Jarros, 1988). Calsequestrina1, SERCA1, SERCA2, anexina A1 e anexina A5, que participam da homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, apresentam alteração na quantificação quando comparamos o músculo DIA *mdx* ao DIA ct e ao EO *mdx*. A diminuição das proteínas SERCA1 e CSQ confirmam dados de estudos anteriores de que o manejo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular é fundamental para a manutenção da fibra muscular (Ferretti et al., 2009; Pertille et al., 2010). As anexinas ligam-se a fosfolipídios de cargas negativas de maneira cálcio dependente e participam de vários processos fisiológicos como modificação da forma da célula, transporte e organização de vesículas, endocitose e exocitose (Gerke 2005). As anexinas também podem ser encontradas no meio extracelular participando da fibrinólise, coagulação, inflamação e apoptose (Gerke et al., 2002; van Genderen et al., 2008).

### **1.3 Possíveis marcadores moleculares da distrofia muscular**

O estudo do perfil proteômico dos músculos protegidos e afetados de camundongo *mdx* permitiu identificar proteínas relacionadas à proteção a mionecrose e à degeneração/regeneração muscular, que se detectadas também no sangue dos pacientes, podem ser utilizadas como marcadores para a DMD. Por ser a retirada de sangue um método menos invasivo de análise que a biópsia, permitiria o diagnóstico e o monitoramento da progressão de doenças através de marcadores moleculares (Rifai et al., 2006).

A enzima creatina quinase (CK) é o biomarcador sérico atualmente utilizado como primeiro sinal de diagnóstico para a DMD, visto que altos níveis de CK refletem lesão e/ou doença muscular. Entretanto, o teste de CK apresenta desvantagens, tais como: queda na

quantidade da enzima durante a progressão da doença, provavelmente devido à perda de tecido muscular (Emery et al., 2003), aumento de CK em indivíduos normais, devido ao exercício ou trauma na musculatura. Outros testes utilizados para diagnóstico e monitoramento da progressão da DMD também apresentam limitações. A biópsia muscular é um método invasivo, que retira uma pequena amostra do músculo para análises bioquímicas e histológicas. Com isso, fornece informações de uma pequena porção muscular que pode não representar o músculo como um todo. Avaliações de força muscular são menos invasivas, mas estão sujeitas à variabilidade intra- e inter-paciente (Mazzone et al., 2009). Portanto, não há um teste único utilizado para diagnóstico, prognóstico e acompanhamento da progressão da doença ou tratamento, o que seria possível com novos marcadores biológicos.

Vários tratamentos e ensaios clínicos estão em andamento para a DMD (Angelini 2007; Bushby et al., 2009; van Deutekom et al., 2007; Malik et al., 2010). A identificação de marcadores biológicos para avaliar os efeitos destes tratamentos seria fundamental, uma vez que pode não ocorrer melhora funcional durante os períodos de tratamento de curta duração, em estudos de fase pré-clínica; adicionalmente, o monitoramento através de biópsias musculares repetitivas não é viável para estudos mais longos.

Selecionamos 3 proteínas com potencial de biomarcadores, por apresentarem alteração na quantificação protéica possivelmente devido a degeneração/regeneração muscular: Galectina-1 (Gal-1), Anexina A1 e proteína 1 de interação com Reticulon-4.

A Galectina-1, produzida por mioblastos e outros tipos celulares (Goldring et al., 2002; Stowell et al., 2008), participa do desenvolvimento do músculo esquelético (Watt et al., 2004;. Kami e Senba, 2005) nas fases de mioblasto e antes da fusão de mioblastos em

células musculares multinucleadas (Nowak et al., 1976.; Barondes e Haywood-Reid, 1981; Cooper e Barondes, 1990; Harrison e Wilson, 1992; Poirier et al., 1992; Watt et al., 2004). *In vitro*, esta proteína induz a proliferação e fusão de mioblastos (Den e Malinzak, 1977; Gartner e Podleski, 1975; Watt et al., 2004) e inibe interações de mioblastos mediadas por integrina  $\alpha7\beta1$  com laminina (Cooper et al., 1991; Gu et al., 1994). Além de participar do desenvolvimento do músculo esquelético, participa da regeneração muscular e induz fibroblastos a produzir marcadores específicos de músculo, como a desmina (Goldring et al., 2002; Watt et al., 2004; Georgiadis et al., 2007). A Gal-1 também apresenta um efeito protetor sobre o músculo através da redução da inflamação (Rabinovich et al., 2000) e está em maior quantidade durante a degeneração muscular. A participação desta proteína em todos estes processos celulares sugere que esta proteína poderia ser utilizada como biomarcador para distrofia muscular.

Na comparação dos grupos *mdx* DIA x EO e ct DIA x EO, a anexina A1 foi a única proteína comum às duas comparações que apresentou quantificações diferentes entre as duas linhagens (no grupo controle 38,9% diminuída e no grupo *mdx* 51% aumentada no DIA). Esta variação no conteúdo da proteína deve estar relacionada ao processo de degeneração/regeneração muscular que ocorre na linhagem *mdx*. As anexinas são proteínas que se ligam ao  $Ca^{2+}$  e a fosfolipídios, sendo que o domínio n-terminal confere especificidade funcional a cada anexina. A anexina A1 associa-se a disferlina, mas esta associação é perdida por vias dependentes de cálcio após dano no sarcolema (Lennon et al., 2003). O bloqueio da atividade de anexina A1 inibe o reparo do sarcolema por *resealing in vitro*, demonstrando que a anexina A1 tem função de impedir a degeneração muscular

(McNeil et al., 2006; Waddell et al., 2011). A quantidade de anexinas A1 e A2 está aumentada em várias formas de distrofia muscular (Probst-Cousin et al., 2004).

A proteína de interação com reticulon-4 é uma proteína mitocondrial que interage com a proteína reticulon-4, que é um potente inibidor de regeneração neuronal após dano na medula espinhal. No sistema nervoso central, reticulon-4/Nogo-B bloqueia a regeneração axonal após dano. Na parede arterial, reticulon-4 inibe a redução da luz do vaso no camundongo, prevenindo o aumento e a desestabilização das placas arteroscleróticas (Rodriguez-Feo et al., 2007). A função dos diferentes tipos de reticulon não está bem definida, podendo apresentar interações com proteínas mitocondriais (Hu et al., 2002). Reticulon-4 reduz a atividade apoptótica de Bcl-2 e Bcl-X e, quando expressa em grandes quantidades, causa extensa apoptose (Li et al., 2001; Tagami et al., 2000). A proteína de interação com reticulon-4 apresenta quantidades reduzidas no DIA *mdx* comparado ao DIA *ct* e ao EO *mdx*. O estudo detalhado da função desta proteína no músculo distrófico, além do estudo de sua interação com proteínas mitocondriais e apoptóticas, poderia fornecer novas informações sobre o desequilíbrio energético e a degeneração muscular.

O próximo passo seria avaliar se estas proteínas encontram-se no soro de camundongos *mdx* e de pacientes DMD para observar se a quantificação também está alterada neste fluídos biológicos. Acreditamos que estes biomarcadores estarão elevados no soro do *mdx*, uma vez que os músculos estão em constante degeneração e liberam proteínas para a corrente sanguínea, assim como a enzima CK.

## 2. Terapia Farmacológica

A ausência da distrofina em fibras musculares de camundongos *mdx* e na DMD provoca degeneração muscular, que pode estar relacionada ao maior influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  resultante de disfunção de canais iônicos ou de microrupturas transitórias do sarcolema (para revisão ver Whitehead et al., 2004). No *mdx*, o início da degeneração muscular ocorre em torno dos 21 dias de vida (Lefaucheur et al., 1995; Porter et al., 2003b) e diferente da DMD em humanos apresentam ciclos de necrose e regeneração (Tanabe et al., 1986).

No presente estudo, iniciamos o tratamento com estreptomicina antes dos ciclos de degeneração e regeneração (18 dias de vida) e analisamos os resultados aos 36 dias de vida, o que nos permitiu melhor avaliar a ação da estreptomicina sobre a degeneração-regeneração muscular. Além disso, realizamos o treinamento dos camundongos em esteira, visto que este procedimento pode intensificar a degeneração muscular (De Luca et al., 2002; Granchelli et al., 2000), bem como aumentar a ativação de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  ativados por estiramento (Yeung et al., 2005), possibilitando melhor avaliação da eficácia de fármacos na proteção do músculo distrófico (Grounds et al., 2008; Spurney et al., 2009).

Embora o uso a longo prazo de antibióticos aminoglicosídeos *in vivo* não seja recomendado, pois podem apresentar efeitos tóxicos nos rins e nos sistemas auditivo e vestibular, a estreptomicina foi escolhida por ser amplamente utilizada para tratar infecções bacterianas e por atuar como bloqueador de SAC no tecido muscular, provavelmente pela oclusão do canal (Winegar et al., 1996; Suchyna et al., 2004).

## 2.1 Quantificação de Proteínas por Western Blot

### TRPC1

Em fibras musculares distróficas, o TRPC1 regula a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Franco-Obregon Jr e Lansman, 1994; Gervásio et al., 2008), pode ser ativado por estiramento da membrana (Maroto et al., 2005) e pode causar alteração na homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  (Vanderbrouck et al., 2002; 2007; Williams e Alen, 2007).

Apenas no músculo diafragma observamos aumento da concentração de TRPC1 quando comparamos o *mdx* sed/sal ao C57BL/10. Este aumento parece estar relacionado ao fenótipo mais afetado deste músculo: maior quantidade de fibras em degeneração (positivas ao AE) e maior concentração de cálcio total. O músculo TA que apresenta menor concentração de TRPC1 é o que apresenta o fenótipo menos afetado (menor concentração de cálcio total e pequena porcentagem de fibras em degeneração). Estes resultados sugerem que a quantidade de TRPC1 está relacionada, pelo menos em parte, às diferenças na evolução e na intensidade das lesões musculares dos diferentes músculos e podem ajudar a elucidar os mecanismos de lesão muscular na DMD.

Embora tenha sido observada uma concentração elevada de TRPC1 no DIA de camundongos *mdx*, nos demais músculos distróficos estudados (STN, BB e TA) a concentração de TRPC1 foi similar a concentração em músculos normais e o exercício físico não alterou esse perfil. Este resultado contrasta com estudos anteriores, que observaram aumento de TRPC1 no TA de *mdx* (Gervásio et al., 2008). Esta diferença pode ser explicada por diferenças na idade dos animais ou nos músculos estudados. Analisamos os músculos distróficos logo após o primeiro pico de degeneração, no período inicial da patologia (36 dias). Gervásio e colaboradores (2008) utilizaram camundongos *mdx* com 2

meses de idade. No músculo cardíaco, alterações nos níveis de TRPC1 foram observadas somente em camundongos *mdx* mais velhos (Williams e Alen, 2007), período em que há alteração morfológica e funcional do coração distrófico (Quilan et al., 2004; Spassova et al., 2006).

A concentração de cálcio foi elevada em todos os músculos distróficos independente da concentração de TRPC1, sugerindo que outros canais de  $Ca^{2+}$  (Bertorini et al., 1982; Fong et al., 1990; Matsumura et al., 2009) contribuem para a progressão da distrofia muscular durante este período. No DIA, o exercício levou ao aumento da concentração de cálcio total, elevação que não foi observada nos animais tratados com estreptomicina. O exercício em esteira aumenta a atividade mecânica ativando os canais SAC (Guharay e Sachs, 1984; Maroto et al., 2005) e conseqüentemente aumentando a concentração de cálcio total.

Nossos resultados sugerem que o aumento da expressão de TRPC1 pode explicar, pelo menos em parte, alterações na concentração de cálcio observadas no DIA de camundongos exercitados, resultados semelhantes a estudos em músculos cardíacos de *mdx* idosos (Ward et al., 2008). Considerando que SACs são ativados pelo exercício (Guharay e Sachs, 1984) e que o TRPC1 é integrante do SAC (Maroto et al., 2005), os níveis reduzidos de TRPC1 observados nos músculos da pata (BB e TA) em comparação com músculos axiais (STN e DIA) podem explicar a ausência de resposta dos músculos da pata ao exercício em esteira na idade estudada. Não obstante, a estreptomicina também protege os músculos da pata, como indicado pela redução na porcentagem de fibras com núcleo central e concomitante aumento de fibras com núcleos periféricos no TA, assim como o decréscimo da concentração de cálcio total no BB de animais exercitados.

### **Proteínas do Complexo Distrofina-Glicoproteínas**

Uma das consequências da ausência da distrofina é a alterações na expressão de proteínas do CDG (Dowling et al., 2003) e consequente instabilidade do sarcolema. O aumento de fibras marcadas com azul de Evans nos músculos de *mdx* e a diminuição de fibras marcadas com azul de Evans no STN e DIA dos grupos tratados com estreptomicina indicam alteração na integridade do sarcolema possivelmente devido ao alteração de proteínas do CDG. Para estudarmos os possíveis efeitos da estreptomicina nas proteínas do CDG foi realizada o wb para as proteínas  $\beta$ -dístroglicana,  $\beta$ -sarcoglicana e  $\alpha$ -sintrofina.

A b-SG é uma proteína do complexo de sarcoglicanas e componente do CDG, que confere estabilidade ao sarcolema. Em contraposição a estudos anteriores que mostram uma concentração reduzida ou similar desta proteína nos camundongos *mdx* quando comparados ao C57BL/10 (Ohlendieck e Campbell, 1991; Li et al., 2009; Ferretti et al., 2011), observamos maior concentração de b-SG no *mdx* em todos os músculos estudados. Esta diferença pode estar relacionada a idade dos animais estudados, que tinham 36 dias, logo após o primeiro pico de degeneração muscular. A maioria dos estudos utilizaram camundongos mais velhos, acima de 2 meses (Ohlendieck e Campbell, 1991; Li et al., 2009; Ferretti et al., 2011). O aumento da b-SG provavelmente colabora para a formação de um complexo de sarcoglicanas anormal e pode contribuir para a distrofia muscular. Níveis anormais de sarcoglicanas podem causar alteração na função mecânica e na sinalização celular, o que pode ser patogênico para o músculo (Zhu et al., 2001).

O tratamento com estreptomicina, bloqueador de SAC, no *mdx* reduziu a quantidade de b-SG próximo aos níveis de animais controle não-distróficos. Pela sua localização na

membrana, as sarcoglicanas podem ser um módulo de sinalização independente de outros componentes do CDG. Esta atividade de sinalização pode regular canais de  $\text{Ca}^{2+}$  ou realizar outras funções críticas para a sobrevivência da fibra muscular (Hack et al., 2000).

As distroglicanas são proteínas de membrana que ligam a matriz extracelular a proteínas do citoesqueleto associado a distrofina. Acredita-se que essa proteína é essencial para a integridade e sobrevivência da fibra muscular durante os ciclos de contração e relaxamento. A distroglicana, após sua transcrição, é quebrada em duas subunidades:  $\alpha$  e  $\beta$ -distroglicana (b-DG). A b-DG é uma proteína trans-sarcolemal e interage intracelularmente com a distrofina e com proteínas sinalizadoras, como Grb2 (Cohn, 2005; Barresi e Campbell, 2006).

A proteína trans-sarcolemal b-DG apresentou-se diminuída nos músculos STN, DIA, BB e TA dos animais *mdx*, conforme já descrito na literatura (Dowling et al., 2003; Matsumura et al., 2009). O tratamento com estreptomicina, bloqueador de SAC, não alterou a concentração desta proteína. Este resultado está de acordo com nossos resultados anteriores que mostraram que o tratamento com bloqueadores de canal de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo-L (diltiazem e verapamil) não aumentou a quantidade de b-DG no DIA, músculo em que observamos diminuição da degeneração muscular. (Matsumura et al., 2009). Sendo assim, a proteção a mionecrose pela estreptomicina não está relacionada a alterações de b-DG nos músculos estudados. Diferente dos músculos extraoculares, em que a concentração similar desta proteína em animais *mdx* e controle parece conferir proteção a mionecrose (Dowling et al., 2003).

As sintrofinas são proteínas de ancoragem que apresetam múltiplos domínios (Froehner et al., 1997; Albrecht e Froehner, 2002). Associam-se a distrofina e a outras

proteínas da família da distrofina, incluindo utrofina e distrobrevina (Yang et al., 1995; Peters et al., 1997). A sintrofina participa diretamente da regulação dos canais TRPC1, ou indiretamente, fornecendo arcabouço para um complexo de sinalização multiprotéico que modula a atividade deste canal (Maroto et al., 2005; Vandebrouck et al., 2007). A ausência da distrofina, assim como o bloqueio de SACs, não alteraram a concentração de a-syn nos músculos estudados, sugerindo que esta via de modulação não foi alterada. Diferente de estudos anteriores que observaram diminuição de a-syn nos *mdx* aos 2 meses de idade (Ozawa et al., 1995; Koo et al., 2011), não observamos diminuição desta proteína nos músculos estudados aos 36 dias. Esta diferença pode estar relacionada a idade dos animais estudados e a fase do processo de regeneração muscular que se encontram estes músculos. Na quarta semana de idade, observa-se aproximadamente 6% de fibras em processo de regeneração e 50% de fibras completamente regeneradas no TA. Na oitava semana, apenas 2% das fibras encontram-se em regeneração e 70% das fibras já apresentam-se completamente regeneradas no TA (Patoret e Seville, 1995). A a-syn desempenha papel importante na regeneração muscular, sendo que na ausência de a-syn o músculo regenerado apresenta diminuição da capacidade de exercício e de força contrátil, aumento da hipertrofia muscular e alteração na formação de junção neuromuscular (Hosaka et al., 2002).

### **Proteínas reguladoras de cálcio**

A CaM é uma proteína quinase cálcio dependente, que regula a interação de vários componentes do CDG. Essa enzima possui sítios de ligação para a distrofina e sintrofinas. As atividades reguladas pela CaM, como a interação distrofina-actina, são reduzidas no músculo deficiente de distrofina (Jarrett e Foster, 1995).

Os músculos STN, DIA e TA apresentaram quantidade reduzida de CaM no *mdx* quando comparado ao C57BL/10. Perville e colaboradores (2010) observaram diminuição na concentração de CaM no músculo DIA e aumento na concentração desta proteína nos músculos protegidos da degeneração muscular, os extraoculares. O tratamento com estreptomicina reduziu a concentração desta proteína apenas no BB, único músculo estudado que não apresentou alteração na histologia perante o tratamento. Estes resultados sugerem que a ação protetora da estreptomicina não está relacionada a via de sinalização  $Ca^{++}/CaM$  (Chakkalakal et al., 2006).

Nos camundongos *mdx*, além da elevada  $[Ca^{2+}]_i$ , a capacidade de tamponamento deste íon pelo retículo sarcoplasmático também está prejudicada (Culligan et al., 2002). A calsequestrina é a principal proteína de estocagem de  $Ca^{2+}$  no retículo sarcoplasmático de músculos esqueléticos. A ausência de distrofina e o tratamento com estreptomicina não alteraram a concentração de calsequestrina 1 nos músculos estudados, diferente dos músculos tratados com bloqueadores de canais do tipo-L, que levaram a um aumento da CSQ1 nos músculos STN, TA e DIA de animais tratados com verapamil e no músculo TA de animais tratados com diltiazem (Matsumura et al., 2009). Estes resultados indicam que bloqueadores de canais de  $Ca^{2+}$  não agem apenas impedindo a entrada de  $Ca^{2+}$  e diminuindo a concentração de  $Ca^{2+}$  no interior da célula. A proteção a mionecrose também pode estar relacionada a efeitos secundários destes bloqueadores (Islam et al., 2002; Rossi e Dirkesen, 2006; Matsumura et al., 2009; 2011). Observamos também resultados diferenciados, de acordo com o músculo estudado, possivelmente dependendo do mecanismo de ação do fármaco e o estágio de degeneração-regeneração que se encontra cada músculo. Estudos anteriores mostraram que os diferentes músculos distróficos

apresentam variação quanto à intensidade e período do pico de degeneração (Pastoret e Sebille, 1995; Marques et al., 2008).

O estudo dos efeitos primários e secundários da terapia farmacológica com estreptomicina em diferentes músculos e o estudo proteômico dos músculos extraocular e diafragma permitiram identificar proteínas de diferentes processos biológicos envolvidos na degeneração/regeneração muscular e na proteção a mionecrose, ampliando o conhecimento dos mecanismos envolvidos neste processo. Nossos resultados abrem novas perspectivas para o estudo desses diferentes mecanismos que possibilitarão o desenvolvimento de terapias genéticas e/ou farmacológicas para os músculos afetados de modelos experimentais, bem como, no futuro, para pacientes portadores da DMD.

## **CONCLUSÕES**

---

### **1. Estudo Proteômico**

Os músculos extraoculares não são afetados pela degeneração muscular possivelmente por apresentarem diferenças em sua constituição, permitindo a manutenção da homeostase de cálcio e melhor resposta ao estresse mecânico e oxidativo.

Galectina-1, anexina A1 e proteína 1 de interação com Reticulon-4 são possíveis biomarcadores para distrofia muscular, uma vez que participam de diferentes processos celulares.

### **2. Terapia farmacológica**

Os canais ativados por estiramento participam da degeneração muscular em camundongos *mdx*, principalmente quando o músculo está sob maior demanda funcional.

As proteínas do complexo distrofina-glicoproteína (beta-distroglicana e alfa-sintrofina) e as relacionadas ao tamponamento de cálcio (calsequestrina) e sinalização (calmodulina) não se alteram com o exercício físico e/ou o tratamento com estreptomicina.

Nossos resultados sugerem que as intervenções precoces para inibir o aumento da atividade/quantidade de TRPC1 podem ser uma opção terapêutica complementar para a DMD, especialmente para o músculo diafragma.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Albrecht, D.E., Froehner, S.C. Syntrophins and dystrobrevins: defining the dystrophin scaffold at synapses. **Neurosignals**. 11:123–129, 2002.
- Andrade, F.H., Porter, J.D., Kaminski, H.J. Eye muscle sparing by the muscular dystrophies: lessons to be learned? **Micros Res Tec**. 48:192-203, 2000.
- Angelini, C. The role of corticosteroids in muscular dystrophy: a critical appraisal. **Muscle Nerve** 36:424–35, 2007.
- Barondes, S.H., Haywood-Reid, P.L. Externalization of an endogenous chicken muscle lectin with in vivo development. **J Cell Biol**. 91:568–572, 1981
- Barresi, R., Campbell, K.P. Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. **J Cell Sci**. 119(2):199-207, 2006.
- Barton-Davis, E.R., Cordier, L., Shoturma, D.I., Leland, S.E., Sweeney, H.L. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. **J Clin Invest**. 104: 375–381, 1999.
- Baumeister, R., Ge L. The worm in us - *Caenorhabditis elegans* as a model of human disease. **Trends Biotechnol**. 20, 147–148, 2002.
- Bertorini, T.E., Bhattacharya, S.K., Palmieri, G.M., Chesney, C.M., Pifer, D., Baker, B. Muscle calcium and magnesium content in Duchenne muscular dystrophy. **Neurology**. 32:1088-1092, 1982.
- Biggar, D.W. Duchenne Muscular Dystrophy. **Pediatr Rev** 401:83-88, 2006.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analy Biochem**. 72:248-254, 1976.
- Brooks, S.V. Rapid recovery following contraction-induced injury to in situ skeletal muscles in mdx mice. **J Muscle Res Cell Motil**. 19(2):179-87, 1998.
- Brown, R.B. Dystrophin-associated proteins and the muscular dystrophies. **Annual Rev Med**. 48: 457-466, 1997.
- Bulfield, G., Siller, W.G., Wight, P.A.L., Moore, K.J. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. **Proc Natl Acad Sci USA**. 81:1189-1192, 1984.
- Burkholder, T.J., Fingado, B., Baron, S., and Lieber, R.L. Relationship between muscle fiber types and sizes and muscle architectural properties in the mouse hindlimb. **J Morphol**. 221:177–190, 1994.

- Bushby 2009 Bushby K, Lochmuller H, Lynn S, Straub V. Interventions for muscular dystrophy: molecular medicines entering the clinic. **Lancet**. 374:1849–56, 2009.
- Businaro, R., Nori, S.L., Toesca, A., Evangelisti, E., De Renzis, G., Fumagalli, L. Altered balance of proteinase inhibitors in atrophic muscle after denervation. **Ital J Anat Embryol**. 106(2):159-65, 2001.
- Carpenter, J.L., Hoffman, E.P., Romanul, F.C.A., Kunkel, L.M., Rosales, R.K., Ma, N.S.F., Dasbach, J.J., Rae, J.F., Moore, F.M., McAfee, M.B., Pearce, L.K. Feline muscular dystrophy with dystrophin deficiency. **Am J Pathol**. 135:909-919, 1989.
- Chakkalakal, J.V., Michel, S.A., Chin, E.R., Michel, R.N., Jasmin, B.J. Targeted inhibition of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin signaling exacerbates the dystrophic phenotype in mdx mouse muscle. **Hum Mol Genet**. 15(9):1423-1435, 2006.
- Chambers, S.P., Dood A., Overall, R., Sirey, T., Lam L.T., Morris, G.E., Love, D.R. Dystrophin in adult zebrafish muscle. **Biochem. Biophys. Res. Commun**. 286:478–483, 2001.
- Chrousos, G.A., Kattah, J.C., Beck, R.W., Cleary, P.A. Side effects of glucocorticoid treatment. Experience of the Optic Neuritis Treatment Trial. **JAMA** 269(16): 2110-2112, 1993.
- Cleary, M., Williams, G.J., Metcalfe, R.A. The pattern of extra-ocular muscle involvement in ocular myasthenia. **Strabismus** 16 (1):11–18, 2008.
- Cohn, R.D. Dystroglycan: important player in skeletal muscle and beyond. **Neuromuscul Disord**. 15:207-217, 2005.
- Collins, C.A., Morgan, J.E. Duchenne's muscular dystrophy : animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. **Int J Exp Pathol**. 84(4):165-172, 2003.
- Cooper, B.J., Winand, N.J., Stedman, H., Valentine, B.A., Hoffman, E.P., Kunkel, L.M., Scott, M.O., Fischbeck, K.H., Kornegay, J.N., Avery, R.J., Williams, J.R. Schmickel, R.D., Sylvester, J.E. The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. **Nature**. 334:154–156, 1988.
- Cooper, D.N., Barondes, S.H. Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. **J Cell Biol**. 110:1681–1691, 1990.
- Cooper, D.N., Massa, S.M., Barondes, S.H. Endogenous muscle lectin inhibits myoblast adhesion to laminin. **J Cell Biol**. 115:1437–1448, 1991.
- Cullen, M.J., Jarros, E. Ultrastructure of the muscle in the X-chromosome linked dystrophic (*mdx* mouse). Comparison with Duchenne muscular dystrophy. **Acta Neuropathol**. 77:69-81, 1988.
- Culligan, K., Banville, N., Dowling, P., Ohlendieck, K. Drastic reduction of calsequestrin-like proteins and impaired calcium binding in dystrophic mdx muscle. **J Appl Physiol**. 92:435-445, 2002.

- DeBosscher, K. Selective Glucocorticoid Receptor modulators. **J Steroid Biochem Mol Biol.** 120:96-104, 2010.
- Den, H., Malinzak, D.A. Isolation and properties of beta D-galactoside-specific lectin from chick embryo thigh muscle. **J Biol Chem.** 252:5444–5448, 1977.
- De Luca, A., Pierno, S., Liantonio, A., Conte Camerino, D. Pre-clinical trials in Duchenne dystrophy: what animals models can tell us about potencial drug effectiveness. **Neuromuscul Disord.** 12:S142-S146, 2002.
- De Luca, A., Nico, B., Liantonio, A., Didonna, M.P., Fraysse, B., Pierno, S., Burdi, R., Mangieri, D., Rolland, J.F., Camerino, C., Zallone, A., Confalonieri, P., Andreetta, F., Arnoldi, E., Courdier-Fruh, I., Magyar, J.P., Frigeri, A., Pisoni, M., Svelto, M., Conte Camerino, D. A multidisciplinary evaluation of the effectiveness of cyclosporine a in dystrophic mdx mice. **Am. J. Pathol.** 166:477–489, 2005.
- Disatnik, M.H., Dhawan, J., Yu, Y., Beal, M.F., Whirl, M.M., Franco, A.A., Rando, T.A. Evidence of oxidative stress in mdx mouse muscle: studies of the pre-necrotic state. **J Neurol Sci.** 161:77-84, 1998.
- Doran, P., Gannon, J., O'Connell, K., Ohlendieck, K., Proteomic profiling of animal models mimicking skeletal muscle disorders. **Proteomics Clin. Appl.** 1:1169–1184, 2007.
- Dowling, P., Lohan, J., Ohlendieck, K. Comparative analysis of Dp427-deficient mdx tissues shows that the milder dystrophic phenotype of extraocular and toe muscle fibres is associated with a persistent expression of beta-dystroglycan. **Eur J Cell Biol.** 82:222–230, 2003.
- Emery, A.E.H., Muntoni, F. Confirmation of the Diagnosis. In: Emery, A.E.H., Muntoni, F. Duchenne Muscular Dystrophy. 3 ed. New York: Oxford University Press; 46–75, 2003. ISBN 0198515316.
- Engel, A.G., Yamamoto, M., Fischbeck, K.H. Dystrophinopathies. In: Engel, A.G., Franzini-Armstrong, C. Myology. 2 ed. New York: McGraw-Hill; 2:1133-1187, 1994. ISBN 0070195595.
- Ervasti, J.M., Ohlendieck, K., Kahl, S.D., Gaver, M.G., Campbell, K. Deficiency as a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. **Nature**, 345:315-319, 1990.
- Ervasti, J.M., Campbell, K.P. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. **Journal of Cell Biology**, 122:809-823, 1993.
- Escolar, D.M., Hache, L.P., Clemens, P.R., Cnaan, A., McDonald, C.M., Viswanathan, V., Kornberg, A.J., Bertorini, T.E., Nevo, Y., Lotze, T., Pestronk, A., Ryan, M.M., Monasterio, E., Day, J.W., Zimmerman, A., Arrieta, A., Henricson, E., Mayhew, J., Florence, J., Hu, F., Connolly, A.M. Randomized, blinded trial of weekend vs daily prednisone in Duchenne muscular dystrophy. **Neurology.** 77:444-52, 2011.
- Ferretti, R., Marques, M.J.M, Pertille, A., Santo Neto, H. Sarcoplasmic-endoplasmic-reticulum ca(2+)-atpase and calsequestrin are overexpressed in spared intrinsic laryngeal muscles of dystrophin-deficient mdx mice. **Muscle Nerve.** 39(5):609-615, 2009.

- Ferretti, R., Pertille, A., Santo Neto, H., Marques, M.J. Age-related changes in dystrophin-glycoprotein complex and in utrophin are not correlated with intrinsic laryngeal muscles protection in mdx mice **Muscle Nerve**. 44(6):978-980, 2011.
- Fischer, M.D., Budak, M.T., Bakay, M., Gorospe, J.R., Kjellgren, D., PedrosaDomellof, F., Hoffman, E.P., Khurana, T.S. Definition of the unique human extraocular muscle allotype by expression profiling. **Physiol Genomics**. 22:283–291, 2005.
- Fong, P.Y., Turner, P.R., Denetchaw, W.F., Steinhardt, R.A. Increased activity of calcium leak channels in myotubes of Duchenne human and mdx mouse origin. **Science**. 250:673-676, 1990.
- Franco-Obregon Jr, A., Lansman, J.B. Calcium entry through stretch-inactivated ion channels in *mdx* myotubes. **Nature**. 344:670-673, 1990.
- Franco-Obregon Jr, A., Lansman, J.B. Mechanosensitive ion channels in skeletal muscle from normal and dystrophic mice. **J Physiol**. 481:299-309, 1994.
- Froehner, S. C., Adams, M. E., Peters, M. F., Gee, S. H. Syntrophins: modular adapter proteins at the neuromuscular junction and the sarcolemma. **Soc Gen Physiol Ser**. 52:197–207, 1997.
- Fuentes, I., Cobos, A.R., Segade, L.A. Muscle fibre types and their distribution in the biceps and triceps brachii of the rat and rabbit. **J Anat**. 192(2):203-210, 1998.
- Gailly, P. New aspects of calcium signaling in skeletal muscle cells: implications in Duchenne muscular dystrophy. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1600:38-44, 2002.
- Gartner, T.K., Podleski, T.R. Evidence that a membrane bound lectin mediates fusion of L6 myoblasts. **Biochem Biophys Res Commun**. 67:972–978, 1975.
- Ge, Y., Molloy, M.P., Chamberlain, J.S., Andrews, P.C. Differential expression of skeletal muscle proteome in *mdx* mice at different ages. **Electrophoresis**. 25:2576-2585, 2004.
- Gerke, V., Moss, S. Annexins: form structure to function. **Physiol Rev**. 82(2):331–71, 2002.
- Gerke, V., Creutz, C.E., Moss, S.E. Annexins: linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 6(6):449–61, 2005.
- Georgiadis, V., Stewart, H.J., Pollard, H.J., Taysanoglu, Y., Prasad, R., Horwood, J., Deltour, L., Goldring, K., Poirier, F., Lawrence-Watt, D.J. Lack of galectin1 results in defects in myoblast fusion and muscle regeneration. **Dev Dyn**. 236:1014–1024, 2007.
- Gervasio, O.L., Whitehead, N.P., Yeung, E.W., Phillips, W.D., Allen, D.G. TRPC1 binds to caveolin-3 and is regulated by Src kinase - role in Duchenne muscular dystrophy. **J Cell Sci**. 121(13): 2246-2255, 2008.
- Glenmark, B., Nilsson, M., Gao, H., Gustafsson, J.A., Dahlman-Wright, K., Westerblad, H. Difference in skeletal muscle function in males vs. females: role of estrogen receptor-beta. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 287, E1125-E1131, 2004.

- Goldring, K., Jones, G.E., Thiagarajah, R., Watt, D.J. The effect of galectin1 on the differentiation of fibroblasts and myoblasts in vitro. **J Cell Sci.** 115:355–366, 2002.
- Granchelli, J.A., Pollina, C., Hudecki, M.S. Pre-clinical screening of drugs using the *mdx* mouse. **Neuromuscul Disord.** 10:235-239, 2000.
- Griffin, T.J., Aebersold, R. Advances in proteome analysis by mass spectrometry. **J Biol Chem.** 276(49):45497-45500, 2001.
- Grounds, M.D., Sorokin, L., White, J. Strength at the extracellular matrix-muscle interface. **Scand J Med Sci Sports.** 15:381-391, 2005.
- Grounds, M.D., Radley, H.G., Lynch, G.S., Nagaraju, K., DeLuca, A. Towards developing standard operating procedures for pre-clinical testing in the *mdx* mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Neurobiol Dis.** 31:1-19, 2008.
- Gu, M., Wang, W., Song, W.K., Cooper, D.N., Kaufman, S.J. Selective modulation of the interaction of alpha 7 beta 1 integrin with fibronectin and laminin by L-14 lectin during skeletal muscle differentiation. **J Cell Sci.** 107:175–181, 1994.
- Guharay, F., Sachs, F. Stretch-Activated Single Ion Channel Currents In Tissue-Cultured Embryonic Chick Skeletal-Muscle. **J Physiol-London.** 352:685-701, 1984.
- Guido, A.N., Campos, G.E., Neto, H.S., Marques, M.J., Minatel, E. Fiber type composition of the sternomastoid and diaphragm muscles of dystrophin-deficient *mdx* mice. **Anat Rec.** 293(10):1722-1728, 2010.
- Hack, A.A., Groh, M.E., McNally, E.M. Sarcoglycans in muscular dystrophy. **Microsc Res Tech.** 48:167-180, 2000.
- Harrison, F.L., Wilson, T.J. The 14 kDa beta-galactoside binding lectin in myoblast and myotube cultures: Localization by confocal microscopy. **J Cell Sci.** 101:635–646, 1992.
- Hoffman, E. P., Brown, R. H., Jr., Kunkel, L. M. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. **Cell.** 51:919–928, 1987.
- Hosaka, Y., Yokota, T., Miyagoe-Suzuki, Y., Yuasa, K., Imamura, M., Matsuda, R., Ikemoto, T., Kameya, S., Takeda, S. Alpha 1-syntrophin-deficient skeletal muscle exhibits hypertrophy and aberrant formation of neuromuscular junctions during regeneration. **J Cell Biol.** 158(6):1097-1107, 2002.
- Hu, W.H., Hausmann, O.N., Yan, M.S., Walters, W.M., Wong, P.K., Bethea, J.R. Identification and characterization of a novel Nogo-interacting mitochondrial protein (NIMP). **J Neurochem.** 81, 36–45, 2002.
- Ibraghimov-Beskrovnya, O., Ervasti, J.M., Leveille, C.J., Slaughter, C.A., Sernett, S.W., Campbell, K.P. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. **Nature,** 355:696-702, 1992.

- Islam, M.N., Narayanan, B., Ochs, R.S. A mechanism for both capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry and excitation-contraction couple  $\text{Ca}^{2+}$  release by the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle cells. **Exp Biol Med.** 227(6):425-431, 2002.
- Jarrett, H.W.; Foster, J.L. Alternate binding of actin and calmodulin to multiple sites on dystrophin. **J. Biol. Chem.** 270:5578-5586, 1995.
- Jorgensen, L.H., Blain, A., Grealley, E., Laval, S.H., Blamire, A.M., Davison, B.J., Brinkmeier, H., MacGowan, G.A., Schroder, H.D., Bushby, K., Straub, V., Lochmüller, H. Long-term blocking of calcium channels in mdx mice results in differential effects on heart and skeletal muscle. **Am J Pathol.** 178: 273–283, 2011.
- Kami, K., Senba, E. Galectin-1 is a novel factor that regulates myotube growth in regenerating skeletal muscles. **Curr Drug Targets.** 6:395–405, 2005.
- Kaminski, H.J., al-Hakim, M., Leigh, R.J., Katirji, M.B., Ruff, R.L. Extraocular muscles are spared in advanced Duchenne dystrophy. **Ann Neurol.** 32:586–588, 1992.
- Kallestad, K.M., Hebert, S.L., McDonald, A.A., Cu, S.C., McLoon, L.K. Sparing of extraocular muscle in aging and muscular dystrophies: a myogenic precursor cell hypothesis. **Exp Cell Res.** 317(6):873-885, 2011.
- Karpati, G., Carpenter, S. Small caliber skeletal muscle fibers do not suffer deleterious consequences of dystrophic gene expression. **Am J Med Genet.** 25:653–658, 1986.
- Karpati, G., Carpenter, S., Prescott, S. Small-caliber skeletal muscle fibers do not suffer necrosis in mdx mouse dystrophy. **Muscle Nerve.** 11:795-803, 1988.
- Kjellgren, D., Ryan, M., Ohlendieck, K., Thornell, L.E., Pedrosa-Domellof, F. Sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPases (SERCA-1 and -2) in human extraocular muscles. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** 44:5057–5062, 2003.
- Kohn, B., Guscetti, F., Waxenberger, M., Ausburger, H., Muscular dystrophy in a cat. **Tierarztl. Prax.** 21:451–457, 2011.
- Khurana, T.S., Predergast, R.A., Alameddine, H.S., Tomé, F.M.S., Fardeau, M., Arahata, K., Sugita, H., Kunkel, L.M. Absence of extraocular muscle pathology in Duchenne's muscular dystrophy: role for calcium homeostasis in extraocular muscle sparing. **J Exp Med.** 182:467-474, 1995.
- Koo, T., Malerba, A., Athanasopoulos, T., Trollet, C., Boldrin, L., Ferry, A., Popplewell, L., Foster, H., Foster, K., Dickson, G. Delivery of AAV2/9-microdystrophin genes incorporating helix 1 of the coiled-coil motif in the C-terminal domain of dystrophin improves muscle pathology and restores the level of alpha 1-syntrophin and alpha-dystrobrevin in skeletal muscles of mdx mice. **Hum Gene Ther.** 22(11): 1379-1388, 2011.
- Krüger, J., Kunert-Keil, C., Bisping, F., Brinkmeier, H. Transient receptor potential cation channels in normal and dystrophic mdx muscle. **Neuromuscul Disord.** 18:501-513, 2008.

- Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 277:680-685, 1970.
- Lefaucheur, J.P., Pastoret, C., Sebille, A. Phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. **Anat Rec**. 242:70-76, 1995.
- Lennon, N.J., Kho, A., Bacskai, B.J., Perlmutter, S.L., Hyman, B.T., Brown, R.H. Jr. Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. **J Biol Chem**, 278:50466Y73, 2003.
- Lewis, C., Carberry, S., Ohlendieck, K. Proteomic profiling of x-linked muscular dystrophy. **J Muscle Res Cell Motil**. 30:267-279, 2009.
- Lewis, C., Jockusch, H., Ohlendieck, K. Proteomic profiling of the dystrophin-deficient *mdx* heart reveals drastically altered levels of key metabolic and contractile proteins. **J Biomed Biotech**. 648501, 2010.
- Lewis, C., Ohlendieck, K. Proteomic profiling of naturally protected extraocular muscles from the dystrophin-deficient mdx mouse. **Biochem Biophys Res Commun**. 396(4):1024-1029, 2010.
- Li, Q., Qi, B., Oka, K., Shimakage, M., Yoshioka, N., Inoue, H., Hakura, A., Kodama, K., Stanbridge, E.J., Yutsudo, M. Link of a new type of apoptosis-inducing gene ASY/Nogo-B to human cancer. **Oncogene**. 20:3929–3936, 2001.
- Li, D.J., Long, C., Yue, Y., Duan, D.S. Sub-physiological sarcoglycan expression contributes to compensatory muscle protection in mdx mice. **Hum Mol Genet**. 18(7):1209-1220, 2009.
- Lowe, D.A., Warren, G.L., Ingalls, C.P., Boorstein, D.B., Armstrong, R.B. Muscle function and protein metabolism after initiation of eccentric contraction-induced injury. **J Applied Physiol**. 79(4):1260-1270, 1995.
- Lynch, G.S., Hinkle, R.T., Chamberlain, J.S., Brooks, S.V., Faulkner, J.A. Force and power output of fast and slow skeletal muscles from mdx mice 6–28 months old. **J. Physiol**. 535:591–600, 2001.
- Malik, V., Rodino-Klapac, L.R., Viollet, L., Wall, C., King, W., Al-Dahhak, R., Lewis, S., Shilling, C.J., Kota, J., Serrano-Munuera, C., Hayes, J., Mahan, J.D., Campbell, K.J., Banwell, B., Dasouki, M., Watts, V., Sivakumar, K., Bien-Willner, R., Flanigan, K.M., Sahenk, Z., Barohn, R.J., Walker, C.M., Mendell, J.R. Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy. **Ann Neurol**. 67:771–80, 2010.
- Mallouk, N., Jacquemond, V., Allard, B. Elevated subsarcolemmal  $Ca^{2+}$  in *mdx* mouse skeletal muscle fibers detected with  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels. **Proc Natl Acad Sci USA**, 97:4950-4955, 2000.
- Manzue, A.Y., Kuntzer, T., Pike, M., Swan, A. Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. **Cochrane Database Syst Rev**. (1), 2008.
- Maroto, R., Wood, T.G., Kurosky, A., Martinac, B., Hamill, O.P. TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. **Nat Cell Biol**. 7:179-185, 2005.

- Marques, M.J. Structural biology of the dystrophin-deficient muscle fiber. **Brazilian J Morphol Sci.** 21(3):145-152, 2004.
- Marques, M.J., Matsumura, C.Y., Santo Neto, H. Alterations in the permeability of dystrophic fibers during neuromuscular junction development. **Acta Biol Hung.** 58:1-9, 2007.
- Marques, M.J., Machado, R.V., Minatel, E., Santo Neto, H. Disodium cromoglycate protects dystrophin-deficient muscle fibers from leakiness: studies in *mdx* sternomastoid, diaaphragm and tibialis anterior. **Muscle Nerve.** 37(1):61-67, 2008.
- Matsuda, R.A., Nishikawa, A., Tanaka, H. Vizualization of dystrophic muscle fibers in *mdx* mouse by vital staining with Evans blue: evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle. **J Bioch.** 118: 959-964, 1995.
- Matsumura, C.Y., Albuquerque, T.C.P., Pertille, A., Santo Neto, H., Marques, M.J. Diltiazem and verapamil protect dystrophin-deficient muscle fibers of *mdx* mice from degeneration: a potential role in calcium buffering and sarcolemmal stability. **Muscle Nerve.** 39:167-176, 2009.
- Matsumura, C.Y., Taniguti, A.P.T., Pertille, A., Santo Neto, H., Marques, M.J. Stretch-activated calcium channel protein TRPC1 is correlated with the different degrees of the dystrophic phenotype in *mdx* mice. **Am J Physiol Cell Physiol.** 301:C1344-C1350, 2011.
- Mazzone, E.S., Messina, S., Vasco, G., Main, M., Eagle, M., D'Amico, A., Doglio, L., Politano, L., Cavallaro, F., Frosini, S., Bello, L., Magri, F., Corlatti, A., Zucchini, E., Brancalion, B., Rossi, F., Ferretti, M., Motta, M.G., Cecio, M.R., Berardinelli, A., Alfieri, P., Mongini, T., Pini, A., Astrea, G., Battini, R., Comi, G., Pegoraro, E., Morandi, L., Pane, M., Angelini, C., Bruno, C., Villanova, M., Vita, G., Donati, M.A., Bertini, E., Mercuri, E. Reliability of the North star ambulatory assessment in a multicentric setting. **Neuromuscul Disord.** 19:458-61, 2009.
- McLoon, L.K., Wirtschafter, J. Activated satellite cells in extraocular muscles of normal adult monkeys and humans. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** 44:1927-1932, 2003.
- McMullen, C.A., Ferry, A.L., Gamboa, J.L., Andrade, F.H., Dupont-Versteegden, E.E. Age-related changes of cell death pathways in rat extraocular muscle. **Exp Gerontol.** 44:420-425, 2009.
- McNeil, A.K., Rescher, U., Gerke, V., McNeil, P.L. Requirement for annexin A1 in plasma membrane repair. **J Biol Chem.** 281(46):35202-35207, 2006.
- Mendell, J.R., Sahenk, Z., Prior, T.W. The childhood muscular dystrophies: diseases sharing a common pathogenesis of membrane stability. **J Child Neurol.** 10:150-159, 1995.
- Moorhead, G., Johnson, D., Morrice, N., Cohen, P. The major myosin phosphatase in skeletal muscle is a complex between the beta-isoform of protein phosphatase 1 and the MYPT2 gene product. **FEBS Lett.** 438(3):141-144, 1998.
- Nowak, T.P., Haywood, P.L., Barondes, S.H. Developmentally regulated lectin in embryonic chick muscle and a myogenic cell line. **Biochem Biophys Res Commun.** 68:650-657, 1976.

- Ohlendieck, K., Campbell, K.P. dystrophin-associated proteins are greatly reduced in skeletal muscle from mdx mice. **J Cell Biol.** 115(6):1685-1694, 1991.
- Ozawa, E., Yoshida, M., Suzuki, A., Mizuno, Y., Hagiwara, Y., Noguchi, S. Dystrophin-associated proteins in muscular-dystrophy. **Hum Mol Genet.** 4:1711-1716, 1995.
- Pastoret, C., Sebillé, A. *Mdx* mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. **J Neurol Sci.** 129:97-105, 1995.
- Payne, E.T., Yasuda, N., Bourgeois, J.M., Devries, M.C., Rodriguez, M.C., Yousuf, J., Tarnopolsky, M.A. Nutritional therapy improves function and complements corticosteroid intervention in mdx mice. **Muscle Nerve.** 33(1):66-77, 2006.
- Pertille, A., Tonizza de Carvalho, C.L., Matsumura, C.Y., Santo Neto, H., Marques, M.J. Calcium-binding proteins in skeletal muscles of the mdx mice: potential role in the pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy. **Int J Exp Pathol.** 91(1):63-71, 2010.
- Peters, M. F., Adams, M.E., Froehner, S.C. Differential association of syntrophin pairs with the dystrophin complex. **J Cell Biol.** 138:81–93, 1997.
- Petrof, B.J. The molecular basis of activity-induced muscle injury in Duchenne muscular dystrophy. **Molec Cel Biochem.** 179 (1-2):111-123, 1998.
- Petrof, B.J. Molecular pathophysiology of myofiber injury in deficiencies of the dystrophin-glycoprotein complex. *Am J Phys Med Rehabil.* 81:S162–S174, 2002.
- Pierno, S., Nico, B., Burdi, R., Liantonio, A., Didonna, M.P., Cippone, V., Fraysse, B., Rolland, J.F., Mangieri, D., Andreetta, F., Ferro, P., Camerino, C., Zallone, A., Confalonieri, P., De Luca, A. Role of tumour necrosis factor alpha, but not of cyclo-oxygenase-2derived eicosanoids, on functional and morphological indices of dystrophic progression in mdx mice: a pharmacological approach. **Neuropathol Appl Neurobiol.** 33: 344–359, 2007.
- Planus, E., Barlovatz-Meimon, G., Rogers, R.A., Bonavaud, S., Ingber, D.E., Wang, N. Binding of urokinase to plasminogen activator inhibitor type-1 mediates cell adhesion and spreading. **J Cell Sci.** 110:1091-8, 1997.
- Poirier, F., Timmons, P.M., Chan, C.T., Guénet, J.L., Rigby, P.W. Expression of the L14 lectin during mouse embryogenesis suggests multiple roles during pre- and post-implantation development. **Development.** 115:143–155. 1992.
- Porter, J.D., Karathanasis, P. Extraocular muscle in merosin-deficient muscular dystrophy: cation homeostasis is maintained but is not mechanistic in muscle sparing. **Cell Tissue Res.** 292:495–501, 1998.
- Porter, J.D., Merriam, A.P., Hack, A.A., Andrade, F.H., McNally, E.M. Extraocular muscle is spared despite the absence of an intact sarcoglycan complex in gamma- or delta-sarcoglycan-deficient mice. **Neuromuscul Disord.** 11:197–207, 2001.

- Porter, J.D., Khanna, S., Kaminski, H.J., Sunil Rao, J., Merriam, A.P., Richmonds, C.R., Leahy, P., Li, J., Guo, W., Andrade, F.H. A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient *mdx* mice. **Hum Mol Genet.** 11-3: 263-272, 2002.
- Porter, J.D., Merriam, A.P., Khanna, S., Andrade, A.H., Richmonds, C.R., Leahy, P., Cheng, G., Karathanasis, P., Zhou, X., Kusner, L.L., Adams, M.E., Willem, M., Mayer, U., Kaminski, H.J. Constitutive properties, not molecular adaptations, mediate extraocular muscle sparing in dystrophic *mdx* mice. **FASEB J.** 17:893–895, 2003a.
- Porter, J.D., Merriam, A.P., Leahy, P., Gong, B., Khanna, S. Dissection of temporal gene expression signatures of affected and spared muscle groups in dystrophin deficient (*mdx*) mice. **Hum Mol Genet.** 12:1813–1821, 2003b.
- Probst-Cousin, S., Berghoff, C., Neundörfer, B., Heuss, D. Annexin expression in inflammatory myopathies. **Muscle Nerve.** 30(1):102-110, 2004.
- Quinlan, J.G., Hahn, H.S., Wong, B.L., Lorenz, J.N., Wenisch, A.S., Levin, L.S. Evolution of the *mdx* mouse cardiomyopathy: physiological and morphological findings. **Neuromuscul Disord.** 14: 491–496, 2004.
- Rabinovich, G.A., Sotomayor, C.E., Riera, C.M., Bianco, I., Correa, S.G. Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. **Eur J Immunol.** 30:1331–1339, 2000.
- Rando, T.A. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. **Muscle Nerve.** 24:1575-1594, 2001.
- Razzaque1, M.S., Taguchi T. The possible role of colligin/HSP47, a collagen-binding protein, in the pathogenesis of human and experimental fibrotic diseases. **Histol Histopathol.** 14:1199-1212, 1999.
- Rhee, S.G., Chae, H.Z., Kim, K Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. **Free Radic Biol Med.** 38(12):1543-52, 2005.
- Rifai, N., Gillette, M.A., Carr, S.A. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. **Nat Biotechnol.** 24:971–983, 2006.
- Rodriguez-Feo, J.A., Hellings, W.E., Verhoeven, B.A., Moll, F.L., de Kleijn, D.P., Prendergast, J., Gao, Y., van der Graaf, Y., Tellides, G., Sessa, W.C., Pasterkamp, G. Low levels of Nogo-B in human carotid atherosclerotic plaques are associated with an atheromatous phenotype, restenosis, and stenosis severity. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 27(6):1354-60, 2007.
- Rossi, A.E., Dirksen, R.T. Sarcoplasmic reticulum: the dynamic calcium governor of muscle. **Muscle Nerve.** 33:715-731, 2006.
- Rubinstein, A.L. Zebrafish: from disease modeling to drug discovery. **Curr Opin Drug Discov Devel.** 6:218–223, 2003.

- Sabourin, J., Lamiche, C., Vandebrouck, A., Magaud, C., Rivet, J., Cognard, C., Bourmeyster, N., Constantin, B. Regulation of TRPC1 and TRPC4 cation channels requires an alpha 1-syntrophin-dependent complex in skeletal mouse myotubes. **J Biol Chem.** 284:36248–36261, 2009.
- Seixas, S.L., Cândido, J.L., Sarino, W., Quirico-Santos, T. Importância do camundongo *mdx* na fisiologia da distrofia muscular de Duchenne. **Arquivos de Neuro-psiquiatria.** 55(3-B):610-617, 1997.
- Spassova, M.A., Hewavitharana, T., Xu, W., Soboloff, J., Gill, D.L. A common mechanism underlies stretch activation and receptor activation of TRPC6 channels. **Proc Natl Acad Sci USA.** 103(44):16586-16591, 2006.
- Spencer, M.J., Mellgren, R.L. Overexpression of a calpastatin transgene in *mdx* muscle reduces dystrophic pathology. **Hum Molec Genetics.** 11(21):2645-2655, 2002.
- Spurney, C.F., Gordish-Dressman, H., Guerron, A.D., Sali, A., Pandey, G.S., Rawat, R., Meulen, V.D., Cha, H-J., Pistilli, E.E., Partridge, T.A., Hoffman, E.P., Nagaraju, K. Preclinical drug trials in the *mdx* mouse: assessment of reliable and sensitive outcome measures. **Muscle Nerve.** 39(5):591-602, 2009.
- Stahl, J.S., Averbuch-Heller, L., Remler, B.F., Leigh, R.J. Clinical evidence of extraocular muscle fiber-type specificity of botulinum toxin. **Neurology.** 51, 1093–1099, 1998.
- Stirn, K.B., Smerdu, V., Erzen, I. Histochemical and immunohistochemical profile of human and rat ocular medial rectus muscles. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.** 247:1505–1515, 2009.
- Stowell, S.R., Arthur, C.M., Mehta, P., Slanina, K.A., Blixt, O., Leffler, H., Smith, D.F., Cummings, R.D. Galectin-1, -2, and -3 exhibit differential recognition of sialylated glycans and blood group antigens. **J BiolChem.** 283:10109–10123, 2008.
- Straub, V., Rafael, J.A., Chamberlain, J.S., Campbell, K.P. Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemma disruption. **J Cell Biol.** 139(2):375-385, 1997.
- Suchyna, T.M.; Tape, S.E.; Koeppe, R.E., Andersen, O.S., Sachs, F.; Gottlieb, P.A. Bilayer-dependent inhibition of mechanosensitive channels by neuroactive peptide enantiomers. **Nature.** 430:235-240, 2004.
- Tagami, S., Eguchi, Y., Kinoshita, M., Takeda, M., Tsujimoto, Y. A novel protein, RTN-XS, interacts with both Bcl-XL and Bcl-2 on endoplasmic reticulum and reduces their anti-apoptotic activity. **Oncogene.** 19:5736–5746, 2000.
- Talim, B., Malaguti, C., Gnudi, S., Politano, L., Merlini, L., Vertebral compression in Duchenne muscular dystrophy following deflazacort. **Neuromuscul Disord.** 12:294-295, 2002.
- Tanabe, Y., Esaki, K., Nomura, T. Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) mouse. **Acta Neuropathol.** 69(1-2):91-95, 1986.

- Taniguti, A.P., Pertille, A., Matsumura, C.Y., Santo Neto, H., Marques, M.J. Prevention of muscle fibrosis and myonecrosis in mdx mice by suramin, a TGF- $\beta$ 1 blocker. **Muscle Nerve**. 43(1):82-87, 2011.
- Tinsley, J.M., Blade, D.J., Richard, A.Z., Davis, K.E. Increase complexity of the dystrophin-associated protein complex. **Proc Natl Acad Sci USA**. 91:8307-8313, 1994.
- Torres, L.F., Duchen, L.W. The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscle and end-plates. **Brain**. 110:269-299, 1987.
- Turner, P.R., Fong, P., Denetclaw, W., Steinhardt, R.A. Increase calcium influx in dystrophic muscle. **J Cell Biol**. 115(6):1701-1712, 1991.
- van Deutekom, J.C., Janson, A.A., Ginjaar, I.B., Frankhuizen, W.S., Aartsma-Rus, A., Bremmer-Bout, M., den Dunnen, J.T., Koop, K., van der Kooi, A.J., Goemans, N.M., de Kimpe, S.J., Ekhardt, P.F., Venneker, E.H., Platenburg, G.J., Verschuuren, J.J., van Ommen, G.J. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. **N Engl J Med**. 357:2677-2686, 2007.
- van Genderen, H.O., Kenis, H., Hofstra, L., Narula, J., Reutelingsperger, C.P. Extracellular annexin A5: functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. **Biochim Biophys Acta**. 1783(6): 953-63, 2008.
- Vandebrouck, A., Martin, D., Colson-Van Schoor, M., Debaix, H., Gailly, P. Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (*mdx*) mouse skeletal muscle fibers. **J Cell Biol**. 158:1089-1096, 2002.
- Vandebrouck, A., Ducret, T., Basset, O., Sebille, S., Raymond, G., Ruegg, U., Gailly, P., Cognard, C., Constantin, B. Regulation of store-operated calcium entries and mitochondrial uptake by minidystrophin expression in culture myotubes. **FASEB J**. 20(1):136-138, 2006.
- Vandebrouck, A., Sabourin, J., Rivet, J., Balghi, H., Sebille, S., Kitzis, A., Raymond, G., Cognard, C., Bourmeyster, N., Constantin, B. Regulation of capacitative calcium entries by  $\alpha$ 1-syntrophin: association of TRPC1 with dystrophin complex and the PDZ domain of  $\alpha$ 1-syntrophin. **FASEB J**. 21:608-617, 2007.
- Waddell, L.B., Lemckert, F.A., Zheng, X.F., Tran, J., Evesson, F.J., Hawkes, J.M., Lek, A., Street, N.E., Lin, P., Clarke, N.F., Landstrom, A.P., Ackerman, M.J., Weisleder, N., Ma, J., North, K.N., Cooper, S.T. Dysferlin, annexin A1, and mitsugumin 53 are upregulated in muscular dystrophy and localize to longitudinal tubules of the T-system with stretch. **J Neuropathol Exp Neurol**. 70(4):302-13, 2011.
- Wakeman, B., Babu, D., Tarleton, J., Macdonald, I.M. Extraocular muscle hypertrophy in myotonia congenita. **J AAPOS**. 12:294-296, 2008.
- Ward, M.L., Williams, I.A., Chu, Y., Cooper, P.J., Ju, Y.K., Allen, D.G. Stretch-activated channels in the heart: contributions to length-dependence and to cardiomyopathy. **Prog Biophys Mol Biol**. 97:232-249, 2008.

- Washburn, M.P., Wolters, D., Yates, J.R. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. **Nature biotech.** 19:242-247, 2001.
- Watt, D.J., Jones, G.E., Goldring, K. The involvement of galectin-1 in skeletal muscle determination, differentiation and regeneration. **Glycoconj J.** 19:615-619, 2004.
- Whitehead, N.P., Yeung, E.W., Allen, D.G. Muscle damage in *mdx* (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** 33:657-662, 2004.
- Whitehead, N.P., Streamer, M., Lusambili, L.I., Sachs, F., Allen, D.G. Streptomycin reduces stretch-induced membrane permeability in muscles from *mdx* mice. **Neuromuscular Disord.** 16(12):845-854, 2006.
- Willians, I.A.; Allen D.G. Intracellular calcium handling in ventricular myocytes from *mdx* mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 292:H846-H855, 2007.
- Winegar, B.D., Haws, C.M., Lansman, J.B. Subconductance block of single mechanosensitive ion channels in skeletal fibres by aminoglycoside antibiotics. **J Gen Physiol** 107:433-443, 1996.
- Yang, B., Jung, D., Rafael, J.A., Chamberlain, J.S., Campbell, K.P. Identification of alpha-syntrophin binding to syntrophin triplet, dystrophin, and utrophin. **J Biological Chem.** 270(10):4975-4978, 1995.
- Yano, K., Zarain-Herzberg, A. Sarcoplasmic reticulum calsequestrins: structural and functional properties. **Mol Cel Biochem.** 135(1):61-70, 1994.
- Yeung, E.W., Whitehead, N.P., Suchyna, T.M., Gottlieb, P.A., Sachs, F., Allen, D.G. Effects of stretch-activated channel blockers on  $[Ca^{2+}]_i$  and muscle damage in the *mdx* mouse. **J Physiol.** 562(2):367-380, 2005.
- Yoshida, M., Yonetani, A., Shirasaki, T., Wada, K. Dietary NaCl supplementation prevents muscle necrosis in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Am J Physiol- Regulatory Integrative and Comparative Physiology.** 290(2):R449-R455, 2006.
- Zanou, N., Iwata, Y., Schakman, O., Lebacq, J., Wakabayashi, S., Gailly, P. Essential role of TRPV2 ion channel in the sensitivity of dystrophic muscle to eccentric contractions. **FEBS Lett.** 583:3600-3604, 2009.
- Zanou, N., Shapovalov, G., Louis, M., Tajeddine, N., Gallo, C., Van Schoor, M., Anguish, I., Cao, M.L., Schakman, O., Dietrich, A., Lebacq, J., Ruegg, U., Roulet, E., Birnbaumer, L., Gailly, P. Role of TRPC1 channel in skeletal muscle function. **Am J Physiol Cell Physiol.** 298: C149-C162, 2010.
- Zhu, X., Hadhazy, M., Groh, M.E., Wheeler, M.T., Wollmann, R., McNally, E.M. Overexpression of gamma-sarcoglycan induces severe muscular dystrophy. Implications for the regulation of sarcoglycan assembly. **J Biol Chem.** 276(24):21785-21790. 2001.

## ANEXOS

**Anexo 1** - Tabelas completas das proteínas com maior ou menor quantidade quando comparados os diferentes músculos (diafragma e extraocular) e grupos (controle e *mdx*).

### 1a. DIA *mdx* e DIA controle

Tabela – Anexo 1c: Proteínas em menor (valores negativos em vermelho) e maior quantidade (valores positivos em azul) no músculo diafragma *mdx* quando comparado ao diafragma controle. As proteínas foram separadas de acordo com o processo biológico que participam.

	Código de acesso	Nome	Quantidade relativa
<b>Metabolismo de Proteínas</b>	P28665	Murinoglobulina-1	-1,30
	P09542	Miosin de cadeia leve 3	-1,30
	P19253	Proteína ribossomal 60S L13a	1,28
	P35980	Proteína ribossomal 60S L18	1,31
	P09103	Proteína disulfeto-isomerase	1,32
	P47915	Proteína ribossomal 60S L29	1,41
	Q9Z1N5	RNA helicase spliceosomo BAT1	1,41
	Q9CZX8	Proteína ribossomal 40S S19	1,42
	Q9D1R9	Proteína ribossomal 60S L34	1,45
	Q91VR5	RNA helicase dependente de ATP	1,47
	P47955	Proteína ribossomal ácida 60S P1	1,54
	P14148	Proteína ribossomal 60S L7	1,59
	P19324	Serpina H1	1,62
	P17742	Peptidil-prolil cis-trans isomerase A	1,71
<b>Metabolismo de Lipídios</b>	P13707	Glicerol-3-fosphate desidrogenase [NAD+]	-1,45
	Q80XN0	D-beta-hidroxibutirato desidrogenase	-1,35
	Q9CQ62	2,4-dienoil-CoA redutase	-1,28
	P20152	Vimentina	1,77
	P51881	ADP/ATP translocase 2	1,95
	P10107	Anexina A1	2,19
<b>Metabolismo de Carboidratos</b>	Q8BW75	Amina oxidase B	-1,42
	P19157	Glutaciona S-transferase P1	-1,33
	Q924D0	Proteína de interação com reticulon-4	-1,30
	Q9D0F9	Fosfoglucomutase-1	-1,29
	Q91V92	Sintase de ATP-citrato	-1,29
	P05064	Frutose-bifosfato aldolase A	-1,26

	<b>Código de acesso</b>	<b>Nome</b>	<b>Quantidade relativa</b>
	O70250	Fosfoglicerate mutase 2	-1,26
	P14152	Malate desidrogenase	-1,25
<b>Sistema Imune</b>	P19157	Glutaciona S-transferase P 1	-1,33
	Q9CQN1	Heat shock protein 75 kDa	1,26
	P17742	Peptidil-prolil cis-trans isomerase A	1,71
	P16045	Galectina-1	2,02
	Q61171	Peroxiredoxina-2	2,03
<b>Contração Muscular</b>	Q5SX39	Miosina-4	-1,49
	P09542	Miosina de cadeia leve 3	-1,30
	P07310	Creatina quinase tipo-M	-1,29
	P20801	Troponina C	-1,27
	Q8VDD5	Miosina-9	1,33
	Q8CI43	Miosina de cadeia leve 6B	1,75
<b>Metabolismo de nucleotídeos</b>	Q8CGP6	Histona H2A tipo 1-H	1,61
<b>Sinalização de Cálcio</b>	Q5SX39	Miosina-4	-1,49
	P68134	Alfa-Actina, alfa	-1,30
	P09542	Miosina de cadeia leve 3	-1,30
	O09165	Calsequestrina-1	-1,29
	P20801	Troponina C	-1,27
	Q8VDD5	Miosin-9	1,33
	Q8CI43	Miosina de cadeia leve 6B	1,75
<b>Disfunção Mitocondrial</b>	Q8BW75	Amina oxidase B	-1,42
<b>Resposta a toxina e estresse</b>	P19157	Glutaciona S-transferase P 1	-1,33
	P10649	Glutaciona S-transferase Mu 1	-1,32
	Q9CQN1	Heat shock protein 75 kDa	1,26
	P20029	Proteína regulada por glucose 78 kDa	1,28
	Q61171	Peroxiredoxina-2	2,03
<b>Apoptose</b>	Q8BW75	Amina oxidase B	-1,42
	P19157	Glutaciona S-transferase P 1	-1,33
	Q924D0	Proteína de interação com reticulon-4	-1,30
	P20029	Proteína regulada por glucose 78 kDa	1,28
	P16045	Galectina-1	2,02
<b>Homeostase de Cálcio</b>	P48036	Anexina A5	1,65
	P10107	Anexina A1	2,19

### 1b. DIA controle e EO controle

Tabela – Anexo 1b: Proteínas em menor (valores negativos em vermelho) e maior quantidade (valores positivos em azul) no músculo diafragma controle quando comparado ao extraocular controle. As proteínas foram separadas de acordo com o processo biológico que participam.

	<b>Código de acesso</b>	<b>Nome</b>	<b>Quantidade relativa</b>
<b>Metabolismo de Proteínas</b>	Q00896	Alfa-1-antitripsina 1-3	-1,28
	Q6PB66	<i>Leucine-rich PPR motif-containing protein</i>	-1,28
	Q8BMS1	Enzima trifuncional subunidade alfa	1,27
	Q99JY0	Enzima trifuncional subunidade beta	1,32
	P09542	Miosina de cadeia leve 3	3,28
<b>Metabolismo de Lipídios</b>	Q9CR62	Proteína carreadora de 2-oxoglutarato/malato	-2,04
	Q8R429	SERCA 1	-1,76
	Q6PIE5	ATPase transportadora de sódio/potássio subunidade alfa-2	-1,63
	P05202	Aspartato aminotransferase	-1,51
	P10107	Anexina A1	-1,39
	Q60714	Proteína transportadora de ácido graxo de cadeia longa 1	-1,25
	Q8BMS1	Enzima trifuncional subunidade alfa	1,27
	P50544	Acil-CoA desidrogenase específico para cadeia muito longa	1,27
	P51174	Acil-CoA desidrogenase específico para cadeia longa	1,28
	Q07417	Acil-CoA desidrogenase específico para cadeia curta	1,28
	Q99JY0	Enzima trifuncional subunidade beta	1,32
	Q9CQ62	2,4-dienoil-CoA reductase	1,35
	Q9DB60	Proteína não caracterizada homóloga a C1orf93	1,39
	Q91WC3	Ligase 6 ácido graxo de cadeia longa	1,39
	Q924X2	Carnitina O-palmitoiltransferase 1	1,40
	Q99LC5	<i>Electron transfer flavoprotein subunit alpha</i>	1,42
	P41216	Ligase 1 ácido graxo de cadeia longa	1,51
O55143	SERCA 2	2,73	
<b>Metabolismo de Carboidratos</b>	Q8BMS1	Enzima trifuncional subunidade alfa	1,27
	P50544	Acil-CoA desidrogenase específico para cadeia muito longa	1,27
	P51174	Acil-CoA desidrogenase específico para cadeia longa	1,28
	Q07417	Acil-CoA desidrogenase específico para cadeia curta	1,28
	Q99LC5	<i>Electron transfer flavoprotein subunit alpha</i>	1,42
	Q9DCW4	<i>Electron transfer flavoprotein subunit beta</i>	1,43
	Q921G7	<i>Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase</i>	1,44

	<b>Código de acesso</b>	<b>Nome</b>	<b>Quantidade relativa</b>
	Q8BW75	Amina oxidase B	1,66
	P16125	L-lactato desidrogenase cadeia B	2,07
	P54071	Isocitrato desidrogenase [NADP]	2,25
	Q8R0Y6	10-formiltetrahidrofolato desidrogenase	2,57
<b>Sistema Imune</b>	P10649	Glutathiona S-transferase Mu 1	1,32
	Q99LX0	Proteína DJ-1	1,35
	P15626	Glutathiona S-transferase Mu 2	1,35
	P19157	Glutathiona S-transferase P 1	1,78
	Q810W6	Receptor de quimiocina C-X-C tipo 1	3,78
<b>Sinalização de Integrina</b>	P08121	Colágeno cadeia alfa-1(III)	-4,12
	Q01149	Colágeno cadeia alfa-2 (I)	-2,28
<b>Contração Muscular</b>	P13541	Miosina-3	-3,42
	O08638	Miosina-11	-2,44
	Q8CI43	Miosina de cadeia leve 6B	-2,31
	Q7TQ48	Sarcalumenina	-2,18
	Q5SX39	Miosina-4	-1,87
	P21107	Tropomiosina cadeia alfa-3	-1,35
	O88346	Troponina T, fibras lentas	1,25
	P58771	Tropomiosina cadeia alfa-1	1,34
	P07310	Creatina quinase tipo-M	1,40
	Q8CI51	<i>PDZ and LIM domain protein 5</i>	1,67
	Q91Z83	Miosina-7	1,73
	Q5SX40	Miosina-1	2,15
	P51667	Miosina regulatória de cadeia leve 2, isoforma cardíaca	2,67
	P09542	Miosina de cadeia leve 3	3,28
<b>Metabolismo de Nucleotídeos</b>	Q9CR62	Proteína carreadora de 2-oxoglutarato/malato	-2,04
	P10922	Histona H1.0	-1,43
	Q8CGP6	Histona H2A tipo 1-H	-1,36
	P35550	<i>rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillar</i>	1,43
	P50247	Adenosilhomocisteinase	1,59
	Q8R0Y6	10-formiltetrahidrofolato desidrogenase	2,57
<b>Sinalização de Cálcio</b>	Q8CI43	Miosina de cadeia leve 6B	-2,31
	Q5SX39	Miosin-4	-1,87
	Q8R429	SERCA 1	-1,76
	O09165	Calsequestrina-1	-1,33
	O88346	Troponina T, fibra lenta	1,25
	Q5SX40	Miosina-1	2,15

	<b>Código de acesso</b>	<b>Nome</b>	<b>Quantidade relativa</b>
	P51667	Miosina regulatória de cadeia leve 2 isoforma cardíaca	2,67
	O55143	SERCA 2	2,73
	P09542	Miosina de cadeia leve 3	3,28
<b>Disfunção Mitochondrial</b>	Q8BW75	Amina oxidase B	1,66
	Q924X2	Carnitina O-palmitoyltransferase 1	1,40
<b>Resposta a toxina e estresse</b>	P10649	Glutathione S-transferase Mu 1	1,32
	Q99LX0	Proteína DJ-1	1,35
	P15626	Glutathione S-transferase Mu 2	1,35
	P19157	Glutathione S-transferase P 1	1,78
<b>Apoptose</b>	Q60932	Proteína 1 de canal voltagem dependente seletivo a ânion	1,37
	Q8BW75	Amina oxidase B	1,66
	P19157	Glutathione S-transferase P 1	1,78
<b>Homeostase de Cálcio</b>	Q8R429	SERCA 1	-1,76
	Q6PIE5	ATPase transportador de Sódio/potássio - subunidade alfa-2	-1,63
	P05202	Aspartato aminotransferase	-1,51
	P10107	Anexina A1	-1,39
	O55143	SERCA 2	2,73

### 1c. DIA *mdx* e EO *mdx*

Tabela - Anexo 1c: Proteínas em menor (valores negativos em vermelho) e maior quantidade (valores positivos em azul) no músculo diafragma *mdx* quando comparado ao extraocular *mdx*. As proteínas foram separadas de acordo com o processo biológico que participam.

	<b>Código de acesso</b>	<b>Nome</b>	<b>Quantidade relativa</b>
<b>Metabolismo de Proteínas</b>	P05202	Aspartato aminotransferase	-1,62
	P22599	Alfa-1-antitripsina 1-2	-1,59
	Q00898	Alfa-1-antitripsina 1-5	-1,52
	Q00896	Alfa-1-antitripsin 1-3	-1,52
	Q5EBG6	Heat shock protein beta-6	-1,46
	Q3UV70	Piruvate desidrogenase-fosfatase 1	-1,42
	P07759	Inibidor de protease serina A3K	-1,42
	P09103	Proteína disulfíto-isomerase	1,26
	Q9CZX8	Proteína ribossomal 40S S19	1,30
	Q9CXT8	Peptidase de processamento mitocondrial – subunidade beta	1,34
	P14602	<i>Heat shock protein beta-1</i>	1,35
	P17742	Peptidil-prolil cis-trans isomerase A	1,43
	P14148	Proteína ribossomal 60S L7	1,44
	Q9D1R9	Proteína ribossomal 60S L34	1,47
	P47955	Proteína ribossomal ácida 60S P1	1,49
	P19324	Serpina H1	1,52
	P47915	Proteína ribossomal 60S L29	1,52
P09542	Miosina de cadeia leve 3	2,25	
<b>Metabolismo de Lipídios</b>	Q8R429	SERCA 1	-2,03
	P13707	Glicerol-3-fosfate desidrogenase [NAD+]	-1,62
	P19096	Sintase de ácido graxo	-1,53
	Q61147	Ceruloplasmina	-1,28
	Q9CR62	Proteína transportadora de 2-oxoglutarato/malato	-1,28
	Q8BH59	Proteína mitocondrial transportadora ligada ao cálcio Aralar1	-1,25
	Q9D0K2	Succinil-CoA 3-cetoácido-coenzima A transferase 1	1,51
	P10107	Anexina A1	1,51
	Q9DB60	Proteína não caracterizada homóloga a C1orf93	1,71
	P51881	ADP/ATP translocase 2	1,81
	P11404	Proteína de ligação a ácido graxo, coração	2,19
O55143	SERCA 2	3,90	
<b>Metabolismo de Carboidratos</b>	Q91V92	ATP-citrato sintase	-1,75
	P21550	Beta-enolase	-1,72
	Q9Z1E4	Glicogênio sintase, muscular	-1,63

	<b>Código de acesso</b>	<b>Nome</b>	<b>Quantidade relativa</b>
	Q3UV70	Piruvate desidrogenase -fosfatase 1	-1,42
	P05064	Frutose-bisfosfato aldolase A	-1,40
	Q9WUB3	Glicogênio fosforilase, forma muscular	-1,32
	Q924D0	Proteína de interação com reticulon-4	-1,25
	Q9CXT8	Peptidase de processamento mitocondrial – subunidade beta	1,34
	P54071	Isocitrato desidrogenase [NADP]	1,82
	P16125	L-lactato desidrogenase cadeia B	1,87
<b>Sistema Imune</b>	P16045	Galectina-1	1,63
	Q810W6	Receptor de quimiocina C-X-C tipo 1	3,27
<b>Sinalização de Integrina</b>	P08121	Colágeno cadeia alfa-1(III)	-3,64
	Q01149	Colágeno alfa-2(I)	-2,00
	P11087	Colágeno cadeia alfa-1(I)	-1,88
	Q62009	Periostina	1,33
<b>Contração Muscular</b>	Q5SX39	Miosina-4	-3,46
	O08638	Miosina-11	-3,36
	P32848	Parvalbumina alfa	-2,86
	P13541	Miosina-3	-2,73
	Q7TQ48	Sarcalumenina	-1,63
	P21107	Tropomiosina de cadeia alpha-3	-1,62
	Q5EBG6	<i>Heat shock protein beta-6</i>	-1,46
	Q6P8J7	Creatina quinase tipo-S	-1,42
	Q8CI43	Miosina de cadeia leve 6B	-1,37
	P14602	<i>Heat shock protein beta-1</i>	1,35
	Q8VDD5	Miosina-9	1,36
	Q5SX40	Miosina-1	1,46
	P51667	Miosin regulatória de cadeia leve 2, isoforma cardíaca	2,07
	P09542	Miosina de cadeia leve 3	2,25
<b>Metabolismo de nucleotídeo</b>	Q8BH59	Proteína mitocondrial carreadora ligada ao cálcio Aralar1	-1,25
	P15864	Histona H1.2	1,40
	P51881	ADP/ATP translocase 2	1,81
<b>Sinalização de cálcio</b>	Q5SX39	Miosina-4	-3,46
	Q8R429	SERCA 1	-2,03
	O09165	Calsequestrina-1	-1,78
	Q8CI43	Miosina de cadeia leve 6B	-1,37
	Q8VDD5	Miosina-9	1,36
	O09161	Calsequestrina-2	1,45
	Q5SX40	Miosina-1	1,46

	<b>Código de acesso</b>	<b>Nome</b>	<b>Quantidade relativa</b>
	P51667	Miosina regulatória de cadeia leve 2, isoforma cardíaca	2,07
	P09542	Miosina de cadeia leve 3	2,25
	O55143	SERCA 2	3,90
<b>Resposta a toxina e ao estresse</b>	Q5EBG6	<i>Heat shock protein beta-6</i>	-1,46
	P46412	Glutathiona peroxidase 3	-1,44
	P11499	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	1,25
	P14602	<i>Heat shock protein beta-1</i>	1,35
	Q9D8N0	Fator de alongação 1-gama	1,56
<b>Apoptose</b>	Q9CRB8	Proteína de fissão mitocondrial 1	-1,29
	Q924D0	Proteína de interação com reticulon-4	-1,25
	Q60932	Proteína 1 de canal voltagem dependente seletivo a ânion	1,29
	P16045	Galectina-1	1,63
<b>Homeostase de Cálcio</b>	Q8R429	SERCA 1	-2,03
	P10107	Anexina A1	1,51
	O55143	SERCA 2	3,90



## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Doutorado** intitulada **“MECANISMOS DE PROTEÇÃO DA DISTROFIA MUSCULAR: ESTUDO PROTEÔMICO E TERAPIA FARMACOLÓGICA”**:

( ) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

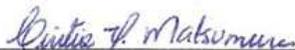
Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

( ) CIBio - Comissão Interna de Biossegurança , projeto nº \_\_\_\_\_, Instituição: \_\_\_\_\_.

(X) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto nº 1576-1, Instituição: Unicamp.

( ) CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo nº \_\_\_\_\_, Instituição: \_\_\_\_\_.

*\* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*



Aluna: Cintia Yuri Matsumura

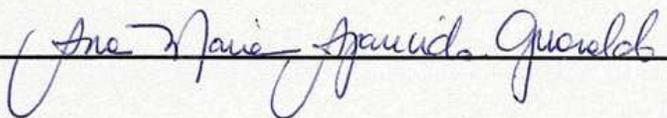


Orientadora: Profa. Dra. Maria Julia Marques

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura



Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

( ) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura